EVANDER BUENO DE LIMA

**Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana
amniótica de cão**

São Paulo
2012

EVANDER BUENO DE LIMA

Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro
Beltrão Braga

São Paulo
2012

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.2558
FMVZ

Lima, Evander Bueno de
Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana
amniótica de cão / Evander Bueno de Lima. -- 2012.
150 f.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Células-tronco. 2. Membrana amniótica. 3. Cão. 4. Carcinoma
embrionário. 5. Terapia celular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão", protocolado sob o nº 1210/2007, utilizando 8 (oito) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 12/12/2007.

We certify that the Research "Establishment and characterization of stem cells fetuses amniotic membrane dogs", protocol number 1210/2007, utilizing 8 (eight) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/12/2007.

São Paulo, 31 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Evander Bueno de

Título: Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, que sempre esteve cumprindo seu papel de educadora de forma exemplar, colocando sua experiência e conhecimento a disposição para que pudesse crescer como pesquisador e ser humano.

“Mas não há forma mais forte e suave de ensinar do que o exemplo persuade sem retórica, reduzem sem porfia, todas as dúvidas desatam e corta caladamente todas as desculpas.”

Espero que muitos alunos tenham a sorte que tive de lhe encontrar como orientadora, pois apreenderão acima de tudo o respeito ao próximo, e gozarão do orgulho de tê-la como orientadora.

Muito obrigado, nada disso seria possível sem a sua participação.

AGRADECIMENTOS

A minha amada esposa Gabriela dos Santos Bueno, sempre presente, me ajudando e mostrando que as coisas podem sempre ser melhores. Obrigado por tudo, você me faz um homem melhor todos os dias, foi e sempre será o melhor presente que a vida me deu. Te amo cada dia mais.

A Profa. Dra. Alessandra Estevez, uma colega de faculdade que se mostrou uma grande amiga de vida, sem você nada disto teria começado.

A todos os amigos do programa de pós-graduação em anatomia dos animais domésticos e silvestres da Universidade de São Paulo onde durante estes últimos anos fizeram de momentos estressantes pela rotina ou alegres pela companhia lembranças inesquecíveis, em especial à Guilherme Gregores Buzon, Thiago Aloia, Carlos Alberto Sarmento e Caio Biasi, companheiros de pós-graduação, república e vida, desde já grandes saudades.

À minha família, que mesmo distantes e sem condições financeiras para me ajudar, deixam sempre a certeza de que moveriam montanhas para me apoiar.

À coordenadora do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo, Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, com muita empatia, sempre disposta e muita competência faz deste departamento um lugar a ser sempre lembrado com muitas saudades.

A todo o grupo de células-tronco do Departamento, em especial a: Caroline Pinho Winck, que desde o início (dezembro de 2007, antes, durante e depois das festas de fim de ano), estava comigo no laboratório cultivando e caracterizando células para nossos estudos. Sempre disposta a ajudar e com um carinho peculiar, faz-se uma amiga adorável e muito especial. Obrigado Carol.

A Isabella Fernandes e Fabiele Russo, sempre sorrindo me ajudaram sem medir esforços, mostrando o espírito de empatia e competência do grupo de células-tronco.

Ao amigo Marcos Vinícius, sempre mostrando companheirismo, tornando o ambiente do laboratório sempre mais agradável com a sua presença.

Aos técnicos dos laboratórios do Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, Rose Eli....., Diogo Palermo, Ronaldo....., Índio....., Raimundo..... e João....., todos sempre muito empáticos e solistas a ajudar com o desenvolvimento da tese.

A FAPESP, que proporcionou a bolsa de estudo, assim como o dinheiro necessário para a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Dra. Graciela Conceição Pignatari, por sua participação e ajuda com seu conhecimento, paciência e atenção desprendida fizeram com que esta tese concluisse. Muito obrigado.

“Se vi mais longe, foi por estar colocado nos ombros de gigantes.”
Isaac Newton

RESUMO

LIMA, E. B. de. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão.** [Establishment and characterization of fetal stem cells from amniotic dog's membrane]. 2012. 150f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A membrana amniótica humana vem assumindo um papel de extrema importância na medicina regenerativa nos últimos anos, principalmente na área de dermatologia e oftalmologia, sendo seu uso promissor no tratamento de doenças cuja terapêutica atual é pouco eficaz. Além disso, na membrana amniótica humana encontram-se células-tronco mesenquimais, que apresentam plasticidade e vem sendo aplicadas para a regeneração de tecidos. Entretanto, muito pouco se sabe sobre a capacidade plástica e o uso de células-tronco de membrana amniótica de animais, já que a literatura a este respeito, não é tão ampla quanto à de humanos. Neste projeto estabelecemos a cultura de células-tronco de membrana amniótica (MA) de fetos caninos, caracterizando as células *in vitro* e *in vivo*. As células de MA foram obtidas a partir de um procedimento cirúrgico de histerectomia em cadelas prenhas, durante campanhas de castração da prefeitura da cidade de São Paulo. As células de MA foram caracterizadas *in vitro*, observando-se características semelhantes a outras células-tronco mesenquimais. Porém, quando foi analisado o seu comportamento *in vivo*, observamos a formação de um tumor de crescimento rápido, aproximadamente um mês, após o inóculo dessas células em 10 camundongos imunossuprimidos *nude*, sendo o tumor identificado histologicamente como um carcinoma embrionário. Diante do comportamento biológico formando um tumor *in vivo*, inferimos que células-tronco provenientes de membrana amniótica de cães não devem ser usadas para aplicação com objetivos terapêuticos em animais, pelo menos até que novas coletas sejam realizadas para que se possa confirmar ou não este comportamento.

Palavras-chave: Células-tronco. Membrana amniótica. Cão. Carcinoma embrionário. Terapia celular.

ABSTRACT

LIMA, E. B. de. **Establishment and characterization of fetal stem cells from amniotic dog's membrane.** [Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão]. 2012. 150 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The human amniotic membrane has taken an extremely important role in regenerative medicine in recent years, especially in dermatology and ophthalmology, and its promising use in treating diseases for which current therapy is ineffective. In addition, the amniotic membrane has human mesenchymal stem cells, which exhibit plasticity and have been applied to tissue regeneration. However, very little is known about the plastic capacity and the use of stem cells from amniotic membrane of animals, since the literature in this regard, it is not as broad as those of humans. In this project we established a culture of amniotic stem cells of dog, characterizing these cells *in vitro* and *in vivo*. The cells were obtained from a surgical procedure for hysterectomy in pregnant bitches, during castration's campaigns of the São Paulo's municipality. The cells were characterized *in vitro*, observing characteristics similar to other mesenchymal stem cells. In spite of their behavior, *in vivo* we observed the formation of a fast-growing tumor about a month after the inoculation of these cells in 10 immunosuppressed mice, being the tumor identified histologically as an embryonic carcinoma. Considering the biological behavior of forming a tumor *in vivo*, we infer that stem cells from amniotic membrane of dogs should not be used for application for therapeutic purposes in animals, at least until other collections are carried out so that it can be confirmed or not.

Keywords: Amniotic membrane. Dog. Carcinoma. Cellular therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O feto e seus anexos.	46
Figura 2 - Esquema de produção dos vírus recombinantes e das células-tronco de membrana amniótica carregando o gene LacZ	53
Figura 3 - Análise microscópica do isolamento das células derivadas da membrana amniótica de fetos caninos por explante proveniente das duas coletas.	73
Figura 4 - Análise das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos provenientes da coleta 35d em microscópio óptico	74
Figura 5 - Fotomicrografia da cultura de células derivadas da membrana amniótica 35d e A8 em diferentes passagens em microscópio óptico.....	74
Figura 6 - Análise dos produtos de PCR após digestão enzimática com a enzima de restrição Sau961 dos fetos caninos da primeira coleta.....	76
Figura 7 - Análise da expressão do gene LacZ nas células NIH3T3 e nas células de membrana amniótica A8 em microscópio óptico.....	77
Figura 8 - Análise da morfologia das células derivadas da membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8.....	78
Figura 9 - Fotomicrografia da coloração de azul de toluidinadas células de membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8.....	79
Figura 10- Fotomicrografia da coloração de hematoxilina-eosina das células de membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8.....	80
Figura 11 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos (35d).	81
Figura 12 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células-tronco fetais de membrana amniótica de cão (A8).....	82
Figura13 - Análise das células derivadas de membrana amniótica 35d e A8 por microscopia eletrônica de transmissão..	83
Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das células-tronco derivadas de membrana amniótica das células 35d.....	84
Figura 15 - Análise do perfil de expressão de Oct4 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d	93

Figura 16 - Análise do perfil de expressão de vimentina no citoplasma das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d.	94
Figura 17 – Análise do perfil de expressão de CD105 na membrana das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d	95
Figura 18 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d	96
Figura 19 - Análise do perfil de expressão de CD34 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d.	97
Figura 20 - Análise do perfil de expressão de CD45 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d.	98
Figura 21 - Análise do perfil de expressão de nestina no citoplasma das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d	99
Figura 22 - Análise do perfil de expressão de p53 no citoplasma das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d.....	100
Figura 23 - Análise do perfil de expressão de c-Myc no núcleo das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d.....	101
Figura 24 - Análise do perfil de expressão de Oct4 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ	103
Figura 25 - Análise do perfil de expressão de vimentina nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ.....	104
Figura 26 - Análise do perfil de expressão de CD105 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ.....	105
Figura 27 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ.....	106
Figura 28 - Análise do perfil de expressão de CD34 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ.	107
Figura 29 - Análise do perfil de expressão de CD45 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ	108
Figura 30 - Análise do perfil de expressão de nestina nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ.....	109
Figura 31 - Análise do perfil de expressão de p53 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ	110
Figura 32 - Análise do perfil de expressão de c-Myc nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ..	111
Figura 33 - Análise molecular por RT-PCR das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos 35d.....	112

Figura 34 - Análise molecular por RT-PCR das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ.....	113
Figura 35 - Diferenciação em adipócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d.....	114
Figura 36 - Diferenciação em adipócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ.	115
Figura 37 - Diferenciação em osteócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d.....	116
Figura 38 – Diferenciação em osteócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ	117
Figura 39 – Análise das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d após indução condrogênica.....	118
Figura 40– Análise das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ após indução condrogênica	119
Figura 41 – Análise macroscópica da formação do tumor após 3-4 semanas do inóculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35d e A8/LNPOZ, no bíceps femoral de camundongos imunossuprimidos nude	121
Figura 42 – Análise macroscópica do nódulo dissecado formado após 3-4 semanas do inóculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35de A8/LNPOZ, respectivamente no bíceps femoral de camundongos imunossuprimidos nude.....	122
Figura 43 – Análise macroscópica do nódulo dissecado formado após 3-4 semanas do inóculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35d e A8/LNPOZ, respectivamente na região intraperitoneal de camundongos imunossuprimidos nude.....	123
Figura 44 – Fotografia da formação tumoral após injeção subcutânea das células de membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPOZ em camundongos imunossuprimidos nude.....	125
Figura 45 – Fotomicrografia da histologia por coloração de HE da região muscular do local de inoculação no bíceps femoral das células-tronco da membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ.....	127
Figura 46 – Fotomicrografia da histologia do tumor formado após 3-4semanas do inóculo das células 35d e A8/LNPOZ, respectivamente por coloração de HE	128
Figura 47 – Análise histopatológica do encéfalo retirado do camundongo após 3-4 semanas do inóculo de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ, respectivamente na região intraperitoneal.....	129

Figura 48 – Análise histopatológica do coração de camundongo após inóculo de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ, respectivamente na região intraperitoneal.....	130
Figura 49 – Análise histopatológica do pulmão de camundongo após inóculo de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ, respectivamente na região intraperitoneal.....	131
Figura 50 – Histologia por coloração de HE do fígado de camundongo imunossuprimido nude após inoculação de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ respectivamente na região intraperitoneal.....	132
Figura 51 – Histologia por coloração de HE do rim de camundongo imunossuprimido nude com carcinoma embrionário surgido após inoculação de células 35d e A8, respectivamente, na região intraperitoneal após inoculação de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ respectivamente na região intraperitoneal.....	133
Figura 52 – Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão da formação tumoral obtidas em camundongos imunossuprimidos, nude após 32 dias da inoculação subcutânea na região cervical das células 35d	134
Figura 53 - Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão da formação tumoral encontrada nos camundongos imunossuprimidos nudes após 56 dias da inoculação de células A8/LNPOZ.....	135

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento das células-tronco fetais derivadas de membranas amnióticas 35d com tripsinizações a cada 24h por quinze passagens	85
Gráfico 2 - Curva de crescimento das células-tronco fetais de membrana amniótica A8/NPoZ contadas a cada 24h inicialmente, na quarta à sexta passagem a cada 48h em câmara de Neubauer	86
Gráfico 3 - Curva de crescimento das células-tronco fetais derivadas de membrana amniótica 35d após tripsinizações a cada 72h em câmara de Neubauer.....	86
Gráfico 4 - Análise do número de células vivas e mortas das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d após 33 dias de cultivo.	88
Gráfico 5 - Análise do número de células vivas e mortas das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ após 33 dias de cultivo.	88
Gráfico 6 - Análise da viabilidade celular das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LNPoZ após 33 dias de cultivo..	89
Gráfico 7 – Análise da viabilidade celular das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LNPoZ após 33 dias de cultivo.....	90
Gráfico 8 - Análise da proliferação celular das células-troncos de membrana amniótica de fetos caninos 35d pelo método colorimétrico de MTT.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSA	albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
°C	grau Celsius
cm ²	centímetro quadrado
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCZ-SP	Centro de Controle de Zoonoses
cDNA	DNA Complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido
DMEM	do inglês, <i>Dullbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEMs	DMEM suplementado com 20% de soro fetal bovino, 200 µ/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina.
DMEMc	DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mM de L-Glutamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTPs	Nucleotídeos do DNA
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
h	Horas
HE	Hematoxilina-eosina
H ₂ O	Água
IgG	Imunoglobulina de classe G
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianeto de potássio
K ₄ Fe(CN) ₆	hexacianoferrato de potássio
LacZ	Gene bacteriano que codifica a enzima β-galactosidade
LCT	Laboratório de Células-Tronco

LTR	do inglês, <i>Long Terminal Repeats</i>
mg	Miligrama
Min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MoMLV	do inglês, <i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NIH3T3	células fibroblásticas
Oct-4	Octâmero-4 (octamer 4)
pLNPoZ	Vetor retroviral carregando o gene bacteriano LacZ
p	Passagem celular
PCR	Reação da polimerase em cadeia (polymerase chain reaction)
PE501	Células empacotadoras de vírus ecotrópicos
PO	Polivírus
PT67	Células empacotadoras de vírus anfotrópicos
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação da polimerase em cadeia
rpm	Rotação por minuto
Sau961	Enzima de restrição
SFB	Soro Fetal Bovino
SRD	Sem Raça Definida
μl	Microlito (10 ⁻⁶)
X-gal	5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactosidade
x g	Força gravitacional
%	Porcentagem
35d	35 dias de gestação
56d	56 dias de gestação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
2	OBJETIVOS	35
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3	JUSTIFICATIVA.....	37
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	39
4.1.	AS CÉLULAS-TRONCO E A TERAPIA CELULAR	39
4.1.1	Células-tronco embrionárias (CTE)	40
4.1.2	Células-Tronco Adultas (CTA).....	41
4.1.3	Células-Tronco Fetais (CTF).....	41
4.2	CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DA MEMBRANA AMNIÓTICA E TERAPIA CELULAR.....	42
4.3	A MEMBRANA AMNIÓTICA E SUA ORIGEM EMBRIONÁRIA	45
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1	ANIMAIS.....	48
5.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	48
5.3	ANÁLISE DA CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS PROVENIENTES DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	50
5.4	ANÁLISE GENÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS PROVENIENTES DA GESTAÇÃO DE CADELA PORTADORA DE DISTROFIA MUSCULAR-GRMD (GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY)	51

5.5 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DOS CÃES COM VETORES RETROVIRAIS CONTENDO O GENE REPÓRTER LACZ	52
5.5.1 Obtenção das células produtoras de vírus que carregam o gene repórter LacZ	54
5.5.2 Obtenção das células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães carregando o gene repórter LacZ.....	56
5.5.3 Análise da expressão do gene exógeno LacZ nas células-tronco derivadas da membrana amniótica	57
5.6 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES	58
5.6.1 Caracterização morfológica	58
5.6.1.1 Análise morfológica das células-tronco de membrana amniótica em microscopia de luz.....	59
5.6.1.2. Análise morfológica das células por coloração de hen e azul de toluidina	59
5.6.1.2.1 Coloração de Azul de Toluidina	59
5.6.1.2.2 Coloração de hematoxilina-eosina.....	60
5.6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos	60
5.6.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos	61
5.6.2 Caracterização celular.....	61
5.6.2.1 Curva de crescimento das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos.....	61
5.6.2.2 Análise da viabilidade celular das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos	62
5.6.2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT	62

5.6.2.4 Análise imunocitoquímica das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos	63
5.6.3 Caracterização molecular através de RT-PCR	64
5.6.4 Caracterização funcional.....	66
5.6.4.1 Diferenciações adipogênica e osteogênicas.....	66
5.6.4.2 Diferenciação condrogênica.....	67
5.7 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES	68
5.7.1 Inoculação das células 35d e A8/LNPOZ nos camundongos imunossuprimidos (nude).....	68
5.7.2 Avaliação macroscópica da formação tumoral.....	68
5.7.3 Avaliação microscópica da formação tumoral.....	69
5.7.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão do nódulo formado após inoculação das células nos camundongos imunossuprimidos.....	69
6 RESULTADOS.....	72
6.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	72
6.2 ANÁLISE GENÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS PROVENIENTES DA GESTAÇÃO DE CADELA PORTADORA DE DISTROFIA MUSCULAR-GRMD (<i>GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY</i>)	75
6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO LacZ NAS CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	76
6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS	77
6.4.1 Caracterização morfológica	77

6.4.1.1	Análise Morfológica por Coloração	78
6.4.1.1.1	Coloração de Azul de Toluidina	78
6.4.1.1.2	Coloração de Hematoxilina – Eosina	79
6.4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura células de membrana amniótica de fetos caninos	80
6.4.1.3	Microscopia Eletrônica de Transmissão das células de membrana amniótica de fetos caninos	82
6.5.2	Caracterização Celular	85
6.5.2.1	Curva de crescimento da células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35D e A8.....	85
6.5.2.2	Análise da viabilidade celular das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos	87
6.5.2.3	Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT.....	91
6.5.2.4	Análise imunocitoquímica das células-tronco de membrana amniótica de cães.....	99
6.5.3	Caracterização molecular através de RT-PCR	111
6.5.4	Caracterização funcional	113
6.6	ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS	120
6.6.1	Análise macroscópica do nódulo após inóculo das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos	120
6.6.2	Análise histológica dos órgãos dos camundongos nudes após inoculação das células derivadas de membrana amniótica 35d e A8 por coloração de Hematoxilina-Eosina	126
6.6.3	Microscopia eletrônica de Transmissão do nódulo formado após inoculação das células-tronco de membrana amniótica (35d e A8) na região cervical dos camundongos imunossuprimidos nude	134

7 DISCUSSÃO.....	137
8 CONCLUSÕES.....	143
REFERÊNCIAS.....	143

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do corpo humano perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo normal de envelhecimento (PEREIRA, 2008), fato este também observado por Gava; Zaroni (2005) que concluíram seu trabalho dizendo que o processo do envelhecimento é progressivo e deteriorativo, e a consequência final desse processo é a morte das células, tecidos, órgãos ou até mesmo de um organismo.

A baixa demanda de órgãos disponíveis para transplantes e problemas relacionados com a compatibilidade entre doadores dificultam que esse se torne um tratamento efetivo para inúmeras doenças. A descoberta de que células ainda não-diferenciadas presentes (do inglês *stem cells* ou células-tronco), por exemplo, na medula óssea de células-tronco mesenquimais, proporcionou estudos *in vitro*, sugerindo a funcionalidade de interação na formação de estruturas oferecendo suporte de desenvolvimento e estabilização vascular tubular, indicando a importância de se estudar cada tipo de célula-tronco e seus aspectos de similaridade (SORRELL; BABER; CAPLAN, 2009).

As células-tronco são células indiferenciadas definidas pela capacidade de auto-renovação e diferenciação em células maduras (BOHELER et al., 2002). Atualmente, a terapia celular com células-tronco parece ser uma estratégia de tratamento promissor para algumas doenças cujo tratamento ainda não é efetivo (KORBLING; ESTROV, 2003). A observação de que tecidos lesionados podem se regenerar a partir de células-tronco em animais estimula pesquisas como a realizada por Messon em 2007. Segundo este autor, células progenitoras miogênicas quiescentes são reguladas por fatores de transcrição que ativam genes que fazem com que células satélites quiescentes entrem novamente no ciclo celular e regenerem o músculo esquelético injuriado de camundongos.

Dada à importância que células-tronco vêm assumindo no cenário terapêutico, caracterizar novos tipos celulares é essencial para melhor compreender e aplicar essas células em tratamentos futuros em humanos ou animais.

A membrana amniótica e as células do fluido amniótico humano demonstram grande capacidade de diferenciação *in vitro*, reafirmando a importância em

caracterizá-las celular e molecularmente, para que futuramente as mesmas possam ser aplicadas em protocolos de terapia celular (ISMAIL et al., 2009; MIHU et al., 2009; PAROLINI; CARUSO, 2011).

Neste trabalho, estabelecemos a cultura celular e caracterizamos *in vitro* e *in vivo* células-tronco fetais de membrana amniótica de cão, para verificar se a mesma pode ser uma nova fonte a ser usada nos protocolos de terapia celular. Os cães têm sido considerados modelos animais atraentes para avaliar novas drogas ou realizar ensaios pré-clínicos (URANIO et al., 2011). Além disso, existem mais de 370 doenças genéticas caninas semelhantes a doenças e disfunções ocorridas em seres humanos (SONGSASEN; WILDT, 2007). Sendo assim, torna-se nítida a importância de caracterizar células-tronco de cães, para posteriormente verificar se os resultados podem ser extrapolados para humanos ou mesmo em terapias regenerativas autólogas, como vem sendo de uso comum nas diversas pesquisas supracitadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho o objetivo principal foi caracterizar uma nova fonte de células-tronco, provenientes da membrana amniótica de fetos caninos, a fim de verificar a possibilidade do uso dessas células em futuros protocolos terapêuticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos caninos.
- Realizar a caracterização celular, molecular e funcional *in vitro* das células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos de cães.
- Analisar *in vivo* o potencial carcinogênico das células derivadas da membrana amniótica de fetos de cães em camundongos imunossuprimidos;

3 JUSTIFICATIVA

As células-tronco vêm se firmando no cenário mundial como uma alternativa promissora na medicina regenerativa para o tratamento de diversas doenças até então com escassos recursos terapêuticos. Em humanos, células-tronco derivadas da membrana amniótica vêm demonstrando sua plasticidade, com potencial para aplicação na terapia regenerativa. Além disso, a membrana amniótica livre de células já é amplamente aplicada em humanos como curativo tanto na dermatologia como na oftalmologia.

Entretanto, em relação à membrana amniótica de animais pouco se sabe, tornando clara a necessidade de estudos nessa área. Recentemente, enquanto esse projeto estava em andamento, foi publicado um trabalho de caracterização de células provenientes de membrana amniótica canina apenas *in vitro*. Ainda assim, pouco se sabe sobre essas células, o que nos levou a caracterizar células derivadas da membrana amniótica de fetos de cães, assim como analisar seu comportamento *in vivo*, inoculando-as em camundongos imunossuprimidos nude, a fim de verificar se estas podem se tornar mais uma fonte de células-tronco para uso na medicina regenerativa. Por fim, há uma grande diversidade de raças caninas, o que oferece grande variabilidade genética e cujo potencial deve ser explorado.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 AS CÉLULAS-TRONCO E A TERAPIA CELULAR

Nos últimos anos, a terapia celular e as células-tronco adultas (CTA) e embrionárias (CTE) dominaram a mídia e as esperanças dos pacientes portadores de doenças incuráveis sem perspectivas de tratamento eficaz pelos meios convencionais atualmente estabelecidos. As numerosas pesquisas realizadas durante as últimas décadas forneceram informações importantes sobre a morfologia, processos fisiológicos e de desenvolvimento dos tecidos, bem como a formação dos órgãos, manutenção, regeneração e reparo após lesões.

Por definição, células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de auto-renovação ilimitada e potencial de diferenciação que lhes confere um papel primordial e vital durante o processo de desenvolvimento e ao longo da vida (ASAHARA, 2004; MIMEAULT, 2006; TROUNSON, 2006). De acordo com o potencial de diferenciação das células-tronco, são classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes. As totipotentes são as células capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário ou de anexos embrionários, isso é, gerar qualquer tipo celular; as pluripotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, isso é, são as progenitoras de tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), também chamadas de células-tronco embrionárias; as multipotentes ou adultas são células que podem se diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão e com isso possuem plasticidade limitada e, por fim, as oligopotentes ou unipotentes são as progenitoras de um tipo celular (ZHANG et al., 2006).

A seguir veremos uma descrição bem mais detalhada das células-tronco e seus diferentes tipos de acordo com a classificação acima.

4.1.1 Células-Tronco Embrionárias (CTE)

Logo após a fecundação, a célula resultante da fusão do óvulo com o espermatozóide começa a se dividir: uma célula em duas, duas em quatro, quatro em oito e assim por diante. Pelo menos até a fase de oito células, cada uma delas é capaz de se desenvolver em um ser completo e são chamadas de totipotentes. Após 72 horas, o embrião com cerca de 100 células é chamado de blastocisto. As células internas do blastocisto, chamadas de blastômeros, compõem o embrioblasto e vão originar os tecidos que compõem o corpo, sendo chamadas de células-tronco embrionárias pluripotentes. As células externas, chamadas de trofoblásticas, darão origem a placenta e anexos embrionários (MOORE; PERSAUD, 2005). Somente na fase de mórula é que as células são consideradas totipotentes, pois podem dar origem às embrionárias pluripotentes e as células do trofoblasto, que darão origem à placenta e anexos embrionários (MOORE; PERSAUD, 2005).

As CTE foram isoladas pela primeira vez, em 1981, em blastocistos de camundongos, sendo um dos maiores acontecimentos no campo do desenvolvimento biológico (MARTIN, 1981; EVANS, 1989). Contudo, somente em 1998, a equipe do biólogo James Thomson conseguiu isolar células-tronco embrionárias humanas (THOMSON, 1998).

As células-tronco embrionárias isoladas da massa interna do blastocisto possuem uma tendência inerente de se diferenciarem espontaneamente em cultura, tanto que condições específicas de cultivo celular são requeridas para mantê-las no seu estado indiferenciado. Entretanto, nas condições definidas elas são capazes de se proliferarem indefinidamente, mantendo sua capacidade de diferenciação, resultando, assim, em uma fonte potencialmente ilimitada de células (WEISSBERGE; QASIM, 2005).

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de desenvolver métodos para a produção de diferentes tecidos para transplantes a partir de células-tronco embrionárias (BOHELER et al., 2002). Entretanto, convém ressaltar que as CTE não podem ser administradas *in vivo* porque causam a formação de um tumor do tipo teratoma com a formação de tecidos provenientes dos três folhetos embrionários (ecto, meso e endoderme) (HENTZE et al., 2009).

4.1.2 Células-Tronco Adultas (CTA)

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram isoladas inicialmente em 1970, por Friedstein et al. como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblasto *in vitro*. Em 1991, Caplan definiu o termo CTM como sendo uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes a da sua origem. Em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu que: as CTM devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e, devem se diferenciar em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006; SEMEDO et al., 2009; BASSI; AITA; CÂMARA, 2011). As células-tronco adultas, também chamadas de células-tronco mesenquimais são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos (CAPLAN, 2007). As primeiras CTA identificadas foram às precursoras hematopoiéticas provenientes da medula-óssea (TRANS et al., 2003).

4.1.3 Células-Tronco Fetais (CTF)

Com as dificuldades que envolvem a utilização de CTE, devido às questões éticas associadas a estas células, a formação de teratoma e ainda as relações de baixa plasticidade das CTA, há um crescente interesse em outras fontes de células-tronco.

Uma nova classificação recente inclui as CTF, as quais geralmente apresentam características similares com as CTA mesenquimais, porém receberam essa denominação por se encontrarem no período fetal do desenvolvimento embrionário. As CTF podem oferecer algumas vantagens para aplicação terapêuticas em substituição as células-tronco adultas e embrionárias (MARCUS et al., 2008), pois apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2005) e, uma vez que estão na interface materno-fetal, se tornam mais propícias a

transplantes por possuírem uma baixa resposta imunológica (LI, et al., 2005; MIHU et al., 2009).

Além disso, as CTF são uma fonte de células-tronco ainda pouco exploradas, facilmente acessíveis a partir de tecido extra-embriônicos que geralmente são descartados após o nascimento e que podem ser obtidas através da placenta (PAROLINI; CARUSO, 2011), âmnion (URANIO et al., 2011) e córion (FUKUCHI et al., 2004). Além disso, nos últimos anos, tecidos extra-embriônicos têm recebido muita atenção como fontes alternativas de células multipotentes (YEN et al., 2005), pois algumas dessas células-tronco possuem uma capacidade de diferenciação em células específicas como cardiomiócitos, somadas as estabelecidas propriedades de diferenciação em linhagens osteo, adipo e condrogênicas (KIM et al., 2007).

Nosso grupo vem desenvolvendo um grande interesse em investigar células-tronco fetais obtidas a partir de tecidos extraembrionários para sua possível aplicação terapêutica. Um exemplo é o projeto de cultura e caracterização de células do trofoblasto extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo. As TEV são um tipo celular singular, que expressam em sua membrana celular moléculas do antígeno leucocitário humano de classe I, tipo G (HLA-G) e que provavelmente participam na manutenção da gestação impedindo o reconhecimento do feto pela mãe, ao invés de expressarem os genes clássicos do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e antígenos leucocitários humanos de classe I, tipo A (HLA-A) e tipo B (HLA-B) (FERNANDES, 2010).

4.2 CÉLULAS OBTIDAS A PARTIR DA MEMBRANA AMNIÓTICA E A TERAPIA CELULAR

Os primeiros estudos na área médica com membrana amniótica foram feitos com a membrana livre de células, como um curativo natural de superfície para a reconstituição ocular, como no caso de doenças cicatriciais da córnea e conjuntiva (GOMES et al., 1999). Estes transplantes mostraram-se eficazes na reconstrução da superfície ocular, uma vez que a membrana amniótica possui uma combinação única de propriedades, incluindo a facilitação na migração de células epiteliais, o

reforço da adesão celular basal e o incentivo a diferenciação epitelial (SANGWAN et al., 2007).

Em relação às células provenientes da membrana amniótica humana, elas expressam o marcador de pluripotência Oct-4 (ZHAO et al., 2005), marcadores do antígeno principal de histocompatibilidade HLA (MIHU et al., 2009), marcadores de células nervosas como neurofilamentos, proteínas gliais fibrilares e de células progênitoras neurais (ISHII et al., 1999). Miki et al. (2005) comprovaram a capacidade de diferenciação das células derivadas de membrana amniótica de humanos e observou que as células amnióticas possuem um potencial de diferenciação para células das três camadas germinativas *in vitro*: endoderme (fígado e pâncreas), mesoderme (cardiomiócitos) e ectoderme (células neurais). Ainda nesse estudo, o implante das células no membro posterior de camundongos não produziu tumores durante um período de sete meses.

Em estudos experimentais *in vivo*, células-tronco de membrana amniótica humana foram transplantadas em ratos com lesões cerebrais e produziram a melhora da sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (KAKISHITA et al., 2003). Além disso, transplante em ratos imunodeficientes com problemas hepáticos, mostraram reação positiva para albumina após sete dias de transplante celular (SAKURAGAWA et al., 2000). Ainda como terapia celular no trato digestivo, células amnióticas epiteliais humanas foram inoculadas em 40 cães adultos para a reconstrução do ducto biliar danificado, na cirurgia de reconstituição de estenose biliar benigna, observando-se uma camada de endotélio epitelial amniótico no local da inoculação após 6 semanas da cirurgia de reconstituição (ISMAIL et al., 2009). O mesmo autor relata ainda vantagens do uso das células de membrana amniótica humana, por possuírem baixa imunogenicidade, não induzirem reação anti-inflamatória e que para aquisição destas células não é necessário o sacrifício de embriões, evitando as controvérsias atuais associadas ao uso de células-tronco embrionárias.

Anteriormente, Ilancheran et al. (2009) também relataram a plasticidade das células de membrana amniótica humana, com diferenciação em cardiomiócitos, células do fígado, células do pâncreas e neurais, sem apresentar a formação de teratomas após transplantes em camundongos imunodeficientes.

De acordo com estas constatações, a membrana amniótica, assim como células do seu fluido, pode ser considerada como uma nova e conveniente fonte de

células-tronco. Estudos recentes demonstraram a grande capacidade de diferenciação das células-tronco derivadas de membrana amniótica, reafirmando a importância em se estudar a morfologia, o comportamento e a capacidade destas células cada vez mais profundamente, para que em um futuro próximo as mesmas possam ser aplicadas para possíveis terapias (GOMES et al., 1999; LI et al., 2005; KIM et al., 2007; SANGWAN et al., 2007; TAMAGAWA et al., 2007; MARCUS et al., 2008; ISMAIL et al., 2009; MIHU et al., 2009; TODA et al., 2007; PAROLINI et al., 2011).

Em 2011, Parolini et al., afirmaram que o potencial de aplicações clínicas com o uso de células-tronco derivadas da placenta e da membrana amniótica é muito amplo e evolutivo, sendo que suas aplicações clínicas podem atingir uma variedade de doenças, em especial as associadas a processos degenerativos induzidas por processos inflamatórios e fibróticos .

Em relação a células de membrana amniótica provenientes de animais, não existem muitos estudos realizados. Em 2008 Marcus et al., exploraram a membrana amniótica de ratos e observaram *in vitro* a diferenciação para células adiposas, ósseas e hepáticas, sendo as mesmas cultivadas por 20 passagens sem a perda de plasticidade. Estes autores também observaram a diferenciação *in vitro* em tipos de células que representam todas as três camadas embrionárias, incluindo células neurais. *In vivo* não houve evidências de rejeição imunológica ou formação tumoral (MARCUS et al., 2008).

Uranio et al. em 2011 citaram que nos cães, as células-tronco do fluido amniótico, do cordão umbilical e da membrana amniótica, expressaram o marcador embrionário Oct-4 e três marcadores mesenquimais (CD44, CD184 e CD29). Todas as células apresentavam morfologia semelhante a um fibroblasto e com alto potencial proliferativo *in vitro*, dobrando sua quantidade a cada passagem. Além disso, quando submetidas a meios de cultivo específicos, todas as três linhagens de células se diferenciavam em osteócitos, condrócitos e adipócitos, condizendo com o perfil característico de CTM. Entretanto, os autores não realizaram nenhum estudo *in vivo* (URANIO et al., 2011).

4.3. A MEMBRANA AMNIÓTICA E SUA ORIGEM EMBRIONÁRIA

A membrana amniótica (MA) tem origem a partir do ectoderma embrionário por um dobramento do folheto e rodeia o embrião/feto como uma segunda membrana avascular, sendo que a primeira, o córion, é uma membrana mais externa, mais espessa e vascularizada. As duas juntas formam a membrana corio-amniônica, popularmente conhecida como “bolsa”, rompida na hora do parto (MOORE; PERSAUD, 2005).

A função atribuída a MA é de uma bolsa membranosa, que mantém o conceito dentro do líquido amniótico impedindo sua dessecação e funcionando como um amortecedor que protege o feto de impactos e permite que o mesmo cresça sem que haja distorção ou pressão de sua estrutura (OKAZAKI et al., 1981).

Histologicamente, a MA do embrião no início do desenvolvimento consiste de uma camada interna de células epiteliais cubóides, uma membrana basal espessa e uma avascular com células mesenquimais. Não possui nervos, músculos ou vasos linfáticos e obtém sua nutrição e oxigênio a partir do fluido coriônico e do líquido amniótico (MOORE; PERSAUD, 2005).

No cão, o período normal de gestação é de 58-64 dias, sendo muito comum este período ser 63 dias (JACKSON, 2005). A placenta canina é denominada de endotélio-corial, sendo observadas quatro camadas entre o feto e a mãe: o endotélio materno, o córion, o mesênquima e o endotélio fetal (ROBERTS, 1986). Em função da disposição dessas camadas ao redor do feto, esse tipo de placenta é denominado zonária. Além disso, a placenta envolve completamente o feto, sendo que nas suas margens são observados os hematomas marginais de coloração esverdeada (MIGLINO et al., 2006) (Figura 1). Em Ambrósio et al. (2004), a placenta canina é classificada como endotéliocorial no terço inicial e final de gestação e como hemocorial, no terço intermediário gestacional. Assim como em humanos, a cavidade amniótica se forma a partir da migração de células da ectoderme, por um pregueamento revestido por células denominadas amnioblastos. Forma-se então uma pequena cavidade, a amniocèle, que aos poucos passa a ser preenchida com líquido secretado pelos amnioblastos. Assim, tem-se o início da formação do líquido amniótico que preencherá essa cavidade. À medida que a embriogênese progride ocorre o dobramento do embrião, formando um “c”. A MA acompanha esse

dobramento, sendo assim reveste totalmente o embrião/feto até o final da gestação (MOORE; PERSAUD, 2005). Além disso, a quantidade de líquido amniótico também aumenta progressivamente, provindo a partir da difusão do sangue que vem das trocas placentárias (ALMEIDA, 2009).

Figura 1 – O feto e seus anexos

Legenda: A) Desenho de embrião de cão com 30 dias de gestação, mostrando a posição do saco vitelino sob o embrião e o saco alantóide, limitado por dois anéis hematoma localizados perto das pontas alantóides. B) Conceito dentro do saco gestacional em 45 dias da gravidez. Note a presença do líquido alantóico amarelado e substância, muito turva (setas) brilhando através da corioamniótico. Cinta placentária com os seus dois anéis verdes de hematoma marginal. C) Depois de abrir o saco alantóide e revertendo um pólo, o saco vitelino está localizado ventralmente para o feto, com associação para o umbigo (45 dias de gestação). A cinta placentária e os hematomas marginais também são visíveis a partir do interior ou coriônica superfície. D) Numerosos vasos sanguíneos alantóide são visíveis na parte polar do alantóide do cão (45 dias de gestação). E) Ampliação da subparte de 'C' e vasos do saco vitelino originados a partir do terceiro meio do cordão umbilical (*).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Para a coleta das membranas amnióticas foram utilizadas cadelas prenhas sem raça definida (SRD) provenientes de campanha de castração no Centro de Zoonoses da Cidade de São Paulo (CZSP) e uma *Golden Retriever* portadora do gene da distrofia muscular (*Golden Retriever Muscular Dystrophy* – GRMD) provenientes do canil da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) submetidas à histerectomia.

Para a avaliação do potencial carcinogênico foram utilizados camundongos imunossuprimidos, *nude* provenientes do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/USP).

Durante o período experimental, os camundongos imunossuprimidos *nude*, permaneceram alojados em caixas de polipropileno sendo no máximo 5 animais por caixa, providas de bebedouro e comedouro; mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22-24°C) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro); foi fornecida, diariamente, ração comercial e água *ad libitum*.

5.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

As cadelas prenhas provenientes de campanha de castração foram submetidas ao procedimento cirúrgico de histerectomia, e tiveram seu útero contendo os fetos removidos em condições assépticas em centro-cirúrgico na FMVZ-USP ou no CZSP.

Após a remoção, os úteros gravídicos em condições assépticas foram transportados em tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5 % de antibiótico (200U/ml de penicilina e 200 µg/ml de estreptomicina - Invitrogen, CA, USA), cuidadosamente em gelo até o Laboratório de Células-Tronco (LCT) da FMVZ-USP.

Para a coleta das membranas, o útero foi colocado em fluxo laminar e uma incisão foi realizada. Tendo assim, acesso aos fetos e, conseqüentemente uma remoção cuidadosa da membrana amniótica foi realizada.

Neste projeto, duas coletas foram realizadas: a primeira proveniente de um útero de 56 dias de gestação onde os fetos foram considerados únicos e a coleta da membrana foi realizada separadamente. Esta coleta foi chamada de A8. Na segunda coleta, realizada com 35 dias de gestação, as membranas amnióticas de todos os fetos provenientes desta gestação foram retiradas e colocadas em uma mesma placa de cultura e, portanto, esta cultura é um pool das membranas de todos os fetos e foi chamada de 35d.

Após a coleta, a membrana amniótica foi lavada com PBS contendo 5% de antibiótico por 5 a 6 vezes.

Em seguida, a membrana foi fragmentada em pequenos pedaços e transferida para uma placa de seis orifícios contendo meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* baixa glicose (DMEM – LGC Biotecnologia, SP, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina. Esse meio foi chamado de DMEM suplementado ou ainda, DMEMs.

Após aproximadamente 24 horas da coleta, os tecidos aderiram na placa e as células começaram a se desprender ao redor do tecido iniciando a cultura de células por explante.

Quando as células atingiam semi-confluência elas foram submetidas ao repique celular. Para tanto, foram lavadas com PBS e posteriormente 0,5 ml de tripsina 0,25% (LGC) foram adicionados. Passado o tempo de incubação de 5 minutos, as células foram levadas ao microscópio óptico para observação do descolamento celular da superfície da placa. Após o descolamento celular total, 2 ml de DMEMs foram adicionados para inativação da tripsina.

Neste momento, a quantidade final de células foi dividida em duas garrafas e 4 ml de meio DMEMs foram adicionados em cada e as células foram mantidas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C.

Dessa forma, as células foram expandidas para os experimentos seguintes e o repique celular foi realizado conforme necessidade seguindo o protocolo descrito acima.

5.3 ANÁLISE DA CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS PROVENIENTES DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.

O procedimento de congelamento foi iniciado com a lavagem das células com PBS, seguida de tripsinização. Após tripsinização, as células foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm e o precipitado formado foi ressuspenso em solução de congelamento contendo: 60% de SFB (Invitrogen), 30% de DMEM (LGC) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - LGC). Em seguida, os tubos foram colocados por 24h em freezer -80°C e posteriormente transferidos ao nitrogênio líquido. Após 30 dias do congelamento, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria e colocadas em cultivo com o objetivo de analisar se as mesmas conservam suas características após congelamento.

5.4 ANÁLISE GENÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS PROVENIENTES DA GESTAÇÃO DE CADELA PORTADORA DE DISTROFIA MUSCULAR-GRMD (GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY)

Como uma das cadelas doadoras desse projeto era portadora de GRMD houve a necessidade de análise genética dessas células através de PCR seguida de digestão com a enzima de restrição Sau961 buscando a região do gene da distrofina, que contém a mutação para o caso dos portadores ou distróficos.

Para tanto, o DNA genômico das células-tronco derivadas de membrana amniótica foi extraído utilizando o kit para extração de DNA, *GFX DNA Purification kit* (GE Health Care, Piscataway, NJ), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA obtido foi utilizado como fita molde para a reação de polimerização em cadeia (PCR) e os oligonucleotídeos sense GF2: 5'-CTT AAG GAA TGA TGG GCA TGG G- 3' e anti-sense GR2: 5'-ATG CAT AGT TTC TCT ATC ATG C-3' foram utilizados. Nesta reação, esperamos um fragmento de 310 pb, representado a região do gene da distrofina, que contém a mutação para o caso dos portadores ou distróficos.

O produto amplificado foi então submetido à digestão enzimática com a enzima de restrição Sau961 em tampão do fabricante da enzima por 1 h a 37°C. Nos animais normais após digestão esperamos uma banda de aproximadamente 310 pb já, nos afetados dois fragmentos de DNA, um de 240 e outro de 70 pb; e nos portadores três fragmentos de DNA, o de 310 pb referente ao alelo normal e os de 240 e 70 pb referentes ao alelo mutado.

Os produtos da digestão foram submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose 2% (Invitrogen) preparado em TAE (Invitrogen) e posteriormente, incubados com solução contendo brometo de etídeo para visualização, sob a incidência de luz ultravioleta (UV).

5.5 TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS DE MEMBRANA AMINIÓTICA DOS CÃES COM VETORES RETROVIRAIS CONTENDO O GENE REPÓRTER LACZ

Com o objetivo de facilitar o monitoramento dessas células, as mesmas foram transduzidas com o vetor retroviral pLNPOZ que contém o gene repórter LacZ sob o controle da região UTR do Polivírus (PO). Este vetor foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Willian Osborne da Universidade de Washington (Seattle, WA, USA).

O vetor retroviral utilizado neste projeto foi o do vírus *Moloney Murine Leukemia Virus* (MoMLV) que pertence a família *Retroviridae* e a sub-família *Oncovirinae*. É um vírus de RNA fita simples e seu genoma é composto basicamente pelas seguintes regiões: a primeira contém os LTR (*Long Terminal Repeats*), um no terminal 5' e outro no terminal 3' ladeando todo o genoma viral. No terminal 5', o LTR funciona como promotor e *enhancer* para a transcrição dos genes virais adjacentes, e no terminal 3', funciona como finalizador transcricional. A segunda região é denominada ψ (psi) e ela contém o sinal para o empacotamento do genoma viral. Esta região parece se estender até o primeiro gene viral *gag*, compartilhando alguns nucleotídeos com o mesmo (BENDER et al., 1987). A terceira região compreende os três genes virais *gag*, *pol* e *env* que codificam as proteínas da cápside viral, a transcriptase reversa e as proteínas que fazem parte do envelope viral, respectivamente (Figura 2).

Para a produção dos vetores retrovirais recombinantes, os três genes estruturais foram removidos, dando espaço para a inserção do gene de interesse, que neste projeto foi o LacZ. Apenas os LTR 5' e 3' e a região ψ foram preservados (Beltrão-Braga et al, 2002).

Nestes modelos, para que haja o empacotamento e produção de progênie viral recombinante, foram usadas células empacotadoras de vírus recombinantes. Estas células são geneticamente modificadas de forma a carregar os genes *gag*, *pol* e *env*, e assim fornecer as proteínas necessárias para a produção viral (MILLER, 1990). Ao mesmo tempo, essas células são desprovidas dos LTR e do sinal ψ de forma a evitar eventos de recombinação gerando vírus selvagens. Assim, os

retrovírus recombinantes foram produzidos a partir da transfecção do vetor retroviral na forma plasmidial nas células empacotadoras (Figura 2). Observe ainda na Figura 2 que os vírus recombinantes gerados pelas células empacotadoras podem infectar as células alvos uma única vez, pois os mesmos não carregam genes virais necessários à formação de novos vírus.

Para a infecção das células alvo pelo retrovírus recombinantes derivados do MoMLV, é necessário que essas células se encontrem dentro do processo de divisão celular, caso contrário não há integração estável do DNA retroviral dentro do genoma celular (ANDREADIS et al., 1997).

Figura 2 - Esquema de produção dos vírus recombinantes e das células-tronco de membrana amniótica carregando o gene LacZ

Fonte: Beltrão-Braga, 2000

Legenda - O plasmídeo carregando o gene de interesse, LacZ foi transfectado na célula empacotadora de vírus, produzindo os vírus recombinantes que carregam o gene de interesse. Os retrovírus recombinantes formados foram utilizados para transduzir as células-tronco de membrana amniótica de cão.

5.5.1 Obtenção das células produtoras de vírus que carregam o gene LacZ

Os fibroblastos NIH3T3, células empacotadoras de vírus ecotrópicos PE501 e anfotrópicos PT67 também foram gentilmente cedidos pelo Dr. Willian Osborne.

Os experimentos de transfecção e transdução para obtenção dos vírus recombinantes seguiram um protocolo de 5 dias envolvendo duas células empacotadoras uma ectotrópica (PE501) e outra anfotrópica (PT67), mantendo-se um intervalo de 24 horas entre cada passo:

1º dia – Plaqueamento das células empacotadoras ectotrópica PE501

As células empacotadoras ectotrópicas PE501 foram semeadas em placas de cultura de 60 mm de diâmetro a uma densidade de 5×10^5 células em 4 ml de meio DMEM suplementado com 10 % de SFB (Invitrogen), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 200 U/ml de penicilina e 200 µg/ml de estreptomicina (Invitrogen). Esse meio suplementado foi denominado DMEM completo ou DMEMc. As células foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

2º dia – Transfecção das células empacotadoras com o vetor retroviral carregando o gene LacZ

Neste dia foi realizada a transfecção das células PE501 com o vetor retroviral carregando o gene LacZ pelo método de co-precipitação com fosfato de cálcio.

Para isso, duas soluções foram preparadas: a solução A contendo 10 µg DNA, 25 µL de CaCl₂ 2M e água deionizada para um volume final de 200 µL e a solução B ou tampão de precipitação contendo 200 µl de HEPES, 500 mM pH 7,1, 250 µl de NaCl 2 M, 20 µL de Na₂HPO₄, 150 mM pH 7,0 e água deionizada para um volume final para 2 ml.

A seguir, 200 µL da solução A foram gotejados sobre apenas 200 µl de solução B sob agitação suave e constante. Essa solução A+B foi deixada em repouso durante 30 minutos, até se observar uma precipitação levemente leitosa.

Por fim, o meio de cultura das células PE501 foi substituído por novo e a solução foi gotejada e espalhada lenta e homogeneamente sobre as células PE501. Após 4h de incubação, o meio das células foi removido e substituído por novo. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

3º dia – Plaqueamento celular das células empacotadoras anfotrópicas PT67

Aproximadamente 1×10^5 células PT67 foram semeadas em duas placas de cultura de 60mm de diâmetro em 4 ml de meio DMEMc.

Neste mesmo dia, o meio de cultura das células PE501 transfectadas no dia anterior foi substituído por 4 ml de meio DMEMc novo.

4º dia - Infecção das células empacotadoras anfotrópicas PT67

O sobrenadante viral das células PE501 transfectadas no dia 2 foi cuidadosamente retirado e centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto a 4°C, a fim de remover possíveis restos celulares. O sobrenadante obtido neste passo foi usado para infectar as células anfotrópicas PA317. Para tanto, o meio das culturas de PA317 foi substituído por novo meio DMEMc contendo 8 µg/ml de *polybrene* e iniciou-se o protocolo de infecção. Uma das placas foi infectada com 100 µl de sobrenadante viral e a outra com 1 ml.

5º dia – Manutenção e seleção das células empacotadoras com geneticina

As células PA317 infectadas no dia anterior, tiveram o meio aspirado, foram lavadas rapidamente com 1 ml de PBS e incubadas com tripsina 0,25%. A suspensão de células foi dividida e semeada 1:10 em uma nova placa de 60 mm contendo 4 ml de meio DMEMc e 500 µg/ml de geneticina ativa e 9:10 em uma placa de 100 mm contendo 8 ml de meio DMEMc e 500 µg/ml de geneticina ativa para a seleção das células infectadas. O meio de cultura foi trocado juntamente com a geneticina a cada 3-5 dias de seleção.

As células empacotadoras PT67 transduzidas com o vetor pLNPoZ que carrega o gene LacZ (PT67/LNPoZ) foram mantidas por aproximadamente 10 a 12 dias em meio DMEMc contendo 500 µg/ml de geneticina e não foram submetidas ao isolamento de clones.

5.5.2 Obtenção das células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães carregando o gene repórter LacZ

Os experimentos de infecção das células-tronco de membrana amniótica seguiram um protocolo de cinco dias, mantendo-se um intervalo de 24 horas entre cada passo:

1º dia – Plaqueamento dos vírus anfotrópicos carregando o gene repórter LacZ (PT67/LNPoZ)

Aproximadamente um milhão de células empacotadoras anfotrópicas, PT67/LNPoZ, passagem 3 ou 4, foram semeados em placas de cultura de 60 mm de diâmetro em 4 ml de meio DMEMc.

2º dia - Plaqueamento das células-tronco de membrana amniótica de cães

O meio de cultura das células PT67/LNPoZ foi aspirado e substituído por meio novo. E ainda, as células-tronco de membrana amniótica foram semeadas em placas de cultura de tecidos de 60 mm de diâmetro a uma densidade de 5×10^5 células.

3º dia – Transdução das células-tronco de membrana amniótica

O sobrenadante de cultura dos clones de células produtoras de vírus PT67/LNPoZ foi homogeneizado, coletado e centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente.

O meio de cultura das células-tronco de membrana amniótica foi substituído por meio de cultura novo contendo 8 µg/ml de *polybrene* e um mililitro da suspensão viral obtida após centrifugação foi usado para infectar cada placa de células-tronco.

4º dia - Manutenção:

O meio de cultura das células-tronco transduzidas no dia 3 foi aspirado e substituído por meio novo.

5º dia - Expansão e seleção

As células-tronco foram transferidas para uma placa de cultura de 100 mm, contendo 10 ml de meio de cultura e 500 mg/ml de geneticina ativa. O meio de cultura, contendo geneticina foi trocado a cada 4-5 dias.

A pressão seletiva da geneticina foi mantida durante todo o processo de amplificação das células-tronco transduzidas e os clones foram selecionados de acordo com a expressão do gene LacZ como descrito abaixo. Apenas os clones de maior expressão do gene foram utilizados.

5.5.3 Análise da expressão do gene exógeno LacZ nas células-tronco derivadas da membrana amniótica

Para verificar a expressão de β-galactosidase nas células-tronco transduzidas com o vetor LNPOZ, 1 x 10⁶ células foram semeadas em placas de 60 mm e após, 24 a 48 h do plaqueamento, coradas com solução de X-gal.

Para a coloração, o meio de cultura foi removido e as células foram fixadas com uma solução de 0,5% de glutaraldeído durante 15 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi removida e as células lavadas por três vezes com PBS em intervalos de 5 minutos cada. A solução de X-gal contendo 1 mg/ml de X-gal, 5 mM de K₄Fe(CN)₆, 5 mM de K₃Fe(CN)₆ e 1 mM de MgCl₂ foi adicionada às

células e incubadas a 37°C por 1-6 horas. As células coradas foram visualizadas em microscópio de contraste de fase.

Além disso, as células empacotadores ectotrópicas PE501 transfectadas com o vetor pLNPOZ foram também coradas com X-gal para avaliação da eficiência da transfecção.

5.6 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

A caracterização biológica das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos foram feitas com as células 35d e A8/LNPOZ provenientes das duas coletas realizadas neste trabalho e constituiu em caracterização morfológica (microscopia de luz, colorações de HE e toluidina e microscopia eletrônica de varredura e transmissão), celular (curva de crescimento, análise de viabilidade, MTT, imunofenotipagem), molecular (RT-PCR) e funcional (diferenciações adipo, osteo e condrogênica).

5.6.1 Caracterização Morfológica

A morfologia das células 35d e A8/LNPOZ foram visualizadas diariamente em microscopia de luz sem colorações ou após colorações com HE e azul de toluidina e por microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

5.6.1.1 Análise morfológica das células-tronco de membrana amniótica em microscopia de luz

As células 35d e A8/LNPOZ em cultivo foram submetidas à análise morfológica por microscopia de luz, em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100 - Japão) e fotografadas diariamente.

Desta forma, todo o período de desprendimento e expansão celular foi acompanhado.

5.6.1.2 Análise morfológica das células por coloração de HE e azul de toluidina

As células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ em cultivo foram submetidas às colorações de azul de toluidina e HE.

5.6.1.2.1 *Coloração de Azul de Toluidina*

A coloração de azul de toluidina foi realizada para analisar a morfologia das células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 35 mm, fixadas com paraformaldeído 4% (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso do fixador e coradas com azul de toluidina (Merck) durante 10 minutos. Passado esse período de incubação, o corante foi retirado e o poço lavado com PBS. As células foram analisadas através de microscopia de luz e a morfologia observada registrada fotograficamente em microscópio óptico invertido (Olympus BX 50 F4, Tóquio, Japão).

5.6.1.2.2 Coloração de Hematoxilina-Eosina

Ainda visando analisar a morfologia destas células, as mesmas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina. Para isso, as células foram cultivadas em placa de 35 mm. Após as 24 horas de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Merck) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para a retirada do excesso de fixador, coradas com hematoxilina (Merck) por 10 minutos e novamente lavadas com PBS. Por fim, as células foram coradas pela eosina (Merck) por 3 minutos e novamente lavadas com PBS para a retirada do excesso de corante.

As células foram analisadas através de microscopia de luz e a morfologia observada registrada fotograficamente em microscópio invertido (Olympus BX 50 F4).

5.6.1.3 Microscopia eletrônica de varredura de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos

As células 35d e A8/LNPOZ foram cultivadas em placas de 35 mm de diâmetro até atingirem confluência. Após atingirem a confluência, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas com PBS e submetidas a fixação com 3% de glutaraldeído em PBS (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Passado o tempo de fixação necessário que variam de 2 às 24h, as placas foram lavadas em PBS e água destilada, pós-fixadas em tetróxido de ósmio (1%) e desidratadas em série gradual de etanóis. Em seguida, foi realizada a secagem do material em aparelho de ponto crítico usando CO₂ e por fim, as placas receberam o recobrimento metálico com ouro por *sputtering*. Dessa forma, o processamento foi finalizado e o material foi submetido à análise no microscópio eletrônico de varredura (Leo 435 VP – Zeiss, Germany).

5.6.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos

As células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPOZ foram semeadas em placas de 35 mm até atingirem confluência e, então foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% por uma hora (Sigma). Após fixação, as células foram lavadas duas vezes com solução de PBS por 5 minutos a 1000 rpm cada e fixadas com ósmio 1% (Polysciences, Inc., USA) a 4°C por uma hora. Após este período, as células foram submetidas à desidratação em série crescente de alcoóis (50°, 70°, 95°, 100°).

Em seguida, a amostra foi submetida a três banhos antes da inclusão, utilizando: óxido de propileno por duas vezes de 10 minutos; óxido de propileno, adicionado de resina *sppur* na proporção de 1:1 por 3 horas e por último, resina *sppur* pura por 5 horas. Após estes banhos, as células incluídas em resina *sppur* foram incubadas a 60°C por 72 horas, para a polimerização da resina.

Finalizando o processamento, a resina foi trocada por uma nova e deixada em estufa a 37°C, por uma hora, com tampa aberta para evaporação dos resíduos de óxido de propileno que ainda estavam presentes na amostra. As amostras foram emblocadas. Os cortes ultrafinos foram realizados no ultra micrótomo e alguns foram selecionados e submetidos à coloração de HE e por fim, analisadas em microscópio de transmissão (FEI Morgagni 268d – FEI, Oregon, USA).

5.6.2 Caracterização celular

5.6.2.1 Curva de crescimento das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos

Para avaliar a velocidade de crescimento das culturas celulares 35d e A8/LNPOZ, o número de células foi contado numa câmara de Neubauer após a primeira tripsinização a cada 24 e 72 horas.

5.6.2.2 Análise da viabilidade celular das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos

Este ensaio teve a finalidade de analisar a quantidade de células vivas obtidas durante as passagens das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LNPOZ no período de 33 dias utilizando o corante celular, azul de trypan (Invitrogen). O azul de trypan é um corante que entra no citoplasma das células mortas tornando as células azuis quando observadas no microscópio.

Para isso, 50 µl de meio com células mais 50 µl de azul de trypan foram cuidadosamente homogeneizados e então aplicados em câmara de Neubauer para a análise e contagem das células através de um microscópio invertido (Nikon Eclipse TS 100).

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de linha utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

5.6.2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, como descrito por Carmicheal et al. (1987) consiste na redução do MTT (3-[(4,5- *dimethylthiazol-2-yl*)-2,5- *diphenyltetrazolium bromide*] - Sigma), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta. O formazan uma vez precipitado a 1.000 rpm por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofotometria a 550 nm.

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ. Para tanto, aproximadamente 1 ou 5 x 10³ células foram plaqueadas em placas de 96 orifícios em um volume de 100 µL/poço para cada dia de experimento.

Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 100 µL/poço e adicionou-se 100µl de solução de MTT (1 ml de MTT 5

mg/ml em 10 ml meio de cultivo contendo 1% de SFB). Essa mistura foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o formazan foi precipitado a 1000 rpm durante 10 min, solubilizado em 50 µL de DMSO (LGC). Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (M-Quant – Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de barra utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

5.6.2.4 Análise imunocitoquímica das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos

As células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães (35d e A8/LNPOZ) foram cultivadas em placas de 24 orifícios sob a lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 80%. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e fixadas em 4 % de paraformaldeído durante 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas com tampão de lavagem contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, e 0,05% de Tween-20 por 3 vezes de 5 minutos cada.

Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ao final da permeabilização, as células foram lavadas novamente com tampão de lavagem por 3 vezes de 5 minutos cada lavagem e submetidas ao bloqueio em PBS contendo 5 % de soro albumina bovino (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-Oct4, anti-vimentina, anti-CD105 anti-PCNA3, anti-CD34, anti-CD45, anti-nestina, anti-p53 e anti-c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA – concentração 200 µg/ml), diluídos 1:100 em câmara úmida por 16 horas a 4°C. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem e anticorpos secundários diluídos 1:1000 marcados com FITC (Santa Cruz) foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as células foram coradas com DAPI (1 mg/ml) diluída 1:1000 durante 10 min a temperatura ambiente e

lavadas com PBS 3 vezes para remoção do excesso do corante. As lâminas foram montadas em meio de montagem DPX (Sigma) e a imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80i e no programa *NIS Elements* version 3.22 (Nikon).

5.6.3 Caracterização molecular através de RT-PCR

Para a caracterização molecular de RT-PCR, o meio das células 35d e A8/LNPOZ foram removidos e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Após remoção total do PBS, 1 ml de Trizol foi adicionado e as células foram homogeneizadas nas placas e transferidas para tubos de microcentrifuga onde adicionou-se 0,5 ml de clorofórmio. Após gentil homogeneização, as células foram centrifugadas a 12000 x g durante 15 min a 4 °C.

Em seguida, a fase incolor obtida após a centrifugação foi cuidadosamente retirada e 0,5 ml de álcool isopropílico foram adicionados para a precipitação do RNA. Após homogeneização, o conteúdo foi centrifugado a 12000 x g durante 10 min a 4°C. O precipitado incolor obtido foi lavado com etanol 70 %, preparado em água DEPC para evitar contaminação, e novamente centrifugado a 7500 x g durante 5 min a 4 °C.

Posteriormente o etanol foi removido e o precipitado secou ao ar livre durante aproximadamente 10 minutos. Após secagem o RNA foi ressuscitado de acordo com o tamanho de seu precipitado em água DEPC. Dessa forma, o RNA obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídeo para visualização da qualidade do RNA. Em paralelo, o RNA foi dosado por espectrofotometria utilizando o nanofotômetro (Implen, CA, USA) e posteriormente utilizado na síntese do cDNA.

A síntese de cDNA, uma solução contendo 0,25 µg de RNA, oligo dT e água foi aquecida durante 65°C durante 5 minutos. Após este procedimento, as amostras foram colocadas no gelo e adicionou-se tampão da enzima, Ribolock RNase, dNTPs e a enzima RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas Life Science, Amherst, NY, EUA) para a síntese do cDNA seguindo as instruções do fabricante. Esta mistura foi então submetida a uma temperatura de 42°C durante 1 h e

posteriormente 70°C durante 10 min. O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, corado com brometo de etídeo para visualização e posteriormente armazenado em – 20°C até a sua utilização.

Após síntese e análise os cDNAs foram utilizados como fita molde na reação de PCR, para tanto, misturou-se 1 µl cDNA, 0,2 µM de oligonucleotídeos sense e anti-sense que anelam nos genes de interesse (Quadro 1), 0,2 µM dNTPs, MgCl₂ 1,5 mM, tampão da enzima e 1U de Taq DNA Polymerase (5U/µl) (Fermentas Life Science) e água deionizada para um volume final de 25 µl. Esta mistura foi colocada em um termociclador e a reação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo a 94° C por 4 min seguindo 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura: 94° C por 1 min para desnaturação, 60° C por 1min para anelamento e 72° C por 1 min para polimerização e 1 ciclo extra de 10 min a 72° C para a extensão final.

Aproximadamente 10 % do produto desta reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídeo para visualização em transiluminador UV. Marcador de peso molecular, *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* foram utilizados para confirmar o tamanho esperado dos fragmentos.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR

Gene	Sequência	TA	Produto
Oct3/4	hOct4-S: 5'GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG 3' hOct4-AS: 5'CTTCCCTCCAACCAAGTTGCCCCAAAC 3'	56 °C	120 pb
Vimentina	hVimentin-S: 5' AAGCAGGAGTCCACTGAGTACC 3' hVimentin-AS: GAA GGTGACGAGCCATTTCC 3'	56° C	204 pb
CD105 (SH2)	hCD105-S: TCT GGA CCA CTG GAG AAT AC hCD105-AS: GAG GCA TGA AGT GAG ACA AT	56° C	171 pb
CD73 (SH3)	hCD73-S- ACA CGG CAT TAG CTG TTA TT hCD73-AS- AAG TAT TTG TTC TTT GGG CA	56° C	391 pb
GAPDH	hGAPDH-S: 5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' hGAPDH-AS: 5 'TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	56° C	463 pb

Legenda: Oligonucleotídeos utilizados na análise molecular por RT-PCR das células-tronco fetais de membrana amniótica. TA: Temperatura de anelamento. Em todas as reações água foram usadas como controle das reações.

5.6.4 Caracterização funcional

As células-troncos derivadas da membrana amniótica de fetos caninos (35d e A8/LNPOZ) foram submetidas à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.

5.6.4.1 Diferenciações adipogênica e osteogênica

Aproximadamente 40.000 células/ml (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5.000 células/ml (controle) foram cultivadas em placas de 24 poços. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo ou quando as células atingiam confluência em torno de 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 1 ml de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) ou somente o meio α -MEM (LGC) acrescido de 7,5% SFB (Invitrogen) no controle. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, até a diferenciação celular e monitoradas por microscopia invertida.

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o α -MEM 15% SBF, suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil), 10 μ g/ml de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich) e para os osteócitos o α -MEM 7,5% SBF suplementado com 0,1 μ M de dexametasona (Decadron injetável), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

Além da microscopia de contraste de fase ao final, as células (controle e teste) foram submetidas a diferentes colorações de acordo com o tecido padrão esperado.

As células diferenciadas em adipócitos, osteócitos e seus controles após aproximadamente 21 dias tiveram seu meio removido e foram lavadas com PBS. Após lavagens, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas com PBS 3 x e seguiram para o protocolo de coloração neste caso o procedimento difere para cada um.

As células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixadas e novamente lavadas com álcool isopropílico a 60% e em seguida o corante oil red (0,36% de *oil red* em álcool isopropílico a 60%) foi adicionado. Após 20 min de incubação a temperatura ambiente o corante foi removido e as células foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a remoção as lâminas foram montadas com glicerol e imediatamente analisadas em microscópio invertido Olympus BX50F4 uma vez que, o rompimento dos vacúolos após coloração é muito rápido.

As células que foram diferenciadas em osteócitos foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas com PBS para remoção do excesso de paraformaldeído e coradas com 40 mM de *Alizarin Red S* em Tris pH 4,1 (*Sigma*). Passado 20 min da incubação, as células foram lavadas com água para a retirada do excesso de corante, essa lavagem ocorreu até não haver mais precipitado visível. Em seguida, as lâminas foram montadas com Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e levadas à análise em microscópio invertido Olympus BX50F4.

5.6.4.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada utilizando o kit STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen).

Primeiramente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente um milhão de células foram ressuspensas em 2 ml de PBS. Em seguida as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em 2 ml do meio de diferenciação do kit STEMPRO *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen) preparado seguindo as instruções do fabricante.

As células foram novamente centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos e o botão celular foi formado, então o tubo foi colocado cuidadosamente com tampa semi-aberta na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de no mínimo 21 dias.

Passado o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas em formol tamponado a 10% durante 2h. Em seguida, elas foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool 50,70,90%, seguidos de 3 banhos a

100% com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol 100% com duração de 5 a 10 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast.

Após inclusão, cortes de 3-4 μM foram realizados em micrótomo e colocados sobre lâminas silanizadas durante aproximadamente 12 h com o objetivo de escorrer o excesso de paraplast e assim, fixar o corte. Ao final, as amostras foram coradas com HE e Tricoma de Masson e analisadas em microscópio invertido Olympus BX50F4.

5.7 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

5.7.1 Inoculação das células 35d e A8/LNPOZ nos camundongos imunossuprimidos (*nude*)

As células obtidas foram submetidas à avaliação do potencial carcinogênico em camundongos imunossuprimidos (*nude*). Para tanto, 1×10^6 células foram aplicadas via intramuscular no bíceps femoral direito, peritônio ou via subcutânea na região de coluna cervical nos camundongos. Primeiramente, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm com PBS para retirada dos resíduos de meio de cultivo. Em seguida, as células foram ressuspensas novamente centrifugadas e o precipitado foi ressuspendido para contagem das células. Ao final, aproximadamente 1×10^6 células foram ressuspensas em 30 μl de solução fisiológica e aplicadas com auxílio de uma seringa de insulina.

5.7.2 Avaliação macroscópica da formação tumoral

A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante oito semanas e uma vez por semana verificou-se a formação tumoral.

Fotos macroscópicas dos nódulos formados após inoculação das células-tronco 35d e A8/LNPOZ foram tiradas por máquina fotográfica Canyon®, semi-profissional.

Após a formação tumoral, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em pesquisa e todas as amostras de tecidos com característica tumoral foram coletadas e fixadas. Além dos nódulos foram coletados e fixados também coração, pulmão, cérebro, rins e músculos para análises histopatológicas através da coloração de HE entre outras.

5.7.3 Avaliação microscópica da formação tumoral

O processamento dos tumores e as análises histológicas foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. Paulo César Maiorka no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

Os tecidos destinados a análises histológicas foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e as amostras foram submetidas aos protocolos rotineiros de inclusão em paraplast e coradas através das técnicas rotineiras de HE (WALLINGTON, 1972).

As fotografias foram tiradas no aparelho Nikon Eclipse E200 com sistema de captura BEL EURISKO (Nikon).

5.7.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão do Nódulo Formado Após Inoculação das células nos camundongos imunossuprimidos

Os fragmentos dos nódulos extraídos dos camundongos após a injeção das células 35d e A8/LNPOZ foram previamente fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2. Ao término da fixação o material foi lavado em tampão fosfato de sódio a 0,1M, pH 7,4 por 3 vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato o

material foi desidratado em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100% e lavados em óxido de propileno.

Após um período de aproximadamente 16 horas, os fragmentos dos nódulos permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido propileno e resina. Na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura e passou por uma nova incubação de 4 a 5 horas. Uma vez incluídos, permaneceram em estufa a 69°C por 72 horas para consolidar a polimerização da resina.

Cortes semi-finos de 1µm de espessura foram realizados em ultramicrotomo (Ultracut R, Leica Microsystems, Germany) e submetidos a uma solução quente de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio de luz.

Os cortes ultrafinos de cerca de 60 nm de espessura foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e por citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10 minutos.

As observações e eletromicrografias subcelulares foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão Morgagni 268D (FEI Company, The Netherlands).

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

A primeira coleta das células-fetais de membrana amniótica ocorreu em uma cadela portadora não afetada do gene da distrofia muscular (*GRMD*), apresentando idade gestacional de 56 dias. Nesta coleta foram obtidos seis fetos que foram nomeados de A6, A7, A8, A9, A10 e A11. Após análise genética, apenas o feto A8 foi utilizado neste trabalho. Dessa forma, as células provenientes desta coleta foram chamadas de A8.

A segunda coleta ocorreu em uma cadela SRD (sem raça definida) com idade gestacional de aproximadamente 35 dias. Nesta coleta todas as membranas amnióticas provenientes dos diferentes fetos foram colocadas juntamente em cultivo, portanto, essa cultura é uma mistura (pool) de todas as membranas amnióticas dos fetos daquele útero gravídico. As células provenientes desta coleta foram chamadas de 35d.

Na figura 3A, B e C mostramos o aspecto do desprendimento celular padrão encontrado pela técnica explante de isolamento. Observe que o tecido encontra-se aderido na placa com as bordas soltando as células e que elas vão se desprendendo a partir do tecido (membrana amniótica) fragmentado. Este comportamento é bem característico de CTM. Essas células desprendidas que ficam aderidas a placa são as células-tronco derivadas da membrana amniótica. Na figura 3D mostramos a morfologia fibroblastóide característica destas células após seu desprendimento do tecido.

Figura 3 - Análise microscópica do isolamento das células derivadas da membrana amniótica de fetos caninos por explante provenientes das duas coletas

Legenda: A) Tecido de membrana amniótica mostrando o desprendimento celular obtido por explante, célula provenientes da coleta de 35 dias, 35d - aumento 40x. B) Membrana amniótica soltando as células provenientes da coleta de 56 dias, A8 – aumento 40x. C) Tecido proveniente da coleta de 56 dias (A8) em aumento de 100x mostrando a membrana amniótica soltando as células. D) Morfologia fibroblástico após 20 dias de cultivo da célula e segundo repique (p2), aumento 100x.

Nas primeiras passagens celulares foi possível observar uma população mista de células, com morfologias de células epiteliais e de fibroblastos (Figura 4B, seta vermelha e azul, respectivamente). Com o passar do tempo, as células com morfologia epitelial foram morrendo (Figura 4A, seta verde), dando lugar somente as células com morfologia de fibroblasto e, produzindo assim uma população mais homogênea de células (Figura 4A, seta rosa).

Figura 4 - Análise das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos provenientes da coleta 35d em microscópio óptico

Legenda: A) Cultura de membrana amniótica (35d) após o primeiro repique celular (p1), aumento de 100x. Ao centro temos células gigantes, com inúmeros vacúolos (seta verde) e células fibroblastóides (seta rosa). B) Presença de duas populações de células em cultura 35d, aumento 100x. As setas vermelhas representam as células com características epiteliais e as setas azuis as de formato fibroblastóides.

Ainda para ressaltar a morfologia fibroblastóide e o cultivo homogêneo observado após as passagens, observe na figura 5A e B as células provenientes das culturas 35d e A8, respectivamente.

Figura 5 - Fotomicrografia da cultura de células derivadas da membrana amniótica 35d e A8 em microscópio óptico

Legenda: A) Fotomicrografia das células 35d. B) A8. A) Células na passagem 10 (p10), aumento de 40x. B) Células na passagem 8 (p8), aumento de 40x.

6.2 ANÁLISE GENÉTICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS PROVENIENTES DA GESTAÇÃO DE CADELA PORTADORA DE DISTROFIA MUSCULAR-GRMD (*GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY*)

As células derivadas de membranas amnióticas de fetos da primeira coleta precisaram ser analisadas geneticamente quanto à presença da mutação no gene da distrofina, pois como derivaram de uma cadela portadora da mutação, foi necessário definir quais daqueles fetos eram normais, quais eram portadores e quais eram afetados. Após essa definição, poderíamos escolher quais daquelas células seriam transduzidas com vírus. Evidentemente que nos interessariam apenas células provenientes de embriões normais, para que essas pudessem futuramente talvez contribuir de alguma maneira em protocolos de terapia celular.

Sendo assim, foi realizada a extração do DNA genômico e PCR das células derivadas de AM dos fetos A6, A7, A8, A9, A10 e A11 para amplificação do gene da distrofina. Em seguida, o produto da PCR foi digerido com SAU961 para a comprovação da presença ou não de fetos normais, afetados e portadores. Nos animais normais esperávamos um fragmento de DNA de 310 pb, nos afetados dois fragmentos de DNA, um de 240 e outro de 70 pb; e nos portadores três fragmentos de DNA, o de 310 pb referente ao alelo normal e os de 240 e 70 pb referentes ao alelo mutado.

A figura 6 mostra os resultados dos fetos obtidos na primeira coleta onde pudemos constatar que os animais A6 e A9 são distróficos, os animais A7, A10 e A11 portadores e somente o animal A8 era normal e não tinha a mutação.

Desta forma, apenas células provenientes do A8 desse grupo de animais provenientes da gestação da cadela GRMD-portadora foi usado nos nossos experimentos.

Figura 6 - Análise dos produtos de PCR após digestão enzimática com a enzima de restrição Sau961 dos fetos caninos da primeira coleta

Legenda: Os DNAs genômicos obtidos das células foram utilizados como fita molde na reação de polimerização em cadeia e posteriormente foram submetidos a digestão com SAU961. O produto obtido da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2 % sob tensão de 100V/cm².

6.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE EXÓGENO LacZ NAS CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Os experimentos de transdução das células derivadas de membrana amniótica com vetores virais carregando o gene LacZ foi feita apenas nas células A8, seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos. Além das células A8, células NIH3T3 também foram transduzidas como controle. Ambas as células foram eficientemente infectadas e o resultado da transdução após a incubação com o substrato X-Gal pode ser observado na figura 7. As células após transdução foram chamadas de A8/LNPOZ.

Figura 7 - Análise da expressão do gene LacZ nas células NIH3T3 e nas células de membrana amniótica A8 em microscópio óptico

Legenda: A) Células NIH3T3 e B) A8, transduzidas com o vírus LNPoZ visualizadas após incubação com solução de X-Gal (aumento de 100x). A célula A8 expressando LacZ foi chamada de A8/LNPoZ.

6.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS

A caracterização biológica das células-tronco de membrana amniótica de fetos provenientes das duas coletas, 35d e A8/LNPoZ consistiu em caracterização morfológica através de análise por microscopia de luz das células coradas com HE, azul de toluidina ou sem coloração. A caracterização celular foi feita através da análise da expressão de marcadores de pluripotência e mesenquimais por ensaios imunocitoquímicos, a molecular por RT-PCT e por fim, a funcional a partir de diferenciações adipo, osteo e condrogênica.

6.4.1 Caracterização Morfológica

A figura 8 representa a análise morfológica dessas células onde observamos que ambas possuem morfologia fibroblastóide bem semelhante às CTMs.

Figura 8 – Análise da morfologia das células derivadas da membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8

Legenda: A,C) Células derivadas da membrana amniótica 35d e B,D) A8. A,B,C,D) aumento de 100x.

6.4.1.1 Análise Morfológica por Coloração

6.4.1.1.1 *Coloração de Azul de Toluidina*

A coloração por azul de toluidina foi realizada para auxiliar na caracterização da morfologia celular, observe na figura 9, célula-tronco fetais de membrana amniótica de cães 35d e A8.

Figura 9 - Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8

Legenda: A e B) Células derivadas da membrana amniótica de cães 35d. C e D) A8. Observe em A e B, os prolongamentos característicos e núcleos arredondados e em C e D células com prolongamentos. A; B) Barra: 200 µm; C) 100 µm e D) 50 µm.

6.4.1.1.2 Coloração de Hematoxilina – Eosina

A coloração de hematoxilina-eosina das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos proveniente das duas coletas foi realizada para análise da morfologia celular onde pudemos observar que são células com núcleo grande e pouco citoplasma (Figura 10B e D – setas). A relação núcleo citoplasma em células-

tronco é um pouco diferente das células em geral uma vez que, o núcleo é grande e o citoplasma é mais escasso.

Figura 10 - Fotomicrografia da coloração de hematoxilina-eosina das células de membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8

Legenda: A,B) Análise morfológica das células derivadas da membrana amniótica A8 pela coloração de hematoxilina-eosina. C,D) 35d. As setas representam a característica das células de núcleo grande, arredondado e pouco citoplasma em ambas as células. A) Escala de barras: 200µm; B e C) 100µm e D) 50µm.

6.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura Células de Membrana Amniótica de Fetos Caninos

As células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos caninos foram submetidas ao protocolo de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e novamente observamos citoplasma escasso e núcleo grande (Figura 11A e B).

Figura 11 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos (35d)

Legenda: Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células-tronco fetais de membrana amniótica de fetos caninos (35d). Em A, crescimento celular intenso com prolongamentos celulares. Em B, aumento da imagem mostrando o grande núcleo e os prolongamentos da membrana celular.

Na figura 12 temos os resultados da MEV de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos A8, observe nesta imagem que as células apresentam muitos prolongamentos.

Figura 12 - Fotomicrografia da microscopia eletrônica de varredura das células-tronco fetais de membrana amniótica de cão (A8)

Legenda: Cultura de células A8. As células A8 apresentam muitos prolongamentos na membrana celular.

6.4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão das Células de Membrana Amniótica de Fetos Caninos

As células de membrana amniótica de fetos caninos foram também analisadas por microscopia eletrônica de transmissão com objetivo de verificar mais detalhes a cerca de sua morfologia e ultraestrutura em cultura.

Na figura 13 observamos a ultraestrutura das células 35d e A8 em cultura (Figura 13A e B, respectivamente). Na figura 13A podemos observar as junções intercelulares, o citoplasma escasso, poucas organelas e o núcleo grande.

Figura 13 - Análise das células derivadas de membrana amniótica 35d e A8 por microscopia eletrônica de transmissão

Legenda: A) Microscopia eletrônica de transmissão das células derivadas de membrana amniótica 35d no aumento de 2.800x. B) Microscopia eletrônica de transmissão das células-tronco de membrana amniótica A8 no aumento de 2.800x.

Na figura 14A, podemos observar nas células 35d organelas como mitocôndrias e complexo de Golgi, além da presença de poros na membrana nuclear. Notamos também nesta imagem a presença de poucas organelas e de pouco citoplasma em comparação com o tamanho do núcleo, sugerindo ser uma célula-tronco. Na figura 14B podemos observar em detalhe a membrana celular e a nuclear.

Figura 14 - Microscopia eletrônica de transmissão das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d

Legenda: CG: Complexo de Golgi; MI: Mitocôndria; PO: Poros da membrana nuclear; MC: Membrana Citoplasmática e MN: Membrana Nuclear. A) Aumento de 8.900x, B) 11.000x.

6.5.2 Caracterização Celular

6.5.2.1 Curva de crescimento da células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8

As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d foram analisadas quanto a sua velocidade de crescimento. Para tanto, o número de células foi contado usando uma câmara de Neubauer. Após a primeira tripsinização, contagens com intervalos de 24 horas foram feitas por quinze dias. Uma alta taxa de morte celular foi observada (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva de crescimento das células-tronco fetais derivadas de membranas amnióticas 35d com tripsinizações a cada 24h por quinze passagens

O gráfico 2 representa os resultados obtidos com as células A8. Até a quarta passagem, a contagem foi realizada a cada 24 horas demonstrando morte celular. Já, as contagens seguintes foram realizadas a cada 48 horas devido à morte celular exacerbada, porém foi observado o mesmo padrão de morte celular.

Gráfico 2 - Curva de crescimento das células-tronco fetais derivadas de membrana amniótica A8/LNPOZ, contadas a cada 24h inicialmente, na quarta à sexta passagem a cada 48h em câmara de Neubauer

Devido a alta taxa de morte celular, uma nova curva de crescimento foi realizada com as células 35d só que o intervalo de tripsinização foi de 72 horas, com o objetivo de minimizar a morte celular. O gráfico dessa contagem pode ser visualizado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Curva de crescimento das células-tronco fetais derivadas de membrana amnióticas 35d, após tripsinização contadas a cada 72 h em câmara de Neubauer

6.5.2.2 Análise da viabilidade celular das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos

Este ensaio teve a finalidade de analisar a quantidade de células vivas obtidas durante os repiques das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LNPOZ pelo período de 33 dias utilizando o corante celular azul de trypan (Invitrogen), a partir da passagem 11 (p11) para as células 35d e 21 (p21) para a A8/LNPOZ.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em 3 gráficos utilizando o programa *GraphPad* (GraphPad Software, CA, USA): o primeiro demonstra o número de células vivas, o segundo o número de células mortas durante cada passagem e no terceiro a viabilidade celular, que foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{\text{número de células vivas} \times 100}{\text{Total de células contadas (vivas e mortas)}}$$

Nestes experimentos tínhamos como objetivo analisar se o número de células diminuiria com as tripsinizações, o que é comum acontecer em células de cultivo primário e particularmente com as células-tronco mesenquimais. Entretanto, o que observamos nos gráficos 4 e 5, células 35d e A8/LNPOZ respectivamente, é que o número de células vivas se mantém e que o número de células mortas é pequeno. E ainda, analisando a viabilidade celular em porcentagem de todos os 33 dias observamos que a mesma encontra-se em torno de 90% em ambas as células, como mostra o gráfico 6.

Gráfico 4 – Análise do número de células vivas e mortas das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d após 33 dias de cultivo

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d foram submetidas a contagem a cada 3 dias durante 33 dias. As células mortas estão representadas pela linha vermelha e as células mortas em cinza. A contagem destas células teve início na passagem 11 (p11).

Gráfico 5 – Análise do número de células vivas e mortas das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, A8/LNPOZ após 33 dias de cultivo

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram submetidas a contagem a cada 3 dias durante 33 dias. As células mortas estão representadas pela linha vermelha e as células mortas em cinza. A contagem destas células teve início na passagem 21 (p21).

Gráfico 6 – Análise da viabilidade celular das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LNPoZ após 33 dias de cultivo

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPoZ foram submetidas a contagem a cada 3 dias durante 33 dias. A viabilidade celular foi calculada como mencionado acima onde temos que o número de células vivas multiplicado por cem dividido pelo número total de células contadas.

Outra coisa que observamos ainda é que nas células 35d sempre tivemos um número maior de células como pode ser observado no gráfico 7A e B. Esse comportamento também foi observado diariamente uma vez que a necessidade de repique e a confluência destas células sempre foram maiores.

Gráfico 7 – Análise da viabilidade celular das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d e A8/LPNoZ após 33 dias de cultivo

A

B

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPoZ foram submetidas a contagem a cada 3 dias durante 33 dias. A viabilidade celular foi calculada como mencionado acima onde temos que o número de células vivas multiplicado por cem dividido pelo número total de células contadas. A) Gráfico linear mostrando o número total de células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d (rosa) e A8/LNPoZ (azul) contadas diariamente. B) Gráfico de barras mostrando a média de células total obtida durante os 33 dias de contagem

6.5.2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

Ainda visando analisar a proliferação destas células um ensaio utilizando o método colorimétrico foi realizado e o mesmo padrão de crescimento contínuo foi observado no gráfico 8. Até o momento apenas as células 35d foram analisadas.

Gráfico 8 – Análise da proliferação celular das células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos, 35d pelo método colorimétrico de MTT

6.5.2.4 Análise Imunocitoquímica das Células-Tronco de Membrana Amniótica de Cães

Análises imunocitoquímicas utilizando um painel de anticorpos foram realizadas e revelaram que as células de membrana amniótica de fetos caninos 35d expressam marcadores de pluripotência como Oct4 em baixa concentração (Figura 15), vimentina, uma proteína de filamento intermediário presente em células de origem mesenquimal e em tumores metastáticos no citoplasma das células (Figura 16) e, ainda baixa expressão de CD105, marcador específico de CTM na membrana das células (Figura 17). Observamos o potencial de proliferação destas células pela expressão nuclear de PCNA3. Além da expressão nuclear observamos também uma pequena expressão deste marcador no citoplasma o que também pode ser encontrado quando ele está na forma solúvel o que implica numa síntese constante da célula (Figura 18). Os marcadores de superfície celular CD34 e CD45 também foram verificados (Figuras 19 e 20). A expressão destes marcadores não era esperada nestas células uma vez que, o CD34 é um marcador de células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais e o CD45, ou antígeno leucocitário, está presente em células hematopoiéticas exceto eritrócitos e plaquetas, não sendo comumente expressos em CTM. Ainda analisando estas células, verificamos a expressão citoplasmática de nestina, marcador característico de células progenitoras do sistema nervoso central. Esta proteína também é comumente expressa em células estaminais, de glioma, endoteliais, tumores e também em células dermestromal e mioblasto em estágios iniciais (Figura 21).

Devido a alguns resultados obtidos paralelamente a estes decidimos analisar nestas células a expressão de dois marcadores tumorais, o p53 e o c-Myc e em ambas análises foi possível observar a expressão destes marcadores (Figuras 22 e 23). Observe na figura 22 que a expressão do p53 foi citoplasmática como era esperado e na figura 23 a expressão foi citoplasmática e nuclear.

Figura 15 – Análise do perfil de expressão de Oct4 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-Oct4. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x. A seta indica a expressão deste marcador no núcleo.

Figura 16 – Análise do perfil de expressão de vimentina das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-vimentina. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x. As setas indicam a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 17 – Análise da expressão de CD105 na membrana das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD105. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 200x. A seta indica a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 18 – Análise do perfil de expressão de PCNA3 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-PCNA3. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x. As setas indicam que a expressão deste marcador foi observada no núcleo.

Figura 19 – Análise do perfil de expressão de CD34 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD34. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 400 x. As setas indicam a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 20 – Análise do perfil de expressão de CD45 nas células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD45. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Figura 21 – Análise da expressão de nestina no citoplasma das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-nestina. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A,D) DAPI, B,E) FITC, C,f) Merge. Em A,B e C aumento de 200x. Em D,E e F aumento de 400 x. As setas indicam a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 22 – Análise da expressão de p53 no citoplasma das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-p53. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 600x. As setas indicam a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 23 – Análise da expressão de c-Myc no núcleo das células-tronco fetais de membrana amniótica 35d

Legenda: Neste experimento as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos 35d. As células foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-c-Myc. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 200x. As setas indicam a expressão deste marcador no núcleo.

As células-tronco de membrana amniótica de fetos canino A8/LNPOZ também foram analisadas e mostraram um perfil de expressão semelhante ao encontrado com a 35d. A figura 24 representa a expressão de Oct4. Nas figuras 25 e 26 temos respectivamente a análise da expressão de vimentina e CD105, a qual foi bem baixa e aparentemente menor quando comparada com as células 35d. Observamos na figura 27 uma expressão nuclear muito baixa de PCNA3. Os marcadores de superfície celular CD34 e CD45 também foram verificados (Figuras 28 e 29). Assim como para as células 35d, a expressão destes marcadores não era esperada, uma vez que são marcadores expressos em células hematopoiéticas. Ainda analisando estas células observamos também a expressão citoplasmática de nestina, marcador característico de células progenitoras do sistema nervoso central (Figura 30).

A análise da expressão das células para p53 e c-Myc também foi observada onde temos na figura 31 a expressão citoplasmática do p53 e na figura 32 a expressão citoplasmática e nuclear do c-Myc nas células A8/LNPOZ.

Figura 24 – Análise do perfil de expressão de Oct4 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-Oct4. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Figura 25 – Análise do perfil de expressão de vimentina nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-vimentina. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 200x. A seta indica a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 26 – Análise do perfil de expressão de CD105 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD105. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 200x. A seta indica a expressão deste marcador na membrana da célula.

Figura 27 – Análise do perfil de expressão de PCNA3 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-PCNA3. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Figura 28 – Análise do perfil de expressão de CD34 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPoZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD34. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 400x. A seta indica a expressão deste marcador na membrana.

Figura 29 – Análise do perfil de expressão de CD45 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPoZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-CD45. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Figura 30 – Análise do perfil de expressão de nestina nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-nestina. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 600x. A seta indica a expressão deste marcador no citoplasma.

Figura 31 – Análise do perfil de expressão de p53 nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPoZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-p53. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Figura 32 – Análise do perfil de expressão de c-Myc nas células-tronco fetais de membrana amniótica A8/LNPOZ

Legenda: As células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ foram fixadas em paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,05%, bloqueadas em PBS contendo 5% de BSA e submetidas à imunocitoquímica utilizando o anticorpo anti-c-Myc. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado a FITC (verde) e o núcleo foi corado com DAPI. A) DAPI, B) FITC, C) Merge. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

6.5.3 Caracterização Molecular Através de RT-PCR

A análise molecular das células-tronco de membrana amniótica foi realizada através de RT-PCR utilizando a mesma quantidade de RNA (1 µg) para cada amostra com o objetivo de analisar de forma comparativa a expressão destes genes. A figura 33 representa os resultados obtidos com as células 35d onde há expressão do gene GAPDH com a visualização de um fragmento de aproximadamente 463 pb na linha 5, como esperado. Ainda nesta figura podemos observar na linha 2 um fragmento de aproximadamente 204 pb esperado para vimentina. Nas linhas 3 e 4 não houve a expressão de Oct4 e de Nanog. Já nas linhas 6 e 7 observamos um fragmento de aproximadamente 391 pb como era esperado para CD73 e muito fracamente um fragmento de 171 pb para o CD105.

Figura 33 - Análise molecular por RT-PCR das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos 35d

Legenda: O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde. Oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes Oct4, Nanog, vimentina CD105, CD73 e GAPDH (controle). O produto obtido na RT-PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, sob tensão de 100V/cm² e corado com brometo de etídeo antes de ser fotografado pelo sistema Image Quant VDS. Linha 1, M) Marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb. Linhas 2) Vimentina (204 pb); Linha 3) Oct4 (120pb); Linha 4) Nanog(210pb); Linha 5) GAPDH (463 pb); Linha 6) CD73 (391pb); Linha 7) CD105 (171 pb).

A figura 34 representa os resultados obtidos no RT-PCR das células A8 e novamente não pudemos observar a expressão do marcador de pluripotência Oct4 (120 pb), linha 3. Observamos nas linhas 1, 2, 5 o fragmento esperado para os genes GAPDH (463 pb), Vimentina (204 pb) e CD73(391pb). Fragmentos bem fracos do tamanho esperado foram observados nas linhas 4 e 6 para os genes Nanog (210pb) e CD105 (171pb).

Figura 34 - Análise molecular por RT-PCR das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ

Legenda: O cDNA obtido a partir do RNA foi utilizado como fita molde. Oligonucleotídeos utilizados anelam nos genes Oct4, Nanog, vimentina CD105, CD73 e GAPDH (controle). O produto obtido na RT-PCR foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, sob tensão de 100V/cm² e corado com brometo de etídeo antes de ser fotografado pelo sistema Image Quant VDS. Linha 1 - M) Marcador de peso molecular DNA ladder de 100 pb. Linhas 1) GAPDH (463 pb); Linha 2) Vimentina (204 pb); Linha 3) Oct4 (120 pb); Linha 4) Nanog (210 pb); Linha 5) CD73 (391 pb); Linha 6) CD105 (171 pb).

6.5.4 Caracterização funcional

As células-troncos derivadas da membrana amniótica de fetos caninos (35d e A8/LNPOZ) foram submetidas à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos pelo cultivo em meio específico.

As figuras 35 e 36 mostram a presença de vacúolos de gorduras nas células-tronco derivadas de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ, respectivamente após a adição do meio específico.

Figura 35 - Diferenciação em adipócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d foram cultivadas em α -MEM 15% SBF, suplementado com dexametasona, insulina e indometacina por aproximadamente 21 dias. Coloração *oil red* 0,36% em álcool isopropílico 60%. A, B) Adipócitos derivados a partir das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d - setas (aumento 20, 100x). C, D) controle negativo da diferenciação, cultivado em α -MEM 7,5 % SBF sem suplementos (aumento 20 e 100x).

Figura 36 - Diferenciação em adipócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ foram cultivadas em α -MEM 15% SBF, suplementado com dexametasona, insulina e indometacina por aproximadamente 21 dias. Coloração *oil red* 0,36% em álcool isopropílico 60%. A) Adipócitos derivados a partir das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ - setas (aumento 20, 100x). C, D) controle negativo da diferenciação, cultivado em α -MEM 7,5 % SBF sem suplementos (aumento 20 e 100x).

Em relação à diferenciação osteogênica observe nas figuras 37 e 38 a presença de depósitos de cálcio após a coloração com *Alizarin Red S*.

Figura 37 - Diferenciação em osteócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d foram cultivadas em α -MEM 7,5% SBF, suplementado com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato. Coloração *Alizarina Red S*. A, B, C) Osteócitos derivados a partir das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d - setas (aumento 10, 20 e 20x). D) controle negativo da diferenciação, cultivado em α -MEM 7,5 % SBF sem suplementos (aumento 20x).

Figura 38 - Diferenciação em osteócitos das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d foram cultivadas em α -MEM 7,5% SBF, suplementado com dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato. Coloração *Alizarina Red S*. A, B, C) Osteócitos derivados a partir das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d - setas (aumento 20x). D) controle negativo da diferenciação, cultivado em α -MEM 7,5 % SBF sem suplementos (aumento 20x).

Infelizmente até o momento, as células 35d não diferenciaram para condrócitos em meio específico como mostra a figura 39.

Figura 39 – Análise das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d após indução condrogênica

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d foram cultivadas em meio de indução da diferenciação condrogênica STEMPRO (Invitrogen) durante 21 dias. Coloração Tricoma de Masson. A) células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d (aumento 100x). B) controle negativo da diferenciação, cultivado em meio DMEMs.

Já as células A8/LNPOZ mostraram algumas fibras colágenas (coloração azul – seta) após coloração com tricomo de masson (Figura 40).

Figura 40 – Análise das células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPOZ após indução condrogênica

Legenda: As células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d foram cultivadas em meio de indução da diferenciação condrogênica STEMPRO (Invitrogen) durante 21 dias. Coloração Tricomo de Masson. A) células-tronco derivadas de membrana amniótica de fetos caninos 35d (aumento 100x) e a presença de algumas fibras colágenas (setas). B) controle negativo da diferenciação, cultivado em meio DMEMs.

6.6 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE FETOS CANINOS

6.6.1 **Análise macroscópica do nódulo formado após inóculo das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos**

Como relatado em materiais em métodos, o animal submetido ao inóculo em diferentes regiões foi observado semanalmente durante 8 semanas, tendo o nódulo se formado após 3-4 semanas da inoculação de células-tronco de membrana amniótica 35d ou A8/LNPOZ. Após este período, o nódulo foi retirado e submetido a análises histológicas.

A figura 41A mostra uma análise macroscópica do nódulo formado na região do músculo bíceps femural direito após aproximadamente 3 semanas de inoculação com células 35d no camundongo *nude* em decúbito ventral. Observe ainda na seta desta figura, a presença de vasos sanguíneos irrigando o nódulo formado. Na figura 41B, podemos observar no animal em decúbito ventral e a presença de um nódulo na região do músculo bíceps femural direito após aproximadamente 4 semanas de inoculação das células A8/LNPoZ.

Figura 41 - Análise macroscópica da formação do tumor após 3-4 semanas do inoculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35d e A8/LNPOZ, no bíceps femoral de camundongos imunossuprimidos nude

Legenda: A) Imagem macroscópica do animal em decúbito ventral evidenciando grande nódulo formado em região do músculo bíceps femoral direito após aproximadamente 3 semanas de inoculação com as células 35d. B) Imagem macroscópica do nódulo formado após 4 semanas da inoculação das células A8/LNPoZ no bíceps femoral direito. Em A, a seta da imagem indica a presença de vasos sanguíneos irrigando o nódulo formado

A figura 42 abaixo mostra o aspecto do mesmo nódulo acima formado no bíceps femoral após dissecação. Observe que o tamanho tumoral também variou de acordo com a célula utilizada sendo que, as células 35d levaram a formação tumoral em 3 semanas enquanto que as A8/LNPoZ foram 4 semanas. E, ainda o tamanho do tumor formado após a inoculação das células 35d foi maior como pode ser observado na figura 42.

Figura 42 - Análise macroscópica do nódulo dissecado formado após 3-4 semanas do inóculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35d e A8/LNPOZ, respectivamente no bíceps femural de camundongos imunossuprimidos nude

Legenda: A) Imagem macroscópica do nódulo dissecado da região do músculo bíceps femural direito após aproximadamente 3 semanas de inoculação com as células 35d. B) Imagem macroscópica do nódulo dissecado formado após 4 semanas da inoculação das células A8/LNPoZ no bíceps femural direito.

Além da inoculação no bíceps femural, as células 35d e A8/LNPOZ foram inoculadas na região intraperitoneal visando analisar se estas células teriam novamente este comportamento tumorigênico. A figura 43 mostra que a troca do local do inóculo não afetou a formação tumoral e novamente observamos nódulos após 3-4 semanas da inoculação. Em A temos a imagem macroscópica do nódulo formado neste animal após 3 semanas da inoculação das células 35d e em B o mesmo nódulo após dissecação. Em C e D temos um nódulo formado após 4 semanas da inoculação das células A8/LNPoZ em uma região pouco comum e bem menor quando comparado com os outros. Já em E temos o nódulo intraperitoneal formado após inóculo das A8/LNPoZ bem semelhante ao que formou após a injeção das células 35d. E, por último a imagem F mostra a direita o animal inoculado com as células 35d e a esquerda com as A8/LNPoZ a fim de mostrar que novamente o

tamanho do tumor formado difere de acordo com as células injetadas sendo que observamos tumores relativamente maiores nos animais injetados com as células 35d.

Figura 43 - Análise macroscópica do nódulo formado após 3-4 semanas do inóculo das células-tronco derivadas de membrana amniótica de feto canino, 35d e A8/LNPOZ na região intraperitoneal de camundongos imunossuprimidos nude

Legenda: A) Imagem macroscópica do nódulo formado na cavidade abdominal após aproximadamente 3 semanas de inoculação com as células 35d. B) Imagem macroscópica do nódulo dissecado após aproximadamente 3 semanas de inoculação com as células 35d. C) Nódulo formado após 4 semanas da inoculação das células A8/LNPOZ na região intraperitoneal. D) Nódulo dissecado de C. E) Nódulo dissecado após 4 semanas da inoculação das células A8/LNPOZ na região intraperitoneal. F) Aspecto macroscópico dos nódulos formados 3-4 semanas após o inóculo das células A8/LNPOZ (esquerda) e 35d (direita). Observe que o tamanho do tumor difere de acordo com as células.

Ainda visando testar o potencial carcinogênico das células 35d e A8/LNPOZ elas foram também inoculadas subcutaneamente na região dorsal da coluna cervical figura 44.

Na figura 44A, podemos observar a formação de uma massa tumoral, posteriormente classificada histologicamente como sendo um carcinoma embrionário, após 32 dias de Inoculação subcutânea das células-tronco de membrana amniótica de 35d na região dorsal da coluna cervical. Em B, podemos observar a formação de carcinoma embrionário após 54 dias de inoculação subcutânea das células A8/LNPOZ na região da coluna cervical do animal. Já em C temos os animais inoculados com os dois tipos celulares 35d e A8/LNPOZ onde novamente observamos que o tumor obtido após a inoculação das células 35d é maior quando comparado com o obtido após a inoculação das células A8/LNPOZ. Além disso, o tempo de formação também é diferentes sendo menor nas células 35d.

Figura 44 - Fotografia da formação tumoral após injeção subcutânea das células de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ em camundongos imunossuprimidos nude

Legenda: A) camundongo em decúbito ventral, evidenciando região cervical para análise macroscópica da formação de carcinoma embrionário após 32 dias de inoculação de células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos caninos 35d. B) camundongo em decúbito ventral evidenciando região cervical para análise macroscópica da formação de carcinoma embrionário após 54 dias de inoculação das células. C) Análise morfológica do tamanho do tumor obtido após a inoculação das células 35d e A8 na região cervical dos animais. Observe na seta rosa que o tumor formado após a injeção das células 35d aparentemente é maior do que o formado após inoculação das células A8/LNPOZ, seta azul.

Convém ressaltar que a formação dos nódulos provenientes das células 35d sempre tiveram surgimento mais rápido e de tamanho maior quando comparados aos da células A8 independente do local da injeção (Figura 42A e B, Figura 43 A,B,F e Figura 44 A, B e C).

6.6.2 Análise histológica dos órgãos dos camundongos nudes após inoculação das células derivadas de membrana amniótica 35d e A8 por coloração de Hematoxilina-Eosina

As análises histológicas foram feitas nos órgãos como cérebro, coração, pulmão, fígado, rim dos camundongos nudes a fim de verificar se houve migração de células de MA inoculadas ou se as mesmas se localizaram apenas na região onde foram inoculadas formando o tumor. No caso de injeção no bíceps femural o músculo adjacente a esta região foi retirado e analisado por histologia.

A figura 45A e B representa o resultado da histologia da região muscular do bíceps femoral, local de inoculação das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPOZ, por HE. Observe nesta figura 45A que houve invasão pelo tumor e que células neoplásicas foram observadas entre as fibras musculares. Observe ainda na figura 46A e B a morfologia celular e desorganização do tumor.

Figura 45 – Fotomicrografia da histologia por coloração de HE da região muscular do local de inoculação no bíceps femoral das células-tronco da membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ

Legenda: A) Histologia da região muscular do bíceps femoral após inóculo das células 35d no bíceps femoral. B) A8/LNPOZ. Em A e B, observa-se tumor muito invasivo entre as fibras musculares, demonstrando crescimento desorganizado de características neoplásicas. A) aumento de 40x e B) aumento de 100x.

Figura 46 – Fotomicrografia da histologia do tumor formado após 3-4 semanas do inóculo das células 35d e A8/LNPoZ, respectivamente por coloração de HE

Legenda: A) Exame histopatológico pela coloração HE do tumor formado após inoculação das células 35d no bíceps femural de camundongos imunossuprimidos. B) A8/LNPoZ. Observe nestas imagens a presença de células binucleadas e de crescimento desorganizado. A e B) aumento de 100X.

Como dito anteriormente os animais inoculados foram eutanasiados e alguns órgãos como: cérebro, coração, pulmão, fígado e rim foram coletados e analisados com intuito de observar se houve ou não migração das células inoculadas. Apesar desse tipo de análise ter sido feita nos 2 tipos de inoculação celular, mostraremos abaixo apenas os resultados obtidos com a inoculação das células pela via intraperitoneal, a qual nos pareceu a mais adequada para a dispersão celular. As figuras 47, 48, 49, 50 e 51 representam os resultados obtidos nos seguintes órgãos: cérebro, coração, pulmão, fígado e rim onde nenhuma migração celular foi observada.

Figura 47 - Análise histopatológica do cérebro retirado do camundongo após 3-4 semanas do inóculo de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ, respectivamente na região intraperitoneal

Legenda: A) 35d B) A8/LNPOZ. Apesar do carcinoma embrionário, a histologia do órgão acima mencionado não demonstrou migração celular, ficando o tumor restrito à região de aplicação. A) Barra: 50μm; B) 100X.

Figura 48 - Análise histopatológica do coração de camundongo após inoculo das células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPoZ, na região intraperitoneal

Legenda: A) 35d; B) A8. Apesar do carcinoma embrionário, a histologia do órgão acima mencionado não demonstrou migração celular, ficando o tumor restrito à região de aplicação. Aumento de 100X(A) e 40X(B).

Figura 49 - Análise histopatológica do pulmão retirado do camundongo com tumor após inoculo de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPoz na região intrperitoneal

Legenda: Análise histológica de camundongos inoculados com células 35d (A) e A8(B). Apesar do carcinoma embrionário, a histologia do órgão acima mencionado não demonstrou migração celular, ficando o tumor restrito à região de aplicação.

Figura 50 - Histologia por coloração de HE do fígado de camundongo imunossuprimido nude após inoculação de células-tronco de membrana amniótica 35d e A8/LNPOZ respectivamente na região intraperitoneal

Legenda: A) 35d; B) A8. Morfologia celular seguindo os padrões normais de um órgão saudável, comprovando a não migração das células-tronco inoculadas para este órgão. Apesar do carcinoma embrionário, a histologia do órgão acima mencionado não demonstrou migração celular, ficando o tumor restrito à região de aplicação. B) 50 μm

Figura 51 - Histologia por coloração de HE do rim de camundongo nude com carcinoma embrionário surgido após inoculação de células 35d e A8, respectivamente, na região intraperitoneal

Legenda: A) 35d; B) A8. Apesar do carcinoma embrionário, a histologia do órgão acima mencionado não demonstrou migração celular, ficando o tumor restrito à região de aplicação. A e B) 50 μ m. Morfologia celular seguindo os padrões normais de um órgão saudável, comprovando a não migração das células-tronco inoculadas para este órgão.

6.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão do Nódulo Formado após Inoculação das células-tronco de membrana amniótica (35d e A8) na região cervical dos camundongos imunossuprimidos nude

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada no tumor formado após a inoculação subcutânea da região cervical de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos 35d e A8/LNPoz a fim de caracterizar mais detalhadamente a morfologia das células no tumor.

A morfologia celular de ambos os tumores mostra intensa desorganização tecidual, presença de células binucleares.

A figura 52A representa a característica celular de crescimento desorganizado das células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos caninos 35d e a 50B, a presença de núcleo proeminente e grandes vacúolos no citoplasma da célula.

Figura 52 - Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão da formação tumoral obtidas em camundongos imunossuprimidos, nude após 32 dias da inoculação subcutânea na região cervical de células de MA 35d

Legenda: Carcinoma embrionário formado após 32 dias de inoculação das células 35d. A) Mostra o crescimento celular desorganizado. B) Núcleo proeminente e a presença de grandes vacúolos no citoplasma da célula.

Já, a figura 53 representa a análise por microscopia eletrônica de transmissão do carcinoma embrionário formado após 56 dias de inoculação subcutânea das células A8/LNPoZ na região cervical. Em 53A podemos novamente observar o crescimento celular desorganizado e em 53B, células amórficas e binucleadas.

Figura 53 - Fotomicrografia por microscopia eletrônica de transmissão da formação tumoral encontradas nos camundongos imunossuprimidos nudes após 56 dias da inoculação de células A8/LNPoZ

Legenda: Carcinoma embrionário formado após 56 dias de inoculação com células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos A8/LNPoZ. A) Crescimento celular desorganizado. B) células amórficas e binucleadas.

7 DISCUSSÃO

As células-tronco são um tópico bastante explorado nos últimos anos, ampliando suas aplicações e diferentes abordagens na medicina regenerativa. Entretanto, a maior parte do conhecimento que se tem sobre células-tronco até os dias atuais está relacionado às células-tronco humanas, sendo extremamente importante e necessário que isso se amplie para células de animais, para a sua utilização também na área veterinária. Nesse projeto nossa intenção era estabelecer o cultivo de células-tronco de cães, em especial de células-tronco fetais de membrana amniótica, uma vez que o uso de células provenientes dessa membrana tem sido largamente explorado na área humana, e verificar o seu potencial para uso na medicina regenerativa veterinária. Sendo assim, nesse trabalho, estabelecemos todo protocolo para o cultivo de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos, desde o processo para a extração e caracterizamos essas células *in vitro* e *in vivo*.

Em relação ao cultivo de MA, o método utilizado foi previamente descrito por Marcus para células de membrana amniótica de rato (MARCUS et al., 2008), sendo a cultura feita por explante sem uso de enzimas para a digestão do tecido. Esse processo foi utilizado por ser bastante prático para realização, mais econômico e ainda, como não utiliza nenhum tipo de agressão química às células, acredita-se que elas se apresentem em cultura mais próximas do que seriam na membrana amniótica do cão. Além disso, enquanto essa tese estava em andamento, outro grupo realizou o cultivo com células de membrana amniótica de cão, também por explante (URANIO et al., 2011). Entretanto, no referido trabalho os autores utilizaram apenas uma linhagem de MA de fetos caninos e compararam essas células com cordão umbilical e com células de fluido amniótico *in vitro*, sem, entretanto, observar como as mesmas se comportavam *in vivo*.

Quando colocadas em cultivo observamos que as células de MA de fetos caninos apresentavam uma cultura com aparentemente dois tipos celulares nas primeiras passagens, um morfologicamente semelhante às células epiteliais e outro com células semelhantes a fibroblastos. Isso é esperado, pois sabemos que a membrana amniótica é composta por esses dois tipos celulares. Essa população mista foi ficando homogênea por morte das células epiteliais e na terceira passagem

celular já era possível observar a predominância de células fibroblásticas, morfologia semelhante à de outras células-tronco mesenquimais já caracterizadas. Isso pode ser confirmado também nos ensaios de microscopia eletrônica de transmissão. Essas células foram amplificadas e usadas em todos os experimentos que se seguiram de caracterização celular e também foram inoculadas em camundongos nudes *in vivo*, para observar se possuíam potencial carcinogênico ou se poderiam ser aplicadas para medicina regenerativa veterinária.

Enquanto amplificávamos as células para realizar os protocolos de caracterização celular, molecular e funcional, realizamos o ensaio *in vivo* para verificação do potencial carcinogênico dessas células inoculando um milhão de células nos camundongos nudes e, para nossa surpresa, após aproximadamente um mês do inóculo, havia se formado um grande tumor no músculo bíceps femoral inoculado ou na região subcutânea cervical. Como esse era um resultado inesperado, realizamos vários outros inóculos para verificar se o resultado se repetia, e sempre nos deparávamos com a formação de um grande tumor, independente da região que as células eram inoculadas. Além disso, realizamos o cultivo de células de membrana amniótica de fetos de ratos, como descrito em Marcus et al. 2008, a fim de verificar se algo podia estar acontecendo em nosso procedimento que poderia ser responsável pela formação tumoral. Porém, quando inoculamos a mesma quantidade de células de membrana amniótica de fetos de rato em camundongos nudes, não observamos a formação de tumor (dados não mostrados nessa tese), isentando a responsabilidade da formação tumoral do procedimento usado para o estabelecimento da cultura de células.

Apesar da formação de tumor inviabilizar o uso das células de MA para aplicação em medicina regenerativa, continuamos dando andamento nas caracterizações celulares, moleculares e funcionais. Em relação aos marcadores expressos pelas células de MA de fetos de cão, pudemos observar que o marcador de células-tronco mesenquimais CD105 estava presente nas células A8 e 35d. A vimentina, um filamento intermediário de citoesqueleto encontrado no citoplasma de células de origem mesenquimal também foi positivo em ambas as linhagens. O marcador Oct4, fator de transcrição encontrado no núcleo de células pluripotentes e que podem ser encontrado em algumas células mesenquimais, foi positivo nas linhagens aqui estabelecidas. Em relação à expressão de proteínas envolvidas na proliferação celular, a marcação para PCNA3 foi positiva. Ainda, em relação a

marcadores comumente encontrados em tumores, como p53 e c-Myc, ambos foram positivos para as células A8 e 35d, o que não seria esperado para uma célula-tronco mesenquimal, mas considerando nossos resultados observados *in vivo* em relação a formação tumoral, a expressão desses marcadores corroborou com os resultados observados *in vivo*. Quanto aos marcadores CD34 e CD 45, também foram expressos nas células A8 e 35d, o que novamente não era esperado, pois CD34 é uma glicoproteína de adesão encontrada na superfície de células-tronco hematopoiéticas e CD 45 é uma proteína tirosina fosfatase encontrada na membrana de células hematopoiéticas, com exceção de eritrócitos e plaquetas. Sendo assim, as duas marcações seriam incomuns, entretanto, a molécula CD34 também pode ser encontrada em tumores. Por fim, a marcação com nestina também foi observada, um filamento intermediário de citoesqueleto encontrado em células progenitoras do sistema nervoso, e que também é encontrado sendo expresso em células tumorais de glioma. Dessa forma, podemos observar que as células A8 e 35d apresentaram marcação positiva para várias moléculas que são expressas em tipos celulares tumorais.

Em relação à caracterização molecular por RT-PCR, foi observada a expressão de alguns genes encontrados em células mesenquimais como CD73 e Oct4. Em relação ao CD 105, positivo por ensaios de imunocitoquímica, não houve amplificação de fragmento referente a expressão desse gene. Uma possibilidade para essa falha observada no RT-PCR é que os oligonucleotídeos que estavam disponíveis e foram usados como moldes para as amplificações foram desenhados com base em genes humanos, e, portanto a homologia ficou comprometida.

Em relação às análises de proliferação celular por MTT, foi possível verificar que as células de MA de fetos caninos apresentaram um perfil de proliferação celular compatível com o de células-tronco mesenquimais. Verificamos ainda que o método de contagem através do repique celular não parece ideal, pois a tripsinização provocou muita morte celular, mascarando o perfil proliferativo dessas células.

Em relação à capacidade de se transformar em outro tipo celular, qualidade necessária a uma célula para que essa possa receber a denominação de célula-tronco, verificamos que as células provenientes da membrana amniótica de fetos caninos A8 e 35d apresentaram a plasticidade necessária para se transformar eficientemente em células adipogênicas e osteogênicas mediante estímulo por

fatores específicos adicionados ao meio de cultivo. Em relação à indução condrogênica, apenas na célula 35d foi possível observar a produção de algumas fibras colágenas indicando condrogênese, sendo que novos ensaios seriam necessários para confirmar esse resultado.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* eram compatíveis com a classificação das células-tronco de MA de fetos caninos como célula-tronco mesenquimais. Essas células poderiam ser recomendadas para uso em medicina veterinária regenerativa, como fez Uranio et al, 2011, se não fossem os resultados obtidos *in vivo*, ensaio não realizado pelos referidos autores. Embora *in vitro* as células de MA de fetos caninos tenham se apresentado como uma fonte de células-tronco viáveis, de fácil obtenção e cultivo, seu comportamento *in vivo* quando injetadas em camundongos imunossuprimidos produziu rapidamente uma grande massa tumoral no local de inóculo identificada histologicamente como um carcinoma embrionário, um tumor definido como originalmente formado por células germinativas, com células epiteliais com marcado pleomorfismo e vários padrões histológicos (Oosterhuis; Looijenga, 2003). Esse resultado foi confirmado após o inóculo em 10 camundongos nudes, não importando o local do inóculo, sendo que em todos, injeção direta no bíceps femural, região subcutânea da coluna cervical ou intraperitoneal, houve a formação desse tumor em aproximadamente um mês. Interessantemente, apesar da agressividade do tumor observada inclusive nas análises por microscopia óptica do tumor e de vários outros órgãos analisados, o tumor se manteve localizado no local do inóculo, aparentemente não produzindo metástases. A análise por microscopia eletrônica de transmissão do tumor revelou as mesmas alterações celulares que a microscopia óptica apresentou, com células binucleadas e com núcleos dismórficos, características de células tumorais

A produção do tumor é um fato inédito no universo das células-tronco, uma vez que muitos autores atribuem essa ação as células mutadas que adquirem características de células-tronco (stem-cell- like-cells), (JANZEN; SCADDEN, 2006). No nosso caso, as células foram retiradas de um tecido macroscopicamente normal, de origem fetal e praticamente avascularizado. Nós usamos duas linhagens celulares e ambas produziram tumor nos camundongos. Uma das linhagens (A8) foi previamente transduzida com um vetor viral, o que poderia ser responsável por uma transformação na célula deixando-a maligna. Entretanto, na linhagem 35d não foi feito esse procedimento, sendo essa células aparentemente ainda mais agressiva.

Essa agressividade das células 35d poderia ser causada por uma infecção viral natural dos fetos de onde a membrana amniótica foi retirada. Outra hipótese seria a de que um dos fetos 35d poderia ter uma alteração tumoral ou uma mutação celular inaparente e essas células alteradas foram selecionadas quando colocadas em cultivo. Apesar dessas duas ultimas possibilidades serem pequenas, não podemos descartá-las quando observamos o comportamento das células de MA aqui analisadas.

Com base nos nossos resultados, sugerimos que as células-tronco da membrana amniótica de fetos caninos não devem ser usadas para aplicação em protocolos de terapia celular em cães. Além disso, acreditamos que novos estudos devam ser realizados para verificação desse comportamento *in vivo*, utilizando maior numero de fetos caninos de diferentes idades gestacionais, e levando-se em conta o desenvolvimento embrionário da membrana amniótica dos cães.

8 CONCLUSÕES

- Nesse projeto foi possível estabelecer o método de cultivo de células-tronco provenientes de membranas amnióticas de fetos caninos.
- A cultura por explante foi um método simples, prático e factível para o estabelecimento de cultura de células-tronco provenientes da membrana amniótica de fetos caninos.
- A caracterização celular, molecular e funcional das células-tronco provenientes da membrana amniótica de fetos caninos mostrou que essas células apresentam marcadores de células-tronco mesenquimais, e possuem um perfil de plasticidade compatível com o de outras células-tronco mesenquimais, podendo ser então classificadas como células-tronco mesenquimais.
- A caracterização celular mostrou ainda que as células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos expressam alguns marcadores também encontrados em células tumorais.
- A aplicação de células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos em camundongos imunossuprimidos produziu um tumor, caracterizado como carcinoma embrionário.
- As células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos não são indicadas para uso em protocolos de terapia celular em cães por apresentarem o risco eminente de produzirem tumor quando inoculadas em animais imunocomprometidos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p. 32-50.
- AMBROSIO, CE. **A Barreira Placentária em Cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758): Fluxo Sanguíneo Materno-Fetal**. 2004. 120 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ANDREADIS, S.T.; BROTT, D.; FULLER, A.O.; PALSSON, B.O. – Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. **J.Virol.** 71: 7541-7548, 1997.
- ASAHARA, T; KAWAMOTO, A. Review: Endothelial progenitor **cells** for postnatal vasculogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, 287(3):C572-9, 2004.
- BASSI, E. J.; AITA, C. A. M.; CÂMARA, N. O. S. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? **World J Stem Cells**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.
- BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; KOH, I.; SILVA, M.R.R.; HAN, S.W. - Expression of human growth hormone gene by transduced vascular smooth muscle cells and transplanted into the rat vascular adventitia. **Cell transplantation**. 11: 1-10, 2002.
- BELTRÃO-BRAGA, PCB. **Expressão dos genes *hGH* (hormônio do crescimento humano) e *LacZ* (beta-galactosidase) em ratos implantados com células musculares lisas vasculares transduzidas por vetores retrovirais: novo modelo de terapia gênica *ex vivo***. 2000. 160f, Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BENDER M.A.; PALMER T.D.; GELINAS, R.E.; MILLER, D. – Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the gag region. **J. Virol.** 61: 1639-1646, 1987.
- BOHELER, K. R.; CZYZ, J.; TWEEDIE, D.; YANG, H. T.; ANISIMOV, S. V.; WOBUS, A. M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.*, v. 91, n. 3, p. 189-201, 2002.
- CAPLAN, A. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.
- CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.
- CARMICHEAL et al. Evaluation of a tetrazoliumbased, semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. **Cancer Res.** 1987; 47: 936-942.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.

The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2007.

EVANS, M. J. Potential for genetic manipulation of mammalian, *Mol. Biol. Med.* 6: 557 – 565 ,1989.

FERNANDES, I. R. **Cultura e Caracterização de Células do Trofoblasto Extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo**. 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, v. 3, n. 4, p. 393-403,1970.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, p. 649–658, 2004.

GAVA, A. A.; ZANONI, J. N. Envelhecimento celular. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 9, n. 1, p. 41-46, 2005.

GOMES, J. A. P.; KOMAGOME, C. M.; SANTOS, N.; CHAVES, A. P.; CUNHA, M. C.; FREITAS, D. Membrana amniótica nas cirurgias de reconstrução da superfície ocular nas Ceratoconjuntivites Cicatriciais - Resultados preliminares. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.62, p.562-76, 1999.

HENTZE, H.; SOONG, P. L.; WANG, S. T.; PHILLIPS, B. W.; PUTTI, T. C.; DUNN, R. Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. **Stem Cell Research**, v. 2, p. 198–210, 2009.

ILANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPIILLAI, U. Human fetal membranes : a source of stem cells for tissue regeneration and repair? **Placenta**, v.1, n. 30, p. 2-10, 2009.

ISAGAWA, T.; NAGAE, G.; SHIRAK, N.; FUJITA, T.; SATO, N.; ISHIKAWA, S.; KUNE, S.; ABURATANI, H. DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e26052, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3189249/> >. Acesso em: 12 abr. 2010.

ISHII, T.; OHSUGI, K.; NAKAMURA, S.; SATO, K.; HASHIMOTO, M.; MIKOSHIBA, K.; SAKURAGAWA, N. Gene expression of oligodendrocyte markers in human amniotic epithelial cells using neural cell-type-specific expression system. **Neurosci. Lett.**, v. 268 , p. 131-134, 1999.

ISMAIL, A.; RAMSIS, R.; SHERIF, A.; THABET, A.; EL-GHOR, H.; SELIM, A. Use of human amniotic stem cells for common bile duct reconstruction: Vascularized support of a free amnion graft. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, n. 9, p. BR243-247, 2009.

JACKSON, P. G. G. **Obstetrícia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2005. cap. 11, p. 10-11.

JANZEN, V.; SCADDEN, D. T. Stem cells: good, bad and reformable. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 418-419, 2006.

KAKISHITA, K.; NAKAO, N.; SAKURAGAWA, N.; ITAKURA, T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Res.**, v. 980, p. 48-56, 2003.

KIM, J.; KANG, H. M.; KIM, H.; KIM, M. R.; KWON, H. C.; GYE M. C.; KANG S. G.; YANG H. S.; YOU J., *Ex Vivo* Characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 581-594, 2007.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **N. Engl. Journal Med.**, v. 7, p. 570-582, 2003.

LI, H.; NIEDERKORN, J. Y.; NEELAM, S.; MAYHEW, E.; WORD, R. A.; MCCULLEY, J. P.; ALIZADEH, H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, n. 3, p. 900-907, 2005.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; BLACK, I. B.; WOODBURY, D. Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, n. 4, p. 1256-1264, 2008.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, v. 76, n. 2, p. 130-144, 2008.

MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. D.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MIHU, C. M.; RUS, C. D.; SORITAU, O.; SUŞMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 50, p. 7-73, 2009.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v. 23, n.10, p. 1549-1559, 2005.

MILLER, A.D. - Progress toward human gene therapy. **Blood**, 76:271-278, 1990.

MIMEAULT, M; BATRA, S.K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells**, 24(11):2319-45, 2006.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**. 7 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, cap.7, p. 131-165.

OKAZAKI, T.; CASEY, M. L.; OKITA, J. R.; MACDONALD, P. C.; JOHNSTON, J. M. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 139, n. 4, p. 373-381, 1981.

OOSTERHUIS, J. W.; LOOIJENGA, L. H. Current views on the pathogenesis of testicular germ cell tumours and perspectives for future research: highlights of the 5th Copenhagen Workshop on Carcinoma in situ and Cancer of the Testis. **APMIS**, v.111, n. 1, p. 280-289, 2003.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: Na update. **Placenta**, v. 25, p. S186-195, 2011. Supplement, 2.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 07-14, 2008.

ROBERTS, S. J. (Ed.). **Veterinary obstetrics and genital diseases**. Ann Arbor: Edward Brothers, 1986.

SAKURAGAWA, N.; ENOSAWA, S.; ISHII, T.; THANGAVEL, R.; TASHIRO, T.; OKUYAMA, T.; SUZUKI, S. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. **J. Hum. Genet.**, v. 45, p. 171-176, 2000.

SANGWAN, V. S.; BURMAN, S.; TEJWANI, S.; MAHESH, S. P.; MURTHY, R. Amniotic membrane transplantation: a review of current indications in the management of ophthalmic disorders. **Indian J. Ophthalmol**, v. 4, n. 55, p. 251-60, 2007.

SEMEDO, P.; COSTA, M. C.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; SHIMIZU, M. H. M.; SEGURO, A. C.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doença renal crônica. **Einstein**, v. 7, n. 4, pt. 1, p. 469-479, 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. **Anim Reprod Sci.**, v. 98, p. 2-22, 2007.

SORRELL, J. M.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Influence of adult mesenchymal cells on in vitro vascular formation. **Tissue Engineering Part A**, v. 15, n. 7, p. 1751-1761, 2009.

TAMAGAWA, T.; OI, S.; ISHIWATA, I.; ISHIKAWA, H.; NAKAMURA, Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. **Hum. Cell.**, v. 20, p. 77-84, 2007.

TERADA, N.; HAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI, M.; MASTALERZ, D. M.; NAKANO, Y.; MEYER, E. M.; MOREL, L.; PETERSEN, B. E.; SCOTT, E. W.; Bone marrow cells

adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v. 416, n. 6880, p. 542–545, 2002.

TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **J Pharmacol Sci.**, v. 105, n. 3, p. 215-228, 2007.

TRAN, S. D.; PILLEMER, S. R.; DUTRA, A.; BARRETT, A. J.; BROWNSTEIN, M. J.; KEY, S.; PAK, E.; LEAKAN, R. A.; KINGMAN, A.; YAMADA, K. M.; BAUM, B. J.; MEZEY, E. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. **Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1084–1088, 2003.

TROUNSON, A.; THAKAR, R. G.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, v. 9, p. 52, 2011.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol Reprod Dev.**, v. 78, n. 5, p. 361-373, 2011.

VEJLSTED, M. Gastrulation, body folding and coelom formation. In: HYTLEL, P.; SINOWATA, F.; VEJLST, M. **Essentials of domestic animal embriology**. China: Saunders, 2010. cap. falta n. do capítulo.

WALLINGTON, E. A. **Histology methods for bone**. London: Butterworths, 1972.

WEISSBERG, P. L.; QASIM, A. Stem cell therapy for myocardial repair. **Heart.**, v. 91, p. 696-702, 2005.

YEN, B. L.; HUANG, H. I.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 3–9, 2005.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal research**, v. 1, p. 3-14, 2006.

ZHAO, P.; ISE, H.; HONGO, M.; OTA, M.; KONISHI, I.; NIKAIDO, T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. **Transplantation**, v. 79, p. 528-535, 2005.

TROUNSON, A; PEBAY, A. A role for neurotrophins in embryonic **stem** cell growth. **Dev Cell**, 10(2):158-9, 2006.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. **Endocr Rev**, 27(2):208-19, 2006.