JOÃO LEONARDO RODRIGUES MENDONÇA DIAS

**Terapia celular do linfedema murino induzido utilizando células-
tronco de membrana amniótica humana**

São Paulo

2016

JOÃO LEONARDO RODRIGUES MENDONÇA DIAS

**Terapia celular do linfedema murino induzido utilizando células-
tronco de membrana amniótica humana**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Dr^a. Graciela Conceição Pignatari

Co-Orientador:

Prof^a Dr^a Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3431
FMVZ

Dias, João Leonardo Rodrigues Mendonça
Terapia celular do linfedema murino induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica humana / João Leonardo Rodrigues Mendonça Dias. -- 2016.
67 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Graciela Conceição Pignatari.

Co-orientador: Profa. Dra. Patricia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga

1. Linfedema. 2. Células-tronco. 3. Anexos embrionários. 4. Membrana amniótica. 5.

ERRATA

DIAS, J L R M. **Terapia celular do linfedema murino induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica humana.** [Cell terapy for induced murine lymphedema using human amniotic membrane stem cells]. 2016. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página		Onde se lê	Leia-se
Folha de avaliação		murinho	murino
Abstract		murinho	murino
Resumo		murinho	murino

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia celular de linfedema murino induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica", protocolado sob o nº 2953/2013, utilizando 24 (vinte e quatro) camundongos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Patricia 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 13/3/2013.

We certify that the Research "Cellular therapy of murine induced lymphedema using amniotic membrane stem cells", protocol number 2953/2013, utilizing 24 (twenty-four) mice, under the responsibility Profa. Dra. Patricia 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 3/13/2013.

São Paulo, 10 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: DIAS, João Leonardo Rodrigues Mendonça

Título: Terapia celular do linfedema murinho induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica humana

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: _____

DEDICATÓRIA

Aos animais que tiveram sua existência abreviada, por uma
experiência humana mais longa e confortável

AGRADECIMENTOS

Ao tempo, que mostrou a regularidade, fez perecer o vil enalteceu correto.

Ao Professor Doutor José Roberto Kfoury, em nome do qual agradeço a todos os professores que participaram da dessa jornada, guiando-nos por caminhos que sempre buscavam a luz. Agradeço pelo intenso esforço para manter o nosso programa e propiciar a inúmeros alunos como eu, a oportunidade de cursar uma pós-graduação de excelência.

A Doutora Rose Eli por dividir historias, petisco e lições, afastando a solidão da microscopia.

Ao amigo Ronaldo Agostinho, por nunca perder a “velha”. A velha mania de dar às Boas práticas laboratoriais, o compromisso merecido.

A eterna “Chefe da Pós” Daura, que nunca deixou de oferecer o abraço mais oportuno, nos momentos mais aflitos.

Agradeço a querida Jaquie, por toda a orientação, auxílios e favores no que diz respeito aos tramites burocráticos, inerentes ao processo.

Ana Paula (Paulinha), nossa colaboradora zelosa, que sempre fez o possível para garantir um ambiente limpo e saudável para todos.

Com carinho, agradeço aos colegas e amigos que fiz aqui, pelos exemplos dados na ação, bem como na falta dela. Nossas vidas se cruzarão por vezes, e os momentos felizes serão os que mais estarão em minha memória.

Dilayla, Rafael, Marcio, Greyson e Valdir pela ajuda com os protocolos.

Ao querido Diogo, pelas ternas sábias palavras de conforto nos momentos difíceis, pelas histórias de vida de pessoa madura e amante da ciência que é, e por dividir generosamente seus conhecimentos da bancada com quem quer que fosse, a qualquer tempo, momento e condição.

Meu querido Rennan, sou grato pelos 90% do tempo que você me irritou, mas saiba que nos outros 10% você foi decisivo. Te aguardo deste lado da porta.

Se eu tive um parceiro nas disciplinas mais insólitas, esse cara foi o Pedro, valeu por todos os textos deliciosos que tivemos de resenhar.

Aos Brothers do ICB-IV, pelo melhor carnaval de minha vida, por terem me acolhido na Odisseia da Nature, pelos socorros, ombros estendidos, conversas e risadas. Obrigado Carrrla, Davi, Carolzinha, Nagela, Cris e Professor Jean Pierre.

A Grande Família LCT/Fada/Zika, por anos incríveis que passei ao lado de vocês, por mais volátil que fosse nosso quórum, sempre compomos uma grande família, com “pai e mãe, irmão mais velho, caçula e o adolescente chato”. Agradeço a oportunidade de poder ter aprendido muitas coisas, assim como ensinado outras poucas. Gratidão Kátia, Cecília, Sueli, Fernanda, Laris, Cris(es), Nath e Isa. “Vocês se lembrarão do meu bocejo toda vez que a centrifuga parar”.

Anita te agradeço por nos mostrar de forma tão constante, a quão forte, protetora e obstinada, uma mãe pode ser por seu filho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Doutora Graciela Pignatari, por ter me aceito mesmo sem me conhecer, por dividir descobertas, por ter apostado suas fichas em mim (nem sempre de *all -in*), mas sempre contra as expectativas, por anos e anos, por me refinar, por reger minha singela erudição científica, por ler textos de madrugada, por dividir sua vida extra USP, e por aceitar que eu dividisse a minha também. É chegado o momento da separação, mas quem sabe é só um tempo de regozijo? Pois as pontes que a convivência constrói entre duas pessoas, não servem a terceiros, e nós sabemos que há uma bem sólida erguida entre nós.

Professora Doutora Patricia Braga, lhe serei eternamente grato por me ceder abrigo entre os seus. Pelas memoráveis aulas, assim como pela oportunidade do PAE, pelas discussões e reuniões científicas, lições sith e jedi, por considerar o histórico e o sobrepor ao mito, por acreditar que eu poderia ser útil na Odisseia Zika assim lembrando do meu nome.

Aos irmãos Berg e Felipe que sempre me serviram de faróis para que nunca me esquecesse de onde eu vim.

Raphael saiba que em muitas coisas eu me realizo através de você meu jovem padawan. O que é seu está guardado, então, vá buscar logo! Tenho muito orgulho de você.

Juliana, eu tenho uma teoria de que Deus mantém back-ups de anjos encarnados na terra, para que intercedam por nós (a mando Dele) nos momentos de necessidade e aflição. E essa minha teoria se baseia em poucas pessoas, e uma dela é você. Eu não tenho dúvida de que foi Ele que me apresentou a você.

Fabiele, você sabe que palavras nunca me faltaram ou foram problemas na minha fala, mas espero que você entenda que a simplicidade delas reflete a complexidade da situação. Tentando ser mais claro: O Senhor me deu milhares e milhares de irmãos, mas nunca tinha me dado uma irmã, até te conhecer.

Isabella gostaria muito que um dia você tivesse orgulho do seu “Dindo”.

Ao Chewbacca por sempre me receber com um longo abraço.

Camila minha noiva dedicada, cuidadora (e não cuidadosa), sempre disposta interceder pelas necessidades que por ventura viesse eu a passar ou qualquer outro que me fosse querido. Obrigado pelo café na manhã, pelas ligações ao longo do dia, por noites no sofá por um bem maior, pela cumplicidade, por cuidar do Chewbacca e sobretudo pela compreensão. Aguardemos pelos tempos de bonança.

Seu João, obrigado pela criação, pelo teto, alimento, saúde e cultura. Obrigado pelos valores e pelo exaustivo trabalho, que foi o tributo pago em detrimento do nosso convívio. Eu sei que o senhor nunca soube ao certo o que eu fazia, mas queria que soubesse que eu tentava fazer ciência, e que se tudo der certo, seu filho será “Dotô”.

Dona Noeli eu sei o quanto a senhora chorou por mim, sei que sempre teve medo de me perder, sei que me gerar, parir, amamentar e criar doeu, sei que sempre zelou pelo meu sono, saúde e educação, sei que minha dor era mais intensa do que se fosse em sua própria carne, sei que sempre fui posto em primeiro lugar, eu sei que você queria aquele pedaço de frango, e sei que mesmo a senhora sabendo de tudo isso, faria tudo de novo, obrigado.

Bel, acho que agora vai!

“O produto da não divisão da luz que sobre você incide,
não pode ser outro, se não sombras”

RESUMO

DIAS, J L R M. **Terapia celular do linfedema murinho induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica humana.** [Cell therapy for induced murine lymphedema using human amniotic membrane stem cells]. 2016. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Linfedema é uma condição crônica que predispõe a uma substancial morbidade e perda da função do órgão ou tecido afetado. Ele não tem cura e em longo prazo leva a dificuldades físicas e psicológicas ao paciente, tornando-se um grande desafio para os médicos. Infelizmente, é triste constatar que aproximadamente 400 anos após a descoberta dos vasos linfáticos, não há cura para o linfedema, sendo o tratamento baseado em drenagem linfática manual através de massagem e limitadas intervenções de fisioterapia, ambas visando redução do volume de edema, o que fornece alívio parcial para os indivíduos afetados que não garantem o desaparecimento da fibrose, aparentemente irreversível. Por isso, estudos que proporcionem novas intervenções, como a terapia celular com células-tronco, são de grande interesse. Neste trabalho tivemos como objetivo realizar terapia celular de linfedema murino utilizando células-tronco da membrana amniótica. Em um primeiro momento, a obtenção do modelo de insuficiência linfática foi feita com base em Tabibiazar et al., 2006 onde uma microablação de 2 mm em toda a circunferência foi feita na cauda do animal. Entretanto, após 30 dias de indução uma regressão espontânea foi observada inviabilizando a utilização deste modelo. Após vasta pesquisa na literatura outro modelo de indução de linfedema (Shimizu et al., 2012) foi encontrado, onde os autores fazem uma microablação cirúrgica, mantendo um flap de 4 mm na região ventral. Neste trabalho os autores obtiveram um linfedema estável por no mínimo 30 dias. Com base nestes achados, o modelo de linfedema murino induzido baseado em Shimizu foi realizado e após a comprovação desta estabilidade por 60 dias, esse modelo foi utilizado para indução do linfedema. Após esta caracterização, os animais que tiveram o linfedema induzido foram submetidos a terapia celular utilizando $0,5 \times 10^6$ células-tronco da membrana amniótica humana (MAh) ou saco vitelino canino (SVc) no momento da indução. Animais sem lesão, com lesão (SHAM) e tratados apenas com solução fisiológica (placebo) também foram analisados. O

monitoramento do linfedema na cauda foi feito através de acompanhamento clínico, registro fotográfico e mensura do diâmetro caudal a cada 2-3 dias. Ao final do estudo, os animais foram eutanasiados, tiveram suas caudas removidas e foram submetidos a avaliação dos efeitos terapêuticos da terapia celular através de análise do exsudato, análises histológicas (HE, picrossírius) e imuno-histoquímicas. A histológica obtida por coloração de HE além de apresentar o melhor resultado quando comparado com as demais técnicas, possibilitou avaliar as alterações patológicas pertinentes de cada amostra, revelando efeitos benéficos da terapia quando comparados com SHAM e placebo. Já, a coloração Picrossírius permitiu visualizar além das alterações estruturais, a inversão da predominância da expressão de colágeno do tipo I, por colágeno do tipo III nos tecidos estruturalmente comprometidos. O resultado do conjunto de análises das amostras apresentou o padrão linfedematoso esperado para os grupos SHAM e placebo, porém também mostrou um processo inflamatório muito menor e mais curto nos grupos MAh, e SVC, permitindo sugerir que a terapia celular causou um impacto favorável e os animais apresentaram resultados muito próximos aos padrões exibidos pelo grupo controle.

Palavras-chave: Linfedema. Células-tronco. Anexos embrionários. Membrana-amniótica. Terapia celular.

ABSTRACT

DIAS, J L R M. **Cell therapy for induced murine lymphedema using human amniotic membrane stem cells** . [Terapia celular do linfedema murinho induzido utilizando células-tronco de membrana amniótica humana]. 2016. 67f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Lymphedema is a chronic condition, which predisposes to substantial morbidity and loss of function of the affected organ or tissue. It has no cure and, in the long term, leads patients to physical and psychological problems, which is a major challenge for doctors. Unfortunately, it is sad to realize that, approximately 400 years after the discovery of the lymphatic vessels, there is no cure for lymphedema. The treatment is based on manual lymphatic drainage through massage and limited physiotherapy interventions. Both techniques aim at reducing the volume of the edema, which provides partial relief for affected individuals, but do not guarantee the disappearance of the fibrosis, which is, apparently, irreversible. Therefore, studies that provide new interventions, such as stem cell therapy, are of great interest. In this study, we carried out induced murine lymphedema using human amniotic membrane stem cells. At first, we obtained the model of lymphatic insufficiency based on Tabibiazar et al., 2006, in which a 2 mm microablation throughout the circumference was made in the tail of the animal. However, after 30 days of induction, a spontaneous regression was observed, making this model unusable. After extensive literature research, another model of lymphedema induction (Shimizu et al., 2012) was found. In this model, the authors perform a surgical microablation, maintaining a 4 mm flap in the ventral region. The authors obtained stable lymphedema for at least 30 days. Based on these findings, the model of induced murine lymphedema, based on Shimizu et al., 2012, was performed and, after proving this stability for 60 days, this model was used for the induction of murine lymphedema. After this characterization, the animals that have had induced lymphedema were subjected to cell therapy using 0.5×10^6 human amniotic membrane stem cells (MAh) or canine yolk sac (SVc) at the time of induction. Animals without lesion, with lesion (SHAM) and treated only with solution were also analyzed. The monitoring of lymphedema in the tail was done through clinical follow-up, photographic record and caudal diameter measurement every 2-3 days. At the end of the study, the

animals were euthanized, had their tails removed, and were subjected to evaluation of the therapeutic effects of the cell therapy through exudate analysis, histological analysis (HE, picosirius) and immunohistochemistry analysis. The histological obtained by HE staining, besides presenting the best result when compared to the other techniques, allowed to evaluate the pertinent pathological alterations of each sample, revealing beneficial effects of the therapy when compared to SHAM and placebo. Picosirius staining allowed to visualize, in addition to the structural alterations, the reversal of the predominance of type I collagen expression by type III collagen in structurally compromised tissues. The result of the sample analysis showed the expected lymphomatoid pattern for the SHAM and placebo groups, but also showed a much shorter and shorter inflammatory process in the MAh and SVc groups, suggesting that the cell therapy had an impact and the animals presented results very close to the standards presented by the control group.

Keywords: Lymphedema. Stem cells. Fetal stem cell. Amniotic membrane. Cell Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do modelo de indução de linfedema murino baseado no modelo proposto por Tabibiazar (TABIBIAZAR et al., 2006).....	29
Figura 2 - Esquema representativo do modelo de linfedema murinho utilizado neste trabalho baseado no modelo proposto por Shimizu (SHIMIZU et al., 2012).....	30
Figura 3 - Esquema representativo do modelo utilizado de Shimizu (Shimizu et al., 2012) destacando as medidas e porções avaliadas no projeto.....	35
Figura 4 - Fotografia dos passos para a indução de linfedema em camundongos Swiss.....	40
Figura 5 - Obtenção de Linfedema com lesão baseada na lesão em C e modelo de Shimizu et al., 2012 em camundongos Balb/C utilizando eletro-cautério.....	41
Figura 6 - Linfedema em camundongos Balb/C com eletrocautério.....	42
Figura 7 - Linfedema obtido utilizando o modelo de Shimizu et al., 2012 e a caneta cautermax em animais Balb/C.....	44
Figura 8 - Linfedema obtido utilizando o modelo de Shimizu et al., 2012 e a caneta Cautermax em animais C57/BL6.....	45
Figura 9 - Fotografias das caudas de animais no 21º dia de experimento.....	47
Figura 10 - Avaliação das mensurações utilizando a metodologia do cone truncado.....	48
Figura 11 - Extensão do exsudato das caudas de animais no 21º dia de experimento.....	50
Figura 12 - Análise histológica por coloração de HE das caudas após 21 dias de tratamento com células-tronco.....	52
Figura 13 - Análise por coloração de picrossíruis das caudas após 21 dias da terapia celular utilizando células-tronco.....	54
Figura 14 – Imunohistoquímica das caudas de animais no 21º dia de experimento.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	LINFEDEMA	17
2.2	TERAPIA CELULAR.....	20
2.3	CÉLULA-TRONCO	22
2.3.1	Célula-Tronco de Membrana Amniótica Humana	2424
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	ANIMAIS.....	28
3.2	OBTENÇÃO DO MODELO DE LINFEDEMA.....	28
3.2.1	Indução de linfedema murino com base no modelo proposto por Tabibiazar.....	29
3.2.2	Indução de linfedema murino com bae no modelo proposto por Shimizu.....	30
3.3	TERAPIA CELULAR.....	31
3.3.1	Cultivo e Expansão das Células-Tronco.....	31
3.3.1.1	Membrana Amniótica.....	31
3.1.1.2	Saco Vitelino.....	32
3.3.2	Preparo das Células-Tronco para terapia.....	32
3.3.3	Terapia Celular.....	33
3.4	AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO...34	
3.4.1	Análise Macroscópica.....	34
3.4.2	Preparação da amostras para análise.....	35
3.4.2.1	Por inclusão em parafina histológica.....	35
3.4.2.2	Por criostato.....	36
3.5	ESFREGAÇO DO EXSUDATO.....	37
3.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	37
3.6.1	Coloração das amostras por Hematoxilina e Eosina.....	37
3.6.2	Investigação do perfil de colágeno predominante na cauda pela técnica de picrossírius.....	38
3.7	ANÁLISE DO PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS VASOS LINFÁTICO...38	
4	RESULTADOS	400
4.1	MODELOS DE LINFEDEMA.....	40
4.1.1	Modelo Tabibiazar.....	40
4.1.2	Modelo Shimizu.....	42

4.3	Avaliação da terapia celular utilizando Células-Tronco.....	46
4.4	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	46
4.5	MENSURA VOLUMÉTRICA DA CAUDA.....	48
4.6	ESFREGAÇO DO EXSUDATO.....	49
4.7.1	Análise histológica das caudas.....	51
4.7.2	Investigação do perfil de colágeno predominante na cauda pela técnica de picrossírius.....	53
4.8	ANÁLISE DO PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS VASOS LINFÁTICOS..	55
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES.....	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Edemas ocasionados pelo desequilíbrio do balanço hídrico, e pela deficiência da captação e transporte do líquido intersticial ou mesmo pela ausência dos fatores agonistas para a coleção e condução desse líquido, recebem o nome de linfedema, onde essa condição normalmente crônica resulta na tumefação da região afetada podendo culminar na perda da função (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003).

Pacientes submetidos a cirurgias, especialmente de caráter oncológico envolvendo a remoção de linfonodos ou que sofreram injúria mecânica e populações de regiões endêmicas de filariose, compõe o maior número de pacientes acometidos por linfedema, uma vez que todas essas condições dificultam ou até mesmo interrompem a drenagem da linfa resultando no edema (HADAMITZKY; PABST, 2008).

Até o momento, não existem tratamentos eficazes que sejam capazes de promover a remissão completa do linfedema e apenas são empregadas técnicas fisioterapêuticas relativamente antigas que visam apenas diminuir o edema formado, como é o caso da drenagem linfática, que através de compressões físicas auxiliam a captação e consequente condução do líquido intersticial. A necessidade crescente de se estabelecer um tratamento efetivo para o linfedema contribui para a execução de pesquisas com essa intenção, aliado a proposta de se utilizar modelos animais para esse fim (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; SCHNEIDER et al., 2006; CONRAD et al., 2009). A viabilização da descoberta de novas estratégias terapêuticas em doenças variadas muitas vezes é feita utilizando modelos animais que mimetizem de alguma forma a condição da doença. A indução de linfedema não é algo novo, mas sempre foi um desafio para muitos cientistas. Atualmente, o modelo mais adequado de linfedema é o modelo de insuficiência linfática adquirida em camundongos (SCHNEIDER et al., 2006). Historicamente, os primeiros modelos foram feitos em cães por terem maior semelhança aos humanos, pois, acreditava-se na obtenção de um modelo mais confiável e eficaz, mas um efeito contrário foi observado e os modelos tinham uma grande incapacidade de reprodução da doença. Além disso, a interposição de corpos estranhos pode provocar a quebra da ferida e muitas vezes impediram o uso dos animais devido a sua debilidade brutal.

A maioria dos experimentos realizados era feita utilizando técnicas cirúrgicas, radioterápicas ou toxicológicas. Além de cães outros animais também foram utilizados como ratos, coelhos e camundongos (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; HADAMITZKY; PABST, 2008).

No cenário da medicina mundial, a terapia celular usando células-tronco surge como uma esperança para o tratamento das doenças que não possuem tratamento efetivo. A descoberta de que estas células podem estar presentes em diversos tecidos, por exemplo, na medula óssea do adulto ou no cordão umbilical de um recém-nascido, e que mantém a capacidade de diferenciar-se em outros tecidos, como o muscular ou nervoso, é uma das características mais atraente destas células. Além disso, quando se pensa em terapia celular, as células-tronco possuem uma propriedade imunomoduladora muito importante, que permite o emprego de células em espécies distintas à da matriz doadora sem que ocorram ações deletérias como é o caso da rejeição entre doador e receptor de material biológico. Por essas características, um enorme esforço em vários grandes centros de pesquisa espalhados pelo mundo vem sendo feito no intuito de elaborar, testar e aplicar protocolos que sejam terapeuticamente eficazes.

As células-tronco derivadas de membrana amniótica humana possuem características comuns às CTM, como multipotência, clonogenicidade, proliferação e capacidade imunomodulatória, entre outras, (INSAUSTI et al., 2014; SAHARINEN et al., 2004; ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005) o que vem estimulando o isolamento em diferentes espécies bem como a sua utilização na terapia celular.

Com base na literatura e nos efeitos benéficos das células-tronco esse projeto teve como objetivo utilizamos células-tronco para o tratamento do linfedema utilizando um modelo murino de linfedema.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LINFEDEMA

O sistema vascular linfático é importante para a vigilância imune, homeostase dos líquidos teciduais e absorção de gordura, e está envolvido em muitos processos patológicos, incluindo metástases tumorais e linfedema. Sua função como via de condução para células imunes e excesso de líquido intersticial é conhecido há mais de um século, mas os mediadores moleculares envolvidos na linfangiogênese a formação de novos vasos linfáticos permaneceram parcialmente desconhecidos (SAHARINEN et al., 2004; ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005).

O linfedema é uma condição crônica e incessante que predispõe a uma substancial morbidade e perda da função de órgãos em que o desequilíbrio da microcirculação é resultado da perda da capacidade do transporte linfático (SZUBA; ROCKSON, 1998; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003). Esta alteração pode ocorrer como uma manifestação de malformações hereditárias dos vasos linfáticos, como resultado de infecção (parasitária) ou como resultado de ruptura traumática ou pós-cirúrgica dos vasos linfáticos e linfonodos (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; SZUBA; ROCKSON, 1998). É uma doença que não tem cura e em longo prazo leva a dificuldades físicas e psicológicas para o paciente, se tornando um grande desafio para os médicos (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003), sendo a conduta médica atual preconizada dependente de massagem manual com drenagem linfática e procedimentos relacionados a fisioterapia para redução do volume de edema, as quais não reverterem a fibrose produzida em função do linfedema (MACLELLAN; GREENE, 2014).

A visão clássica aponta que o déficit do transporte do líquido intersticial produzido, bem como as proteínas acumuladas, origina o edema que resulta num desconforto, podendo culminar na perda da função do órgão afetado. A mudança da estrutura tecidual devido ao aumento da pressão oncótica representa uma condição que eleva a necessidade de atenção, uma vez que a condição crônica do linfedema pode resultar em alterações funcionais dos tecidos mais profundos do membro

afetado (SCHNEIDER et al., 2006; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003). Em casos crônicos, pode haver um acúmulo de adipócitos, queratinócitos e fibroblastos, resultando na metaplasia tecidual, transformando a região edemaciada numa massa dura fibrótica passiva de degeneração gordurosa e de hiperqueratinização da pele, contudo, o aumento da deposição do tecido adiposo não é relacionado com as bases moleculares lipídicas, ou a estas estão associadas (SZUBA; ROCKSON, 1998; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005; SEDGER et al., 2016).

A deficiência no tráfego linfático resulta na queda da circulação das células apresentadoras de antígenos (APC), bem como outras células do sistema imunológico junto aos gânglios linfáticos, ocasionando na queda da eficiência do sistema imunológico, aumentando assim a condição de suscetibilidade do hospedeiro para que ocorram ações com antígenos estranhos. Dessa forma, os tecidos que afetados pelo linfedema encontram-se mais suscetíveis a infecções e inflamações (ALITALO; TAMMELA; PETROVA, 2005; SCHNEIDER et al., 2006; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; SZUBA; ROCKSON, 1998). Outra característica que convém ressaltar é a possibilidade de colapso que pode ocorrer na circulação do membro afetado devido ao espessamento dos tecidos, agravando ainda mais a condição deste, o que pode resultar na necessidade de amputar o mesmo (SCHNEIDER et al., 2006; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003). Além da recondução das proteínas e do líquido intersticial para a circulação venosa, o sistema linfático representa a função primordial para a resposta imunológica, transportando ao longo de seus ductos as células que o compõem, contudo este mesmo tráfego pode ser utilizado para que células tumorais alcancem tecidos distintos aos de sua origem, podendo assim ocorrer a metástase (HADAMITZKY; PABST, 2008; CONRAD et al., 2009).

A classificação do linfedema pode ser dividida em: linfedema primário e linfedema secundário. O linfedema primário ainda pode ser subdividido de acordo com a forma de sua manifestação inicial, dessa forma temos: congênita, forma que aparece até o segundo ano; precoce, quando aparece após a infância, ou de forma menos recorrente até o trigésimo ano de vida e o tardio, que pode acometer um indivíduo após o trigésimo quinto ano de vida. Ao passo que o linfedema secundário possui prevalência mais alta e ocorre após a obliteração dos vasos linfáticos como consequência de intervenções cirúrgicas, radioterapias, traumas mecânicos ou infecções.

A ocorrência de linfedema em países desenvolvidos, em sua grande maioria, é atribuída a cirurgias de cunho oncológico, especialmente as que se referem a neoplasias de vulva (20 a 49%), mama (30%), cérvix uterina (20 a 39%) e também em casos de melanomas de extremidades (20%), sendo que esses índices variam, de acordo com a metodologia utilizada no momento do diagnóstico. Várias propostas para condutas cirúrgicas têm sido preconizadas ao longo da história, sempre com o intuito de diminuir a incidência de linfedema, contudo, nenhuma apresentou resultados realmente eficazes ao longo desse período (HADAMITZKY; PABST, 2008; RIDNER, 2013; YOSHIDA et al., 2015).

Para aumentar a chance de sucesso, bem como o tempo de sobrevivência dos pacientes submetidos à cirurgia oncológica é necessária a remoção dos linfonodos gerando interrupção da drenagem linfática e, com isso, o organismo falha em transportar a carga linfática completa e o linfedema ocorre. Naqueles pacientes onde as cirurgias consistem na retirada de muitos linfonodos há necessidade de pós-operatório quimioterápico e radioterápico aumentando assim a taxa de desenvolvimento de linfedema (HADAMITZKY; PABST, 2008; SZUBA; ROCKSON, 1998). Convém ressaltar que mais do que um milhão de mulheres ao redor do mundo desenvolve câncer de mama a cada ano (SCHNEIDER et al., 2006). Para a maioria delas o único tratamento é a remoção cirúrgica da mama uma vez que, esta doença é potencialmente mortal. Como as células do câncer de mama se espalham através dos vasos linfáticos, no momento em que a mama é ressecada, gânglios linfáticos locais envolvidos na axila e parte da rede linfática axilar são geralmente removidos e consequentemente a drenagem da linfa é frequentemente interrompida, causando inchaço do braço devido ao acúmulo de linfa (linfedema). O edema de braço após a intervenção cirúrgica de câncer de mama é a causa mais comum de linfedema nos EUA (RIDNER, 2013).

Além disso, doenças infecciosas e genéticas também podem levar ao linfedema, assim como determinadas ocupações profissionais. Uma grande incidência de linfedema secundário pode ser atribuída a filariose, uma infecção causada por um verme parasita que atinge mais de 90 milhões de pessoas no país (SCHNEIDER et al., 2006; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003; FARJADO, 2015). As doenças genéticas também podem desenvolver linfedema como patologias secundárias, e a exemplo disso, podemos citar os cães da raça *Golden Retriever* portadores de distrofia muscular (GRMD). Estes cães apresentam linfedema e agenesia dos linfonodos e são

um modelo animal natural de linfedema, importantes para o estudo de terapias (BERETTA et al., 2010).

As características moleculares da linfogênese não estão totalmente descritas, e parte dessa porção pode ser atribuída à sobreposição dos marcadores endoteliais linfáticos aos marcadores endoteliais que compõem os vasos, bem como pela ausência de marcadores específicos para células linfáticas (SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003). Avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares da doença e os sinais adjuntos das alterações resultantes dos processos inflamatórios poderão proporcionar novas condutas para o tratamento do linfedema, porém a falta de um modelo experimental fidedigno tem sido uma barreira a ser vencida. Nos dias atuais, o modelo mais adequado é o modelo de insuficiência linfática adquirida em camundongos (SCHNEIDER et al., 2006), mas historicamente, os primeiros modelos foram feitos em cães por terem maior semelhança aos humanos. A maioria dos experimentos realizados era feita utilizando técnicas cirúrgicas, radioterápicas ou toxicológicas. Além de cães, ratos, coelhos e camundongos também foram utilizados (HADAMITZKY; PABST, 2008; SHIN; SZUBA; ROCKSON, 2003).

2.2 TERAPIA CELULAR

A terapia celular usando células-tronco emergiu nos últimos anos no cenário da medicina mundial como uma nova esperança para o tratamento de doenças genéticas ou adquiridas ainda sem tratamento efetivo. A descoberta de que células ainda não-diferenciadas ou células-tronco presentes em diversos tecidos, por exemplo, na medula óssea do adulto ou no cordão umbilical de um recém-nascido, mantém a capacidade de diferenciar-se em outros tecidos, tais como o muscular ou nervoso, abriu novas esperanças de tratamento para diversos tipos de doenças, como a distrofia muscular progressiva, lesões raquimedulares, assim como doenças com características imunomodulatórias (TARAN et al., 2014).

Um enorme esforço em vários grandes centros de pesquisa espalhados pelo mundo vem sendo feito no intuito de elaborar, testar e aplicar protocolos que sejam

terapeuticamente eficazes para estes tipos de doenças, sendo que neste projeto pretendemos realizar a terapia celular para o tratamento do linfedema. Células-tronco já foram utilizadas com sucesso para o tratamento de linfedema murino induzido (CONRAD et al., 2009; SHIMIZU et al., 2012), porém, outros tipos celulares devem ser analisados uma vez que cada fonte celular pode ter uma especificidade em relação ao tratamento.

Apesar do enorme intento das pesquisas que voltadas para lesões linfedematosas, vários são os vieses apresentados por essa doença, sendo que uma condição que imprime uma enormemente limitação para o enxerto linfático, é a competência das válvulas intraluminais, que possivelmente por uma conformação estrutural inadequada, não apresenta a eficácia necessária no desempenho de sua função (KANAPATHY et al., 2014).

Além disso, a terapia celular e a engenharia tecidual tem se apresentado como técnicas de manejo combinatório de componentes celulares, bem como seus *scaffolds* para otimização da recepção de sinais moleculares apropriados de grande potencial no tratamento de linfedema secundário e reabilitação do vaso linfático danificado (KANAPATHY et al., 2014).

Contudo, é sabido que a terapia celular empregando células-tronco de diferentes linhagens pode resultar na redução de infiltrado inflamatório, interleucinas, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e citocinas, assim como outros sinalizadores comuns à inflamatória ou a deposição de colágeno no processo de instalação da fibrose, é possível aferir o aumento dos níveis dos fatores de necrose tumoral e do fator pró-linfangiogênico VEGF-C, bem como a modulação da expressão de linfócitos de diferentes linhagens, como CD4+, CD8, CD25+, células dendríticas e células T-Helper (ZAMPELL et al., 2012; MOODLEY et al., 2013; VIITANEN et al., 2015). Dentro de um futuro próximo, é possível que a terapia celular promova resultados mais significativos em condições patológicas que atualmente só contam com ações paliativas. Sendo que o domínio das habilidades que empregam a medicina regenerativa pode vir tanto a promover a linfangiogênese como a podem auxiliar a otimização dos vasos linfáticos ainda preservados na região lesionada (YOSHIDA et al., 2015).

2.3 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco (CT) se distinguem de outras células do organismo por apresentarem três características: são indiferenciadas, capazes de se multiplicar por longos períodos através da divisão celular e também de se diferenciar, ou se transformar em células especializadas com funções específicas, como por exemplo, uma célula cardíaca ou nervosa. As CT podem ser classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação em: 1) totipotentes, formadas durante a fertilização até o estágio de 8 células, podem produzir qualquer tipo celular no organismo incluindo os anexos embrionários; 2) pluripotentes ou células-tronco embrionárias (CTE): presentes na massa celular interna do blastocisto (MCI), apresentam a capacidade de se diferenciarem nos tipos celulares provenientes dos 3 folhetos embrionários; 3) multipotentes ou mesenquimais (CTM) ou tronco-adultas (CTA) são aquelas capazes de se diferenciarem em alguns tipos celulares específicos, ou seja, possuem plasticidade limitada; e por fim, as 4) unipotentes, que são células progenitoras que irão se diferenciar em apenas um tipo celular.

As CTA ou CTM foram isoladas pela primeira vez em 1970 por Frieddstein a partir de material derivado de medula óssea que dispunham de capacidade de formar colônias *in vitro*, contendo células com morfologia semelhante a fibroblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1974). Com o passar do tempo diferentes fontes foram isoladas com o objetivo de obter outras células-tronco e muitas características foram sugeridas para que as mesmas fossem classificadas como tal. Para que houvesse então uma padronização, em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular, definiu que as Células-Tronco Mesenquimais (CTM) quando em cultura devem: ser aderentes ao plástico, expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD34, CD45, CD14, CD79A e HLA-DR, e diferenciar-se em condroblastos, osteoblastos e adipócitos quando cultivadas *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Contudo, ainda não estão completamente elucidadas todas as características biológicas deste grupo celular, bem como os mecanismos envolvidos para sua ação imunomoduladora (INSAUSTI et al., 2014). Ainda no grupo das células-tronco adultas (CTA) é possível destacar as chamadas células-tronco pós-natais ou fetais (CTF), que podem ser

isoladas do cordão umbilical, placenta, membrana amniótica, saco vitelino (animais) e do alantóide ou ainda em fetos provenientes de material abortivo em humanos ou animais (CAPLAN, 2000; CAPLAN; BRUDER, 2001; CAPLAN; CAPLAN, 2005; WATT; GULLO; GARDE, 2013).

As CTF apresentam características similares as CTM, porém receberam essa denominação por se encontrarem no período fetal do desenvolvimento embrionário quando coletadas. Estas células podem oferecer algumas vantagens para aplicação terapêuticas em substituição as células-tronco adultas e embrionárias (MARCUS et al., 2008), devido a características como a alta plasticidade, e a rápida proliferação (MIKI et al., 2005), e sendo que elas se localizam na interface materno-fetal, podem ter características diferentes e mais propícias para serem utilizadas em transplantes, por possuírem baixa resposta imunológica (MIHU et al., 2009). Além disso, as CTF são uma fonte de células-tronco ainda pouco exploradas, facilmente acessíveis a partir de tecido extra-embrionários que geralmente são descartados após o nascimento (MANUEL PILLAI et al., 2011).

Os anexos embrionários, âmnio, córion, alantóide e saco vitelino, estão presentes durante o desenvolvimento dos vertebrados, sendo mais desenvolvidos dentre os vivíparos. Embora a oviparidade e a viviparidade estejam nas duas extremidades dos modelos reprodutivos dos vertebrados, estas estruturas estão associadas a ambos e apenas o saco vitelino está presente em todas as espécies (MOSSMAN, 1987).

Estes anexos são estruturas derivadas do zigoto, mas quase nada contribuem para a formação do embrião sendo, apenas a parte dorsal do saco vitelino incorporada e, posteriormente formará o revestimento epitelial do intestino já, o alantóide está relacionado com a formação da bexiga e do úraco (LAROCCA et al., 2008)(GARCIA et al., 1991).

Como sabemos, o saco vitelino desempenha importantes funções durante o desenvolvimento, tais como: nutrição do embrião, síntese protéica, atividade fagocitária, transferência de materiais e hematopoiese.

Além disso, nosso grupo isolou e caracterizou células-tronco fetais do saco vitelino de cães demonstrando que estas células constituem uma fonte excelente e alternativa de células-tronco para serem aplicadas à Medicina Veterinária Regenerativa.

Como o primeiro local de formação de células sanguíneas nos estágios iniciais da embriogênese é o saco vitelino levantou-se a hipótese que estas células-tronco seriam capazes de originar os glóbulos vermelhos e brancos, bem como, o tecido das veias, artérias e capilares, poderiam estar presentes nesse anexo. Assim, essas células podem ter um amplo espectro de aplicações, entre elas a reconstituição de um sistema hematopoiético deficiente ou destruído, a construção de modelos animais para a produção de células sanguíneas e anticorpos humanos, a realização de testes de doenças humanas, função imune, vacinas, drogas e imunoterapia e outras aplicações. Devido essas características o saco vitelino foi utilizado em paralelo a membrana amniótica.

2.3.1 Células-Tronco de Membrana Amniótica Humana

Recentemente, novas fontes de células-tronco mesenquimais têm se mostrado eficientes, tais como aquelas derivadas de membranas fetais, sendo facilmente obtidas não invasivamente como as da membrana amniótica da placenta ao término da gestação (MANUELPILLAI et al., 2011; ZHOU et al., 2014; QI; PAN, 2015).

A membrana amniótica representa a mais interna das duas membranas fetais que circundam o feto durante gestação. Essa membrana fina e avascular, não possui inervações ou musculatura e permeia a cavidade amniótica, sendo banhada e nutrida pelo fluido amniótico (OKAZAKI et al., 1981). É composta por duas populações celulares distintas: células epiteliais de membrana amniótica humana (hAEC), que são células cubóides a colunares que formam uma monocamada delineando a membrana, em contato direto com o fluido amniótico, e células mesenquimais estromais da membrana amniótica humana (hAMSC), que estão dispersas em uma matriz extracelular composta de colágeno e laminina, e são derivadas do mesoderma extraembrionário. Ambos os tipos celulares se originam durante os estágios de pré gastrulação da embriogênese, antes do delineamento das três camadas germinativas primárias (MIKI et al., 2005; PAROLINI et al., 2008).

A membrana amniótica exhibe propriedades anti-inflamatórias assim como antibióticas, sendo que essas características associadas com a ausência ou a baixa

imunogenicidade conduziram estudos que levaram o uso clínico da membrana amniótica como procedimento curativo para diversas lesões da derme e epiderme (CIRMAN et al., 2014). 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 (GRINFELD; GOMES, 2004). 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). Contudo, há alguns anos, um novo foco vem surgindo para a utilização das células originadas dessa membrana, como a utilização em medicina regenerativa em transplantes alogênicos e xenogênicos (SAKURAGAWA et al., 2004).

Culturas celulares derivadas do âmnion demonstraram capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica (MA et al., 2014). Posteriormente, a capacidade de diferenciação das células da membrana amniótica em linhagens miogênicas, neurogênicas e condrogênicas também foram demonstradas (PORTMANN-LANZ et al., 2006). Importante ressaltar que as células-tronco de membrana amniótica não induzem a formação de tumores ou infecções virais, podem inibir a maturação de células monocitárias e células dendríticas (Magatti, 2015) e proporcionam um alto rendimento em cultura. Uma cultura tipicamente rende entre $150-200 \times 10^6$ células-tronco de epitélio amniótico e $20-50 \times 10^6$ células-tronco mesenquimais amnióticas (TODA et al., 2007, König 2015).

Em relação às células provenientes da membrana amniótica humana, elas expressam o marcador de pluripotência Oct-4 (ZHOU et al., 2014), marcadores do antígeno de histocompatibilidade principal HLA (MIHU et al., 2009), marcadores de células nervosas como neurofilamentos, proteínas gliais fibrilares e de células progenitoras neurais. A capacidade de diferenciação das células derivadas de membrana amniótica de humanos foi avaliada e foi possível observar que estas 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 (MIKI et al., 2005; PAROLINI et al., 2014; MAGATTI et al., 2016).

Em protocolos que visavam avaliar o potencial terapêutico das células-tronco de membrana amniótica em doenças neuronais, demonstraram que após enxerto intracerebral em ratos portadores de Parkinson, ocorreu a diferenciação em células neuronais, bem como síntese e liberação de catecolâminas e fatores neurotróficos (UCHIDA et al., 2000). Em ensaios para a reconstrução de lesões em ducto biliar, foram células-tronco de membrana amniótica sendo que as células foram inoculadas em cães, que após 6 semanas apresentaram uma camada de endotélio amniótico no local da administração (MA et al., 2014).

Outros experimentos de terapia celular usando células-tronco de membrana amniótica mostraram-se promissores, como a capacidade de diferenciação em hepatócitos e consequentemente a expressão de albumina (TAKASHIMA et al., 2004), inibição *in vitro* da medula óssea na proliferação de linfócitos-T em cocultura (ZHOU et al., 2014), diferenciação em cardiomiócitos expressando miosina (TANAKA et al., 1999). Além disso, a capacidade de diferenciação em células β pancreáticas também foi realizada seguida da aplicação *in vivo* em ratos portadores de diabetes demonstrou que os níveis séricos de glicose permaneceram normalizados por até 6 semanas após o tratamento (MIHU et al., 2009; MAGATTI et al., 2016), entre outros.

Além de possuírem características de células-tronco mesenquimais elas também possuem as propriedades regenerativas, imunomoduladoras e secretam fatores solúveis importantes no tratamento de patologias inflamatórias e fibróticas como fatores angiogênicos, anti-inflamatórios entre outros que podem ser importantes no tratamento do linfedema (PAROLINI et al., 2008). O potencial angiogênico das células de membrana amniótica foi comprovado fato este já era esperado, uma vez que são originadas do epiblasto, que por sua vez originam todas as camadas embrionárias (PAROLINI et al., 2008; MAGATTI et al., 2016).

Estudos recentes concluíram que as células-tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica constituem unidades promissoras para revascularização terapêutica de tecidos isquêmicos e para o suporte de vasos e formação de tecidos,

liberação de fatores solúveis que prolongam a sobrevivência de células endoteliais (FUNCTION et al., 2015)).

Estudos utilizando as células derivadas da membrana amniótica têm demonstrado que estas células possuem a capacidade de suprimir as respostas imunes, induzir tolerância e reverter o dano inflamatório. Alguns estudos pré-clínicos utilizando estas células na terapia celular demonstraram que os efeitos não estavam relacionados com a transdiferenciação de células derivadas destas células em outros tipos de células, mas sim na liberação de moléculas tróficas e anti-inflamatórias constituindo efeitos imunomoduladores destas células derivadas da membrana amniótica em ativar uma resposta inflamatória e permitir remodelação de tecidos após uma lesão, resultando na redução do número de fibroblastos e menos cicatrizes nos diferentes órgãos avaliados, tais como a medula espinhal, fígado e pulmão, independentemente do tipo de lesão. Apesar disso ainda muito deve ser estudado em relação a seu papel em doenças inflamatórias (INSAUSTI et al., 2014).

Dessa forma, as células-tronco de membrana amniótica são atraentes para o tratamento do linfedema murino, uma doença inflamatória que compromete muitos indivíduos e ainda não tem cura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse trabalho foi dividido em 4 etapas: 1) Padronização do modelo de linfedema murino; 2) Expansão das células-tronco; 3) Tratamento do linfedema murino induzido com células-tronco de membrana amniótica e saco vitelino de cães; 4) Avaliação do tratamento.

3.1 ANIMAIS

Este projeto de doutorado foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o documento em anexo (CEUA/Vet nº 2953/2013).

Os camundongos Swiss, Balb/C e/ou C57/BL-6 foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em gaiolas plásticas forradas com maravalha de pinus autoclavada, em ambientes climatizados com temperatura controlada a 22°C e ciclo de iluminação de 12 em 12 horas. Em cada gaiola havia no máximo 6 animais da mesma idade. Os animais receberam ração (Nuvital, PR, BR) e água filtrada e autoclavada em bebedouros com canudo longo *ad libitum*.

3.2 OBTENÇÃO DO MODELO DE LINFEDEMA

Os animais selecionados foram submetidos a protocolos de indução ao linfedema como mostrado a seguir:

3.2.1 Indução de linfedema murino com base no modelo proposto por Tabibiazar

Os animais receberam sedação química em quantidade de aproximadamente de 50mg/kg de cetamina (Syntec, SP, BR) e 5mg/kg de Midazolam (Ceva, SP, BR) na mesma seringa completando com 1mL de solução fisiológica pela via intraperitoneal (PAIVA, MAFFILI, SANTOS, 2005). Após assepsia com álcool 70%, a área para realização do procedimento foi demarcada com base no procedimento descrito por Tabibiazar (TABIBIAZAR et al., 2006). Para tanto, a ablação foi feita com uma distância de 10mm da base da cauda e de aproximadamente 2 mm, utilizando o eletrocautério (Transmai, SP, BR) em potência 4 até completar a circunferência total da cauda previamente demarcada.

Figura 1 – Esquema representativo do modelo de indução de linfedema murino baseado no modelo proposto por Tabibiazar (TABIBIAZAR et al., 2006).

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

Após a indução, os animais foram fotografados e tiveram suas caudas mensuradas por paquímetro a cada 2-3 dias, na distância de 10mm após a ablação. Ao final do período de 30 dias, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes do CEUA/Vet e as caudas foram submetidas a análises histológicas.

3.2.2 Indução do Linfedema murino com base no modelo proposto por Shimizu

Para obtenção do linfedema murino com base no modelo proposto por Shimizu (SHIMIZU et al., 2012) uma ablação foi de 2mm foi realizada após 10mm da base da cauda e um flap de 4mm foi mantido na região ventral (Figura 2).

Em um primeiro momento, as ablações foram feitas utilizando eletro-cautério. Em seguida, o eletro-cautério foi substituído por uma caneta cautério de alta temperatura (Cautermax®, Fabijec, SP, BR) e por último foi substituído pela de baixa temperatura (Bovie® Aaron Med. Corp, FL, EUA),

Figura 2 – Esquema representativo do modelo de linfedema murinho utilizado neste trabalho baseado no modelo proposto por Shimizu (SHIMIZU et al., 2012).

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

Além disso, para esse experimento foram utilizados animais das linhagens Balb/C e C57/BL6.

Após a indução, os animais foram fotografados e tiveram suas caudas mensuradas por paquímetro a cada 2-3 dias, e os valores aferidos nas distancias de

10 e 20mm após o local da lesão foram inseridos na formula de cone-truncado (vide item 3.4.1 de materiais e métodos.

3.3 TERAPIA CELULAR

Após a padronização do modelo de linfedema murinho os animais foram submetidos a terapia celular utilizando células-tronco de membrana amniótica humana e saco vitelino canino.

3.3.1 Cultivo e Expansão das Células-Tronco

3.3.1.1 Membrana Amniótica

As células-tronco de membrana amniótica humana (MAHum) foram gentilmente doadas pela Profa. Dra Ornella Parolini da Universidade de Brescia na Itália e foram enviadas congeladas, mantidas em gelo seco em quantidades adequadas até chegar ao Brasil. Imediatamente após o recebimento as células foram colocadas e mantidas em tanques de nitrogênio líquido até o momento do descongelamento.

As células-tronco de membrana amniótica humana que estavam armazenadas no nitrogênio líquido foram submetidas ao processo de descongelamento rápido. Após descongelamento rápido, as células foram mantidas em meio DMEM low glicose (LGC Biotecnologia, SP, BR), acrescido de 10% de soro fetal bovino (Life Technologies, CA, EUA) e 1% de solução de antibiótico e antifúngico (100U/mL penicilina, 100µg /mL estreptomicina, 0,5 µg/mL de anfotericina - Sigma-Aldrich, SL,

EUA). As células foram expandidas e congeladas até que atingissem aproximadamente o número de células para a totalidade do experimento.

3.3.1.2 Saco Vitelino

As células-tronco de saco vitelino de cão obtidas de animais SRD com 42 dias de gestação que estavam congeladas e armazenadas no nitrogênio líquido foram submetidas ao processo de descongelamento rápido. As células após descongelamento rápido foram mantidas em meio α -MEM acrescido de 15% de soro fetal bovino definido (Hyclone), 1% de Aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 1% de solução de antibiótico e antifúngico (Sigma-Aldrich) e 1% de L-Glutamina (Invitrogen).

3.3.2 Preparo das Células-tronco para Terapia

As células-tronco de membrana amniótica humana ou saco vitelino de cão antes de serem utilizadas na terapia celular foram submetidas a análise da presença de micoplasma seguindo protocolo descrito por Roulland et al., 1994 e, Uphoff, Drexler 2014.

Momentos antes da injeção, as células-tronco de membrana amniótica humana (P5) e de saco vitelino canino (P8) foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich) e tripsinizadas com *Tryple Express* (Life Technologies) por 5 min. Após descolamento celular, as células foram ressuspensas, inativadas com SFB e lavadas duas vezes com PBS para eliminação do SFB. Após a segunda lavagem, as células foram submetidas a contagem e ressuspensas em um volume de 20 μ L de solução fisiológica e foram imediatamente levadas em gelo ao Biotério IPEN, local onde os animais foram mantidos.

3.3.3 Terapia Celular

Para a execução de todos os ensaios envolvidos no experimento de terapia celular, foram utilizados animais da linhagem C57/BL6, e todos os grupos experimentais abaixo e o protocolo utilizado para essas análises foi o modelo proposto por Shimizu et al., 2012.

Com o intuito de comparar os efeitos terapêuticos das células-tronco derivadas de membrana amniótica humana e de saco vitelino, foram criados os seguintes grupos:

Grupo Controle – Animais que receberam apenas manipulação e nenhum procedimento cirúrgico;

Grupo Placebo – Animais que receberam apenas 20μL de solução fisiológica após o procedimento de indução ao linfedema;

Grupo SHAM – Animais submetidos ao protocolo de indução ao linfedema e nenhum tratamento;

Grupo MAh – Animais que receberam 20μL de suspensão celular, contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ de células-tronco derivadas de Membrana Amniótica após a indução ao linfedema;

Grupo SVc – Animais que receberam 20μL de suspensão celular, contendo aproximadamente $0,5 \times 10^6$ de células-tronco derivadas de Saco Vitelino;

Para o experimento de terapia celular, as células-tronco ou solução fisiológica foram injetadas 20μL em número aproximado de $0,5 \times 10^6$, imediatamente após a indução da lesão, em um intervalo compreendido de aproximadamente de 10mm abaixo da lesão.

3.4 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO

Após a indução, os animais foram fotografados e tiveram suas caudas mensuradas por paquímetro a cada 2-3 dias, e os valores aferidos nas distâncias de 10 e 20mm após o local da lesão, foram inseridos na fórmula de cone-truncado. Ao final do período de 21 dias, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes do CEUA/Vet e as caudas foram submetidas a análises histológicas, realizadas coloração de HE, Picrossírius, esfregaço do exsudato caudal, bem como foi realizada imuno-histoquímica com emprego de marcador específico para vasos linfáticos anti Lyve-1.

3.4.1 Análise Macroscópica

O monitoramento das caudas, bem como o registro fotográfico e a mensura do diâmetro caudal com o emprego de paquímetro digital foi realizada a cada 2 ou 3 dias após 10 e 20mm do local da lesão (Figura 3, seta vermelha), ou ainda de acordo com as necessidades que se apresentaram durante a execução dos protocolos.

Os valores aferidos nos momentos da medição foram inseridos na fórmula de “cone-truncado” baseado em ZAMPELL et al., 2012 sendo, definido pela seguinte equação:

$$Vt = \frac{\pi \times ht}{3} \times (R^2 + R \times r + r^2)$$

Onde: Vt corresponde ao volume total, ht ao intervalo entre as duas medições, R ao raio maior e r ao raio menor.

Ao final do período de 21 dias, os animais foram eutanasiados seguindo as diretrizes do CEUA/Vet e as caudas foram divididas em 2 porções: medial (M) e distal (D). A porção medial (Figura 3 - seta azul) estava localizada a 10mm da porção proximal da cauda, a distal (Figura 3 - seta vermelha) 12mm desde o início da ablação. As porções mediais foram empregadas na execução das técnicas histológicas e

imuno-histoquímica, enquanto que as porções distais foram congelada em nitrogênio para avaliação molecular.

Figura 3 – Esquema representativo do modelo utilizado de Shimizu (Shimizu et al., 2012) destacando as medidas e porções avaliadas no projeto.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

3.4.2 Preparação das amostras para análise

As caudas foram seccionadas e a porção a ser utilizada foi submetida ao processamento de inclusão em parafina passando por procedimentos de descalcificação ou ainda processadas diretamente por congelamento.

3.4.2.1 Por inclusão em parafina histológica

Após concluir as secções das caudas, as respectivas porções dos materiais foram fixados em solução de Paraformaldeído (PFA, Merck) a 4% em tampão Fosfato-Salina (PBS, Sigma), pH 7,4 e mantidos sob agitação lenta por período variável entre 4 e 6 horas, sendo logo após mantidos em geladeira por aproximadamente 16 horas.

Com o intuito de submeter o material as análises histológicas e imuno-histoquímicas, diferentes técnicas de descalcificação foram utilizadas nas caudas até obter uma consistência suficientemente macia para processamento no micrótomo. Contudo, a técnica que apresentou o melhor resultado, foi a que empregou o Osteomoll® (Merck) em concentração de 80%, sob leve agitação constante pelo período de 3 a 4 dias.

Após a realização de todas as metodologias, as amostras foram lavadas em água corrente por 30 minutos, e em seguida submetidas a uma sequência crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 95% 100% - Synth) com duração de aproximadamente uma hora cada, sendo então realizado o processo de diafanização em dois banhos em Xilol (Synth) com duração de uma hora cada, bem como dois banhos em parafina a 60°C também perfazendo uma hora cada etapa. A seguir, as amostras foram incluídas em parafina e os blocos foram cortados com 5µm de espessura, sendo os cortes acomodados em lâminas de vidro.

3.4.2.1. Por criostato

Para a realização da IHQ com o emprego do Criostato, ou congelamento, as caudas foram colhidas dos animais logo após a eutanásia, e em seguida congeladas em nitrogênio líquido (-196°C), sendo então acondicionadas em suportes específicos previamente preparados com Tissue-Tek® (Sakura Finetek, CA, US) e cortadas com aproximadamente 20µm de espessura em Criomicrotomo (Leica, WE, DE), para que os cortes pudessem então ser acondicionados em lâminas silanizadas (Starfrost® - Knittel, GmbH, DE) e fixadas com acetona 100% (Synth) por 10 minutos a -20°C.

Além desse protocolo, um ensaio utilizando uma preparação prévia ao congelamento foi realizado, onde as amostras foram submetidas a uma solução de PBS contendo 30% de sacarose a 4°C por 16 horas, sendo depois submetidas a uma solução de 50% de PBS com 30% de sacarose (Synth), acrescido de 50% de Tissue-Tek® (Sakura Finetek) a 4°C por 16 horas, para que depois fossem acondicionadas em suportes específicos congelados e submetidos a microtomia.

3.5 ESFREGAÇÃO DO EXSUDATO

Com a finalidade de avaliar as características das células presentes no exudato da cauda no momento da eutanásia, aproximadamente 40µl de humor foram colhidos para serem empregados em extensão sobre lâmina, sendo imediatamente fixado em temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina.

3.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.6.1 Coloração das amostras por hematoxilina e eosina

Para realização da coloração por Hematoxilina-Eosina, os cortes das amostras foram desparafinizadas com duas imersões em xilol, seguidas de imersões subsequentes em concentrações de etanóis (100%, 95%, 70% - Synth) por 15 minutos cada e uma imersão em água destilada de 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram colocadas na coloração de Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 3 minutos e depois em água corrente por 10 minutos, para remoção do excesso do corante. As lâminas foram então coradas em Eosina (Sigma-Aldrich) por 1 minuto, posteriormente foi realizado o processo de desidratação com etanol 95% (Synth), duas imersões em etanol 100% (Synth) por 5 minutos cada e, clarificadas através de duas imersões em Xilol de 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com Permount® (Fischer Scientific, PA, US).

3.6.2 Investigação do perfil de colágeno predominante na cauda pela técnica de picrossírius

Para que fosse descrito o tipo do colágeno expresso nas amostras caudais, realizamos a técnica de Picrossírius, que além de determinar o tipo do colágeno (I ou III) através do padrão colorimétrico das mesmas.

A fixação do material foi realizada com o emprego de Bouin composto por 86% de Ácido Pícrico saturado, 10% (Synth) de Formalina e 4% (Synth) de Ácido Acético Glacial (Synth), por 6 horas, sob agitação suave e em temperatura ambiente. Em seguida, submeter as amostras ao Ácido Fosfomolibdico (Merck) por 5 minutos, realizando uma lavagem de 1 minuto em água corrente e posterior submersão em Picrossírius por 1 hora, para que possa ser lavado por 3 minutos em água destilada para posterior desidratação e montagem.

3.7 ANÁLISE DO PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS VASOS LINFÁTICOS

Os cortes congelados foram obtidos como protocolo descrito acima no item 3.4.2.1. Por se tratar de cortes congelados, não foi necessário realizar o processo de recuperação antigênica. Os tecidos foram submetidos a uma reidratação prévia realizada por 3 banhos em PBS, contendo 0,1% de Tween (Vetec), sendo em seguida bloqueada as reações inespecíficas com o emprego de solução de PBS, contendo 5% de Albumina sérica bovina, por 2 horas em temperatura ambiente, sendo em seguida incubados o anti-Lyve1 (R&D® Systems, MN, US - concentração 50 µg/mL) diluídos 1:300 em solução de bloqueio por aproximadamente 16 horas a 4°C em câmara úmida.

Na sequência, as amostras foram lavadas em 3 banhos de PBS, contendo 0,1% de Tween, com a duração de 5 minutos cada, para que a amostra fosse encubada com anticorpo secundário conjugado com o fluoróforo Texas Red (Abcan 150130 Carlsbad, CA, USA), diluídos 1:400 em solução de bloqueio, pelo período de 2 horas em temperatura ambiente. As amostras então foram lavadas por 3 banhos de PBS contendo 0,1 de Tween, sendo em seguida corados os núcleos por DAPI em diluição

1:10000 por 10 minutos em temperatura ambiente, para fosse removida o excesso de corante, novamente foram realizados 3 banhos de PBS de 5 minutos cada.

As laminas foram suavemente secas, para que pudessem ser montadas permanentemente com o emprego de lamínulas histológicas e solução de montagem D.P.X. (Sigma).

4 RESULTADOS

4.1 MODELOS DE LINFEDEMA

4.1.1 Modelo Tabibiazar

O estabelecimento do modelo de linfedema murino foi bastante trabalhoso e dispendeu mais tempo do que imaginávamos. Antes de iniciar este projeto, um piloto foi realizado em camundongos Swiss, seguindo o protocolo descrito por Tabibiazar et al. (2006), com o objetivo de testar o protocolo, a profundidade, o manuseio do animal e observar se haveria a formação do linfedema. O animal foi acompanhado por dez dias, com a formação do linfedema. Isso nos motivou a realizar o projeto (Figura 4).

Figura 4 – Fotografia dos passos para a indução de linfedema em camundongos Swiss

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

Apesar do sucesso inicial da formação do linfedema testado em camundongos Swiss, havia remissão espontânea do linfedema após 15 dias. Testamos então o mesmo protocolo em Balb/c, sendo observada a remissão espontânea em aproximadamente 30 dias, como demonstrado no relatório anterior. Com isso, realizamos modificações no protocolo, como a utilização de bisturi no lugar de eletrocautério e com o aumento do tamanho da lesão (4mm ao invés de 2mm). Em ambos os casos, bisturi e aumento do tamanho da lesão foi observada necrose logo após 7 dias da indução. Como a anatomia da cauda apresenta duas veias nas laterais, uma das explicações para a necrose seria a lesão dessas veias. Realizamos então a lesão “em C”, ou seja, parando antes de atingir as veias laterais. Nesse caso houve a

formação de um linfedema maior no início dos experimentos, porém também houve regressão espontânea do linfedema após 30 dias (Figura 5A,C,D).

Figura 5 – Obtenção de Linfedema com lesão baseada na lesão em C e modelo de Shimizu et al., 2012 em camundongos Balb/C utilizando eletro-cautério.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

4.1.2 Modelo Shimizu

Na literatura, o modelo de linfedema murino proposto por Shimizu et al., 2012 parecia produzir um linfedema de cauda mais estável que o proposto por Tabibiazar et al., 2006. Partimos para a realização do modelo de linfedema proposto pelo Shimizu et al., 2012 em camundongos Balb/C utilizando eletro-cautério na potência 3-4. Novamente houve a regressão espontânea do linfedema após 30 dias (Figura 6 B,C,E).

Figura 6 – Linfedema em camundongos Balb/C com eletrocautério.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

Diante deste resultado, resolvemos entrar em contato com Shimizu e relatamos nossos resultados, que nos indicou a usar uma caneta cauterizadora no lugar do eletro-cautério. A caneta da marca Bovie com 1,5A e baixa temperatura e a 3,0A da marca Cautermax foram adquiridas. Novos experimentos utilizando camundongos Balb/C (Figura 7), C57/BL6 (Figura 8) foram realizados. A utilização da caneta no lugar do eletro-cautério proporcionou a obtenção de linfedema consistente com o que vemos na literatura em todos os animais utilizados como modelo, Balb/C e C57/BL6. Nas análises histológicas, além do edema, observamos a presença de espongiose e infiltrado inflamatório bem característico, sendo o edema com 3 e 7 dias bastante significativo em todos animais. Diferentemente do que foi observado anteriormente, o edema persistiu até pelo menos 30 dias em camundongos Balb/C (Figuras 7 e 8 A e B) e 60 dias em C57/BL65 e 6).

Figura 7 – Linfedema obtido utilizando o modelo de Shimizu et al., 2012 e a caneta cautermax em animais Balb/C. A) Visão macroscópica do animal após a indução em diferentes dias; B) Gráfico das medidas obtidas por paquímetro após 10 mm da lesão; C) Análise histológica das caudas de camundongos Balb/C submetidos a indução do linfedema. Para tanto, após eutanásia as caudas foram submetidos ao procedimento de descalcificação por osteomol (80%) e corados por HE, magnificação dos 4 cortes sobrepostos: 40x; D) Análise histológica, magnificação, 200x.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

Figura 8 – Linfedema obtido utilizando o modelo de Shimizu et al., 2012 e a caneta Cautermax em animais C57/BL6. A) Visão macroscópica do animal após a indução em diferentes dias; B) Gráfico das medidas obtidas por paquímetro após 10 mm da lesão; C) Análise histológica das caudas de camundongos após indução do linfedema. Para tanto, após eutanásia as caudas foram submetidos ao

procedimento de descalcificação por osteomol (80%) e corados por HE, magnificação dos 4 cortes sobrepostos: 40x; D) Análise histológica, magnificação, 200x.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

4.3 AVALIAÇÃO DA TERAPIA CELULAR UTILIZANDO CÉLULAS-TRONCO

Os animais C57/BL6 com linfedema murinho induzido pelo método proposto por Shimizu et al., 2012 foram submetidos a terapia celular foram avaliados após 21 dias da injeção celular. Passado esse período, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do CEP e as avaliações do efeito terapêutico estão relatadas a seguir:

4.4 ANALISE MACROSCÓPICA

O Grupo Controle foi medido e fotografado ao longo de todo o experimento, para que comparar a linearidade do modelo em relação ao tempo (Figura 9 A).

O Placebo apresentou a maior formação de edema, as bordas da ablação apresentavam rubor bastante definido e uma leve retração, e a região mais edemaciada era dotada de aspecto brilhante e após o pico inicial do inchaço atingido próximo ao décimo dia, houve uma sutil regressão que se estabilizou ainda na terceira semana, mantendo o edema estável até o fim do experimento. O grupo SHAM apresentou características muito semelhantes ao Placebo, exceto a o aspecto brilhante da zona edemaciada, bem como as medidas das áreas aferidas, que se apresentaram ligeiramente menores (Figura 9 B e C).

O grupo MAh apresentou um pico do edema precoce, entre o quinto e o sétimo dia, entretanto, além de precoce, o edema aferido foi sensivelmente menor, bem como os aspectos de inflamação que acompanharam os outros grupos (Figura 9 D).

O grupo SVc apresentou o menor edema aferido e também teve seu pico entre o terceiro e o sexto dia, e os aspectos inflamatórios foram os menores quando comparados com todos os demais grupos ao final do período de tratamento (Figura 9 E).

Figura 9 – Fotografias das caudas de animais no 21º dia de experimento

(Fonte: DIAS, JLRM; 2016)

4.5 MENSURA VOLUMÉTRICA DA CAUDA

A mensura das caudas realizadas com emprego de paquímetro digital nas distâncias de 10 e 20mm da ablação cirúrgica, forneceu valores que ao serem inseridos na formula de cone-truncado, reafirmou os achados macroscópicos. De forma que os grupos Placebo e SHAM tiveram os maiores edemas aferidos, com os índices mais altos alcançados entre o sexto e nono dia de protocolo, enquanto os grupos MAh e SVc apresentaram o ápice de seus edemas entre o quarto e o sexto dia, contudo, nesses grupos, os edemas foram muito menos pronunciados, e próximo ao fim do experimento, o volume de suas áreas era aproximava-se muito com as áreas aferidas no grupo controle (Figura 10).

Figura 10 – Avaliação das mensurações utilizando a metodologia do cone truncado.

(Fonte: DIAS, JLRM; 2016)

4.6 ESFREGAÇÃO DO EXSUDATO

A partir do esfregaço do exsudato da cauda dos animais do grupo controle foi possível observar uma presença acentuada de eritrócitos, própria do processo de secção, e além disso, foram observadas poucas células de linhagem linfóide e mielóide, além raras células colunares (Figura 11A). Esse padrão foi acompanhado nos esfregaços realizados nas amostras dos grupos MAh e SVc, exceto pela presença discretamente mais acentuada de células da linhagem linfóide (Figura 11D e E).

As amostras derivadas do grupo Placebo, além de apresentar uma quantidade exsudato muito maior, mostraram a presença moderada de muco proteico, além muito mais exemplares de células linfóides e mielóides, e ainda foi possível evidenciar a presença de alguns exemplares de células colunares dispersos ao longo do esfregaço (Figura 11B). O grupo SHAM (Figura 11C) apresentou resultados muito semelhantes ao placebo, excetuando-se pela quantidade menor de exsudato, e pela presença das células colunares.

Figura 11 – Extensão do exsudato das caudas de animais no 21º dia de experimento

(Fonte: DIAS, JLRM; 2015)

4.7.1 Análise histológica das amostras

A histologia do grupo controle (Figura 12A) ao termino do experimento, apontou para o padrão histológico esperado dentro do quadro de normalidade, afinidades tintoriais, aspectos estruturais, bem como a relação das proporções. A análise das amostras do grupo Plabebo (Figura 12B), revelaram a presença espaços edemaciados, regiões compatíveis com espongiose, perda da proporção entre a vertebra caudal e seus anexos em relação às camadas que recobrem a cauda, além da presença de hiperqueratose ao longo de toda a circunferência da amostra.

A amostra derivada do grupo SHAM (Figura 12C) continha uma polarização do deslocamento estrutural oriunda do linfedema, orientada para a face dorsal da amostra, além disso, também foi possível presenciar a hiperqueratose ao longo de toda a circunferência da amostra, bem como alterações compatíveis com a instalação de um quadro fibrótico.

O grupo MAh (Figura 12D) apresentou um discreto deslocamento estrutural da vertebra caudal em relação aos anexos externos, porém não apresentou regiões com indícios de espongiose ou hiperqueratose.

O grupo SVc (Figura 12E) gerou amostras com padrões histológicos muito semelhantes aos encontrados no grupo controle, não sendo possível evidenciar alterações estruturais, processos inflamatórios crônicos, espongiose ou hiperqueratose.

Figura 12 – Análise histológica por coloração de HE das caudas após 21 dias de tratamento com células-tronco

(Fonte: DIAS, JLRM; 2016)

4.7.2 Investigação do perfil de colágeno predominante na cauda pela técnica de picrossírius

A realização da técnica da histológica associada a coloração de picrossírius possibilitou além da avaliação estrutural da histologia tecidual, a alteração gradual entre os colágenos do tipo I e III à medida em que ocorreu a evolução da instalação do quadro linfedematoso.

Pode-se observar a amostra oriunda de animal Controle (Figura 13A), o padrão de colágeno tipo I (vermelho), amplamente estabelecido em toda a matriz extracelular do corte histológico, ao passo que na amostra derivada de animal do grupo Placebo (Figura 13B), verificou-se o desarranjo estrutural da amostra, acompanhada de uma expressão muito mais pronunciada do colágeno do tipo III (verde), sendo que essa alteração também foi encontrada no grupo SHAM (Figura 13C), só que em menor intensidade.

As amostras oriundas do grupo MAh (Figura 13D) apresentaram um padrão de colágeno do tipo I muito próximo ao expressado pelo Controle, porém também foi percebida um sutil aumento na expressão do colágeno do tipo III, sendo que esse fenômeno não acompanhou as amostras derivadas do grupo SVc (Figura 13E) que se apresentaram muito semelhantes ao Controle no tocante aos tipos de colágeno, bem com padrões estruturais histológicos.

Figura 13 – Análise por coloração de picrossíruis das caudas após 21 dias da terapia celular utilizando células-tronco

(Fonte: DIAS, JLRM; 2016)

4.8 ANÁLISE DO PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DOS VASOS LINFÁTICOS

O padrão de marcação do grupo Controle apresentou vasos linfáticos com aspectos preservados, praticamente nenhum tipo de distensão foi presenciado nas amostras. O mesmo aspecto não foi encontrado nas amostras originadas do grupo Placebo, que apresentou além de vasos mais numerosos, um aspecto de distensão demasiadamente pronunciado, sendo que um padrão bastante próximo foi observado também nas amostras do grupo SHAM, contudo, nesse grupo, essa distensão parecia ser bem menos pronunciada.

As amostras derivadas dos grupos MAh e SVc apresentaram vasos de aspecto muito semelhante aos do grupo Controle, porém a quantidade e distribuição dos mesmos era superior, assemelhando-se aos resultados do grupo SHAM.

Figura 14 – Imunohistoquímica das caudas de animais no 21º dia de experimento

(Fonte: DIAS, JLRM; 2016)

5 DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizada uma tentativa de modelo para linfedema, utilizando camundongos Swiss e imunossuprimidos nude, uma vez que as predisposições imunológicas desses animais eram bastante pertinentes ao quadro de linfedema, especialmente a imunossupressão do nude que se aproxima ao quadro imunitário deficiente dos pacientes oncológicos, porém, mediante a técnica utilizada ambas abordagens em diferentes tentativas resultaram ou em necrose ou remissão completa do edema, uma vez que as peculiaridades dos animais não permitiam o manejo adequado.

A substituição dos modelos, por animais da linhagem BALB/C foi realizada devido a sua condição isogênica uma vez que, os animais Swiss não são isogênicos. Já os animais BALB/C são o que traria uma maior segurança as análises, porém a mesma remissão foi vista, sendo ela completa por volta do trigésimo dia.

Com o intuito de causar um trauma tecidual maior, e assim garantir a manutenção do linfedema por períodos maiores, a substituição do eletro-cautério por bisturi convencional foi realizada, assim como uma lesão de extensão maior foi praticada, aumentado a área de ablação de 2mm para 4mm, porém, em poucos dias o processo necrótico começou a se instalar, de forma induzir a eutanásia precoce dos animais. A escolha do bisturi convencional foi baseada em achados clínicos relatados por médicos veterinários em reuniões do nosso grupo de pesquisa onde esses profissionais relataram que em geral, cirurgias realizadas com bisturi mostrava um potencial maior para a instalação de um processo inflamatório, entretanto o que vimos foi um aumento do potencial necrótico.

A tentativa de “Lesão em C” pode ter sua inviabilidade justificada, pela grande área de tecido preservado, tanto na face dorsal, como na ventral, o que pode ter acarretado numa sobrecarga dos vasos preservado capazes de impedir a formação do linfedema e com isso, não pode ser utilizada em nosso trabalho.

O período crônico da lesão alcançado pelos animais submetidos ao protocolo Shimizu, pode ser derivada da interação entre o controle de pressão exercido durante o protocolo de indução ao linfedema, para que assim, fosse tomado o cuidado de preservar os vasos sanguíneos mais profundos e consequentemente evitando a necrose, aliado ao flap preservado na porção caudal que pode ter permitido a

instalação da lesão, contudo sem possibilitar que o membro entrasse em colapso pela estase hídrica.

A troca instrumental realizada entre o bisturi elétrico e a caneta cauterizadora, pode ter sido resultado do princípio de ação de cada um, uma vez que a dissociação tecidual à partir da emissão contínua de elétrons, é mecanismo de ação do bisturi elétrico, ao passo que dissociação tecidual por calor, e consequente cauterização é o princípio do funcionamento da caneta cauterizadora.

A substituição da caneta cauterizadora de alta temperatura, pela de baixa temperatura pode ser fundamentada pelo valor calorimétrico alcançado por cada uma, sendo que aproximadamente 1200°C podem ser alcançados pela primeira, ao passo que apenas 600°C podem ser alcançados com a segunda.

Além disso, frente aos resultados obtidos, muitos questionamentos foram feitos, com a finalidade de elucidar os diferentes comportamentos apresentados pelos animais, frente a metodologias distintas. Dessa forma, um dado imunológico importante em relação aos animais é o de que temos uma predominância da resposta Th1 para os C57/BL6 e Th2 para os Balb/C (WATANABE et al., 2004), o que em partes pode explicar os resultados diferentes obtidos nestes animais após indução de linfedema. Além do comportamento imunológico, devemos lembrar que os equipamentos utilizados para indução confrontam a dissociação tecidual por indução de elétrons proveniente do eletro-cautério contra a cauterização por calor originada da caneta cauterizadora.

As tentativas iniciais de realizar análises histológicas, esbarraram na resistência ao corte impresso pela vértebra caudal, o que comprometia a integridade de todo o restante da amostra. Com o intuito de contornar esse viés, algumas metodologias de descalcificação foram testadas, incluindo ácidos nítrico, cítrico e fosfórico, EDTA, Osteomoll em diversas concentrações, entre outras, contudo, o princípio usado para quelar o cálcio existente resultava em perda da afinidade tintorial da amostra, assim como a afinidade esperada pelos sítios antigênicos foi perdida, o que impede a realização de análises imuno-histoquímicas após os protocolos de descalcificação. Segundo (ALVES, 2009) a manutenção a natureza da amostra, assim como suas dimensões modulam diretamente essas características.

A associação da desidratação da cauda por sacarose, aliada ao congelamento da amostra em temperaturas inferiores a -20°C, conferiram a resistência necessária para que um corte histológico fosse conseguido, porém, para garantir que a totalidade

da amostra se mantivesse íntegra, a usual espessura compreendida entre 4-7µm não pode ser empregada, fazendo as amostras fossem conseguidas com 20-25µm.

Com base nos resultados relacionados a indução do linfedema foi possível observar que o pico inflamatório após a indução do linfedema foi de 7 dias sendo esse dado muito próximo ao relatado por SHIMIZU et al 2012, e segundo a literatura as células-tronco tem uma tendência a migrar para região da lesão preferencialmente durante a fase aguda da inflamação. Dessa forma, seria adequado que os protocolos de terapia fossem realizados após 7 dias da indução do linfedema. Com isso, um grupo de animais foi induzido a formação de linfedema, e ao partirmos para a terapia celular, nos deparamos com outro problema. No sétimo dia, o edema formado rodeava seu ponto máximo, e tanto as tentativas de administração de suspensão de células-tronco, quanto do placebo (solução fisiológica) refugava através da solução de continuidade, provavelmente devido à grande quantidade de líquido intersticial existente.

Frente a esse achado, a metodologia adotada para tentar contornar essa característica foi a administração da suspensão de células-tronco, bem como do placebo por via subcutânea logo após a micro ablação dos vasos linfáticos, ou seja, no dia da realização da lesão. Para tal, essa metodologia foi a utilizada no protocolo de indução de linfedema.

Com base na literatura podemos sugerir que a terapia profilática para o linfedema pode promover resultados promissores, no que diz respeito a duração da resposta inflamatória, bem como sua intensidade. Com base em nossos resultados da terapia celular essa premissa pode elucidar o fato dos grupos MAh e SVc, ter apresentado uma remissão quase que completa, assim como respostas inflamatórias mais brandas. Em um trabalho usando um modelo animal de linfedema axilar murino, envolvendo combinações de depleção parcial de diferentes linhagens linfocitárias, houve a constatação de que alternâncias entre as combinações de linfócitos suprimidos, modulam a sinalização inflamatória assim como o recrutamento de macrófagos (ZAMPELL et al., 2012; VIITANEN et al., 2015). Dessa forma podemos sugerir que no nosso trabalho possivelmente níveis de Interferon e interleucinas diminuíram por conta de uma possível depleção de linfócitos CD4+, CD8 e CD25 no grupo MAh, assim como, uma eventual depleção de CD4+, mas não de CD8 e CD25 pode ter ocorrido no grupo SVc.

O prazo de execução do experimento não possibilitou avaliar a eventual possibilidade de remissão completa do modelo de linfedema, se exposto por um período muito superior ao tempo realizado, bem como também não foi possível avaliar se existe a possibilidade de recidiva do linfedema nos animais tratados, uma vez encerrados os efeitos da terapia celular.

A visível diminuição de população monocitária exibida pelos esfregaços das amostras tratadas com células-tronco, pode ser acarretado pela inibição da maturação desse tipo celular, assim como as células dendríticas, frete a terapia celular. Além disso, na literatura um caso de diminuição foi encontrando após a supressão seletiva de linfócitos CD4+ e ou CD8 e também o recrutamento de macrófagos (ZAMPELL et al., 2012; GHANTA et al., 2015)

Os grupos tratados, apesar de apresentarem resultados de volume, aspecto estrutural histológico e perfil de colágeno próximos ao exibido pelo controle, apresentaram na imuno-histoquímica, vasos linfáticos que apesar de assemelharem-se com o padrão da normalidade, estavam presentes em número muito mais elevado. Essa condição pode ter sido resultado da modulação existente entre a PROX-1 e a síntese de VEGF-C. Alguns autores tem demonstrado que a modulação desse sistema é imprescindível para a formação dos vasos primordiais, ainda no desenvolvimento embrionário (SAHARINEN et al., 2004; TAMMELA; PETROVA; ALITALO, 2005).

A visível elevação do número de vasos linfáticos dentro dos grupos tratados com célula-tronco, pode ser consequência do forte potencial de ação angiogênica exibido especialmente por células-tronco derivadas de anexos embrionários (FUNCTION et al., 2015).

As amostras do grupo Placebo, sempre exibiram um quadro muito mais agravado quando comparado ao grupo SHAM, indicando que essa situação poderia ser resultado do trauma mecânico causado pela administração do soro fisiológico, contudo, os efeitos terapêuticos das duas células-tronco usadas no experimento pareceram ter sido superiores ao trauma, culminando em um quadro inflamatório mais ameno no que diz respeito a intensidade e tempo de duração. Entretanto esse fato pode ser explicado por um possível efeito parácrino ocorrido, fato esse bem descrito na literatura clássica de terapia celular utilizando células-tronco.

O resultados obtidos com o tratamento à partir de células-tronco de membrana amniótica humana e sobretudo de saco vitelino canino mostraram-se promissores, porém a impossibilidade técnica não permitiu verificar se os mesmo resultados seriam obtidos, se a terapia celular fosse realizada em uma fase diferente da progressão da patologia (MOODLEY et al., 2013; KANAPATHY et al., 2014).

6 CONCLUSÕES

O modelo proposto por Tabibiazar mostrou eficácia para a fase aguda da lesão linfedematosa, porém houve a remissão do quadro ao longo de períodos mais longos. Entretanto, o modelo proposto por Shimizu apresentou-se mais estável, sobretudo no que diz respeito a fase crônica da lesão e foi utilizado para a realização da terapia celular neste trabalho.

O tratamento com células-tronco derivadas de membrana amniótica humana e de saco vitelino canino apresentaram reduções significativas no processo inflamatório esperado, bem como na evolução do edema.

REFERÊNCIAS

- ALITALO, K.; TAMMELA, T.; PETROVA, T. V. Lymphangiogenesis in development and human disease. **Nature**, v. 438, n. December, p. 946–953, 2005.
- ALVES, A. C. Histologia da medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 3, p. 183–188, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000300014&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells and gene therapy. **Clinical Orthopedics**, v. 375, n. pp, p. S67--S70, 2000. Disponível em: <http://journals.lww.com/corr/Abstract/2000/10001/Mesenchymal_Stem_Cells_and_Gene_Therapy.10.aspx>.
- CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. **Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century** *Trends in Molecular Medicine*, 2001. .
- CAPLAN, a I.; CAPLAN, a I. Mesenchymal stem cells: Cell based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Eng**, v. 11, n. 7, p. 1198–1211, 2005. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/loi/ten>>.
- CIRMAN, T.; BELTRAM, M.; SCHOLLMAYER, P.; ROŽMAN, P.; KREFT, M. E. Amniotic membrane properties and current practice of amniotic membrane use in ophthalmology in Slovenia. **Cell and Tissue Banking**, v. 15, p. 177–192, 2014.
- CONRAD, C.; NIESS, H.; HUSS, R.; HUBER, S.; VON LUETTICHAU, I.; NELSON, P. J.; OTT, H. C.; JAUCH, K. W.; BRUNS, C. J. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. **Circulation**, v. 119, p. 281–289, 2009.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, a; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>>.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATSINIK, N. V.; PANASYUK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331–340, 1974.
- FUNCTION, E. C.; KO, J.; WEISS, G.; ROSSI, D.; WANKHAMMER, K.; REINISCH, A. Placental Mesenchymal Stromal Cells Derived from Blood Vessels or Avascular Tissues : v. 24, n. 1, 2015.
- GHANTA, S.; CUZZONE, D. A.; TORRISI, J. S.; ALBANO, N. J.; JOSEPH, W. J.; SAVETSKY, I. L.; GARDENIER, J. C.; CHANG, D.; ZAMPELL, J.; MEHRARA, B. J. Regulation of Inflammation and Fibrosis by Macrophages in Lymphedema. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, n. 3, p. ajpheart.00598.2014, 2015. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpheart.00598.2014>>.

GRINFELD, S.; GOMES, R. G. da C. Células tronco: um breve estudo. **IJD. International Journal of Dentistry**, p. 324–429, 2004. Disponível em: <<http://www.ufpe.br/ijid/index.php/exemplo/article/viewArticle/48>>.

HADAMITZKY, C.; PABST, R. Acquired lymphedema: An urgent need for adequate animal models. **Cancer Research**, v. 68, n. 2, p. 343–345, 2008.

INSAUSTI, C. L.; BLANQUER, M.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, A. M.; CASTELLANOS, G.; MORALEDA, J. M. Amniotic membrane-derived stem cells: Immunomodulatory properties and potential clinical application. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 7, p. 53–63, 2014.

KANAPATHY, M.; PATEL, N. M.; KALASKAR, D. M.; MOSAHEBI, A.; MEHRARA, B. J.; SEIFALIAN, A. M. Tissue-engineered lymphatic graft for the treatment of lymphedema. **Journal of Surgical Research**, v. 192, n. 2, p. 544–554, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.07.059>>.

LAROCCA, R.; MARGUTI, I.; CABRERA, W.; RIBEIRO, O. G.; RIZZO, L. V.; DE MORAES, L. V. Maximal inflammatory response benefits syngeneic skin graft acceptance. **Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 57, n. 4, p. 171–177, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18344060>>.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell death and differentiation**, v. 21, p. 216–25, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890955&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MACLELLAN, R. a.; GREENE, A. K. Lymphedema. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, p. 191–197, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055858614000675>>.

MAGATTI, M.; CARUSO, M.; MUNARI, S. De; VERTUA, E.; URSULA, D. De; ORNELLA, M. Human Amniotic Membrane - Derived Mesenchymal and Epithelial Cells Exert Different Effects on Monocyte - Derived Dendritic Cell Differentiation and Function. v. 24, n. 9, p. 1–17, 2016.

MANUELPIILLAI, U.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C. V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? **Placenta**, v. 32, 2011.

MIHU, C. M.; CIUCA, D. R.; SORITAU, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the human amniotic membrane. **Romanian journal of morphology and embryology**, v. 50, n. 1, p. 73–77, 2009.
MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, p. 1549–59, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081662>>.

MOODLEY, Y.; VAGHJIANI, V.; CHAN, J.; BALTIC, S.; RYAN, M.; TCHONGUE, J.;

SAMUEL, C. S.; MURTHI, P.; PAROLINI, O.; MANUELPIILLAI, U. Anti-Inflammatory Effects of Adult Stem Cells in Sustained Lung Injury : A Comparative Study. v. 8, n. 8, 2013.

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. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 139, p. 373–381, 1981.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILIC, G.; BÜHRING, H.-J.; EVANGELISTA, M.; HENNERBICHLER, S.; LIU, B.; MAGATTI, M.; MAO, N.; MIKI, T.; MARONGIU, F.; NAKAJIMA, H.; NIKAI, T.; PORTMANN-LANZ, C. B.; SANKAR, V.; SONCINI, M.; STADLER, G.; SURBEK, D.; TAKAHASHI, T. a; REDL, H.; SAKURAGAWA, N.; WOLBANK, S.; ZEISBERGER, S.; ZISCH, A.; STROM, S. C. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem cells**, v. 26, p. 300–311, 2008.

PAROLINI, O.; SOUZA-MOREIRA, L.; O'VALLE, F.; MAGATTI, M.; HERNANDEZ-CORTES, P.; GONZALEZ-REY, E.; DELGADO, M. Therapeutic Effect of Human Amniotic Membrane-Derived Cells on Experimental Arthritis and Other Inflammatory Disorders. **Arthritis & Rheumatology**, v. 66, n. 2, p. 327–339, 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.38206>>.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, p. 664–673, 2006.

QI, S.; PAN, J. Cell-Based Therapy for Therapeutic Lymphangiogenesis. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 3, p. 271–283, 2015. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2014.0390>>.

RIDNER, S. H. Pathophysiology of Lymphedema. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 29, n. 13, p. 4–11, 2013.

SAHARINEN, P.; TAMMELA, T.; KARKKAINEN, M. J.; ALITALO, K. Lymphatic vasculature : development , molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. v. 25, n. 7, 2004.

SAKURAGAWA, N.; KAKINUMA, K.; KIKUCHI, A.; OKANO, H.; UCHIDA, S.; KAMO, I.; KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78, p. 208–214, 2004.

SCHNEIDER, M.; NY, A.; DE ALMODOVAR, C. R.; CARMELIET, P. A new mouse model to study acquired lymphedema. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. 0970–0971, 2006. SEDGER, L. M.; TULL, D. L.; MCCONVILLE, M. J.; SOUZA, D. P. De; RUPASINGHE, W. T.; WILLIAMS, S. J.; DAYALAN, S.; LANZER, D. Lipidomic Profiling of Adipose Tissue Reveals an Inflammatory Signature in Cancer- Related and Primary Lymphedema. p. 1–22, 2016.

SHIMIZU, Y.; SHIBATA, R.; SHINTANI, S.; ISHII, M.; MUROHARA, T. Therapeutic lymphangiogenesis with implantation of adipose-derived regenerative cells. **Journal of the American Heart Association**, v. 1, p. e000877, 2012. Disponível em: <<http://jaha.ahajournals.org/content/1/4/e000877.full>>.

SHIN, W. S.; SZUBA, A.; ROCKSON, S. G. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. **Lymphatic research and biology**, v. 1, p. 159–169, 2003.

SZUBA, A.; ROCKSON, S. G. Lymphedema : classification , diagnosis and therapy. n. 98, p. 145–156, 1998.

TAKASHIMA, S.; ISE, H.; ZHAO, P.; AKAIKE, T.; NIKAIDO, T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. **Cell structure and function**, v. 29, p. 73–84, 2004.

TAMMELA, T.; PETROVA, T. V; ALITALO, K. Molecular lymphangiogenesis : new players. v. 15, n. 8, 2005.

TANAKA, M.; CHEN, Z.; BARTUNKOVA, S.; YAMASAKI, N.; IZUMO, S. The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. **Development (Cambridge, England)**, v. 126, p. 1269–1280, 1999.

TARAN, R.; MAMIDI, M. K.; SINGH, G.; DUTTA, S.; PARHAR, I. S.; JOHN, J. P.; BHONDE, R.; PAL, R.; DAS, A. K. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. **Journal of Biosciences**, v. 39, n. January, p. 157–169, 2014.

UCHIDA, S.; INANAGA, Y.; KOBAYASHI, M.; HURUKAWA, S.; ARAIE, M.; SAKURAGAWA, N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. **Journal of Neuroscience Research**, v. 62, p. 585–590, 2000.

VIITANEN, T. P.; VISURI, M. T.; SULO, E.; SAARIKKO, A. M.; HARTIALA, P. ScienceDirect Anti-inflammatory effects of flap and lymph node transfer. v. 9, p. 1–8, 2015.

WATANABE, H.; NUMATA, K.; ITO, T.; TAKAGI, K.; MATSUKAWA, A. Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 460–466, 2004. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200411000-00010>>.

WATT, S. M.; GULLO, F.; GARDE, M. Van Der. The angiogenic properties of mesenchymal stem / stromal cells and their therapeutic potential. p. 25–53, 2013.

YOSHIDA, S.; HAMUY, R.; HAMADA, Y.; YOSHIMOTO, H.; HIRANO, A.; AKITA, S. Adipose-derived stem cell transplantation for therapeutic lymphangiogenesis in a mouse secondary lymphedema model. **Regenerative medicine**, v. 10, n. 5, p. 549–

562, 2015.

ZAMPELL, J. C.; YAN, A.; ELHADAD, S.; AVRAHAM, T.; WEITMAN, E.; MEHRARA, B. J. CD4 + Cells Regulate Fibrosis and Lymphan

giogenesis in Response to Lymphatic Fluid Stasis. v. 7, n. 11, 2012.

ZHOU, J.; WANG, D.; LIANG, T.; GUO, Q.; ZHANG, G. Amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells: Characteristics and therapeutic applications. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 290, p. 223–231, 2014.