

LINA CASTELO BRANCO MOTTA

**Geração de organóides intestinais a partir de células-tronco derivadas do
saco vitelino canino**

São Paulo

2019

LINA CASTELO BRANCO MOTTA

**Geração de organóides intestinais a partir de células-tronco derivadas do saco vitelino
canino**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

De acordo: _____

Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2019

Obs: A versão original encontra-se na Biblioteca da FMVZ/USP.

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. 3821
FMVZ

Motta, Lina Castelo Branco
Geração de organóides intestinais a partir de células-tronco derivadas do saco vitelino canino / Lina Castelo Branco Motta. – 2019.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Placenta. 2. Canis familiaris. 3. Saco vitelino. 4. Cultivo celular. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Geração de organoides intestinais a partir de células-tronco derivadas do saco vitelino canino", protocolada sob o CEUA nº 1186280617 (ID 004738), sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio e equipe; Lina Castelo Branco Motta** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/03/2018.

We certify that the proposal "Gratin of intestinal organidies from stem cells derived from the canine yolk sac", utilizing 20 Dogs (20 females), protocol number CEUA 1186280617 (ID 004738), under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio and team; Lina Castelo Branco Motta** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/14/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2017](#) a [07/2019](#)

Área: [Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres](#)

Origem: [Animais provenientes de campanha](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 5 anos](#)

N: [20](#)

Linhagem: [SRD](#)

Peso: [10 a 30 kg](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia (FZEA), USP, Campus Pirassununga.

São Paulo, 18 de julho de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MOTTA, Lina Castelo Branco

Título: Geração de organóides intestinais a partir de células-tronco derivadas do saco vitelino canino

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

Data: 02/09/2019

Banca examinadora

Prof. Dr: Carlos Eduardo Ambrósio

Instituição: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, FZEA/USP. Julgamento: Aprovada

Prof. Dr: Juliano Coelho da Silveira

Instituição: Universidade de São Paulo. Julgamento: Aprovada

Prof. Dr: Atanásio Serafim Vidane

Instituição: Universidade Eduardo Mondlane. Julgamento: Aprovada

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer àqueles que não só me ajudaram na construção deste trabalho, mas também aos que partilham comigo ideias e sentimentos.

Aos meus familiares, Ana Lúcia Castelo Branco Motta, Adauto Gouveia Motta Júnior e Clara Castelo Branco Motta, minha base para impulso de todas as realizações e conquistas. Esse título é nosso!

Ao meu companheiro de vida, Pedro Afonso de Oliveira Guimarães, por todas as vezes que ergueu minha cabeça e me deu forças para continuar seguindo em frente.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, que acreditou e confiou em mim para desempenhar este projeto, tendo grande influência no meu crescimento pessoal e profissional. Sem contar pelas confraternizações open bar.

À todos do GDTI pelo apoio e amizades firmadas, em especial Priscilla Ferreira Avelino Pinto (pela parceria, auxiliar minhas dificuldades, ouvir meus dramas, me aconselhar e por ter acalmado os demais durante meus ataques de raiva), Vitória Mattos Pereira (por ter me auxiliado boa parte do projeto e me socorrer durante meus desesperos), Luciana Cristina Machado (por ter me feito rir, me aconselhar sobre a vida, pela parceria e os cafés da manhã no domingo), Andressa Parca (por sempre se oferecer gentilmente a me socorrer no LIFE) e Vanessa Cristina Oliveira (por ter dito “calma Lina, vai dar certo” todas as vezes que eu achei que não daria conta).

A professora Dra. Celina Furlaneto Mançaneres, pelos conselhos metodológicos e auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao grupo do LMMD por, literalmente, terem aberto as portas para mim diversas vezes, em especial Naira Pieri Godoi pelo auxílio nos protocolos.

Às minhas rommates Thaís Paula Silva, Carla Fernanda Rocha e finada Ingrid Gomes pela companhia, por ouvirem meus dramas, emprestarem as roupas e serem amigas.

Aos meus amigos de Fortaleza, por apoiarem e incentivarem meu crescimento profissional.

À CAPES (nº do processo 1747796) pela bolsa de mestrado concedida.

RESUMO

MOTTA, L.C.B. **Geração de organóides intestinais a partir de células-tronco derivadas do saco vitelino canino.** [Generation of intestinal organoids from stem cells derived from the canine yolk sac]. 2019. 69p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os organóides intestinais possuem grande relevância na terapia celular, pois fornecem informações mais precisas sobre a composição e arquitetura de tecidos em relação ao cultivo bidimensional, além de servir como modelo de estudo para interação de hospedeiros e testes de fármacos. O saco vitelino, membrana de nutrição fetal, é um dos responsáveis pela formação do epitélio intestinal durante o desenvolvimento embrionário. Com isso, este trabalho teve como objetivo verificar se o cultivo tridimensional *in vitro* de células-tronco derivadas do saco vitelino canino possui capacidade de desenvolver organóides intestinais. Células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino foram isoladas e caracterizadas, sendo posteriormente cultivadas tridimensionalmente em Matrigel® sob diferentes condições de indução da diferenciação, sendo o próprio tecido do saco vitelino digerido também testado para este cultivo tridimensional, utilizando como grupo controle células-tronco intestinais caninas. As estruturas derivadas dos diferentes tipos de cultivo foram testadas com RT-qPCR para diferentes marcadores endodermis e intestinais, sendo a quantificação das amostras avaliada utilizando o método $2^{-\Delta CT}$. As estruturas tridimensionais derivadas do tecido do saco vitelino foram capazes de desenvolver morfologia semelhante ao grupo controle, possuindo marcação para células epiteliais intestinais e células do cólon intestinal. Enquanto que as estruturas derivadas do grupo das mesenquimais, apesar de apresentar expressão de células intestinais, não desenvolveu uma morfologia adequada. Concluindo assim que o saco vitelino canino possui capacidade para desenvolver organóides intestinais, enquanto que as células-tronco mesenquimais isoladas, apesar de serem capazes de sofrer diferenciação intestinal, não formam uma morfologia semelhante a organóides no cultivo tridimensional.

Palavras-chave: Placenta. *Canis familiaris*. Saco vitelino. Cultivo celular.

ABSTRACT

MOTTA, L.C.B. **Generation of intestinal organoids from stem cells derived from the canine yolk sac.** 2019. 69p. Dissertação (Mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The intestinal organoids have great relevance in cell therapy, since they provide more precise information on the composition and architecture of tissues in relation to the two-dimensional culture, besides serving as a study model for host interaction and drug tests. The yolk sac, fetal nutrition membrane, is one of the responsible for the formation of the intestinal epithelium during the embryonic development. The objective of this study was to verify if the in vitro three-dimensional culture of stem cells derived from the canine yolk sac has the capacity to develop intestinal organoids. The mesenchymal stem cells of the canine yolk sac were isolated and characterized, and were subsequently cultured three-dimensionally in Matrigel® under different conditions of induction of differentiation, and the same yolk sac tissue was also tested for this three-dimensional culture using canine intestinal stem cell as control. The structures derived from the different culture types were tested with RT-qPCR for different endodermal and intestinal markers, and the quantification of the samples was evaluated using the $2^{-\Delta CT}$ method. The three-dimensional structures derived from yolk sac tissue were able to develop similar morphology to the control group, expressing intestinal epithelial cells and intestinal colon cells genes. While the structures derived from the mesenchymal group, despite presenting intestinal cell expression, did not develop an adequate morphology. Concluding that the canine yolk sac is capable of developing intestinal organoids, whereas isolated mesenchymal stem cells, although capable of undergoing intestinal differentiation, do not form organoids-like structures in three-dimensional culture.

Key words: Placenta. *Canis familiaris*. Yolk sac. Cell culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação de contagem celular em câmara de Neubauer	25
Figura 2 - Desenho experimental do protocolo I	29
Figura 3 - Desenho experimental do protocolo II.....	31
Figura 4 - Isolamento do saco vitelino e cultivo de células-tronco	34
Figura 5 - Fotomicrografias do Ensaio de unidade formadora de colônia das células saco vitelino de embriões caninos.....	35
Figura 6 - Fotomicrografias das MSCs pós protocolo de diferenciação osteogênica coradas com Alizarin red	37
Figura 7 - Fotomicrografias das MSCs pós protocolo de diferenciação adipogênica coradas com Sudan black.....	38
Figura 8 - Fotomicrografia histológica de MSCs após o cultivo em meio de diferenciação condrogênico e coradas com Alcian blue	39
Figura 9 - Expressão de glicoproteínas de superfície das células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino.....	40
Figura 10 - Isolamento do intestino canino.....	41
Figura 11 - Fotomicrografia de células intestinais resultante dos filtrados do isolamento do intestino de fetos caninos.....	42
Figura 12 - Organóides desenvolvidos a partir do cultivo de criptas intestinais caninas (grupo controle I) em distintas etapas de diferenciação.....	44
Figura 13 - Células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino cultivadas sobre a cama de Matrigel em diferentes etapas de diferenciação.....	46
Figura 14- Células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino cultivadas na gota de Matrigel em diferentes etapas de diferenciação.....	48
Figura 15 - Organóides desenvolvidos a partir do cultivo de criptas intestinais caninas (grupo controle II) a partir de cultivo único de diferenciação.....	50
Figura 16 - Cultivo de MSCs derivadas do saco vitelino canino em gota de Matrigel com cultivo único de diferenciação.....	52
Figura 17 - Cultivo do tecido do saco vitelino canino com cultivo único de diferenciação.....	54

Gráfico 1 - Curva padrão de crescimento das células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino cultivadas em alfamem 15% SFB.	39
Gráfico 2 - Níveis de expressão dos marcadores nos grupos amostrais	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados para o RT-qPCR.....	33
Tabela 2 - Viabilidade das MSCs do saco vitelino canino pós descongelamento	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. SACO VITELINO	15
2.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs)	16
2.3. INTESTINO	18
2.4. ORGANÓIDES	20
3. HIPÓTESE	22
4. OBJETIVOS	22
4.1. OBJETIVOS GERAIS	22
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
5. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1. LABORATÓRIO DE ESTUDO	23
5.2. CULTIVO BIDIMENSIONAL – CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs	23
5.2.1. Isolamento de cultivo das MSCs	23
5.2.2. Passagem celular	23
5.2.3. Congelamento/descongelamento celular	24
5.2.4. Viabilidade celular	24
5.2.5. Unidade formadora de colônia (UFC)	25
5.2.6. Diferenciação in vitro	25
5.2.6.1. Diferenciação osteogênica	25
5.2.6.2. Diferenciação condrogênica.....	26
5.2.6.3. Diferenciação adipogênica.....	26
5.2.7. Curva de crescimento	26
5.2.8. Citometria de fluxo	27
5.3. CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL	27
5.3.1. Isolamento de criptas intestinais caninas	27
5.3.2. Diferenciação celular	28
5.3.2.1 Protocolo I – Cultivo sequenciado de diferenciação.....	29
5.3.2.1.1 MSCs sobre a cama de Matrigel.....	29
5.3.2.1.2. MSCs na gota de Matrigel	30
5.3.2.1.3. Grupo controle I – criptas intestinais em cultivo sequenciado	30
5.3.2.2 Protocolo II – Cultivo único de diferenciação	31
5.3.2.2.1. MSCs na gota de Matrigel.....	31
5.3.2.2.2. Tecido do saco vitelino em gota de Matrigel.....	31
5.3.2.2.3. Grupo controle II.....	32
5.4. REMOÇÃO DAS CÉLULAS DO MATRIGEL	32
5.5. RT-qPCR.....	32
6. RESULTADOS	34
6.1. CULTIVO BIDIMENSIONAL – CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs	34
6.1.1. Isolamento e cultivo das MSCs	34
6.1.2. Unidade formadora de colônia (UFC)	35
6.1.3. Viabilidade celular	35
6.1.4. Diferenciação celular	36
6.1.4.1. Diferenciação osteogênica	36
6.1.4.2 Diferenciação adipogênica	37
6.1.4.3. Diferenciação condrogênica.....	38
6.1.5. Curva de crescimento	39
6.1.6. Citometria de fluxo	40
6.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL	41
6.2.1. Isolamento das criptas intestinais caninas	41
6.2.2. Diferenciação celular	42
6.2.2.1. Protocolo I – Cultivo sequenciado de diferenciação.....	42

6.2.2.1.1. Grupo controle I – criptas intestinais em cultivo sequenciado	42
6.2.2.1.2. MSCs sobre a cama de Matrigel.....	45
6.2.2.1.3. MSCs na gota de Matrigel.....	47
6.2.3. Protocolo II – cultivo único de diferenciação	49
6.2.3.1 Grupo controle II – criptas intestinais em cultivo único.....	49
6.2.3.3. Tecido do saco vitelino em gota de Matrigel.....	53
6.3. RT-QPCR.....	55
7. DISCUSSÃO.....	56
7.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs.....	56
7.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL	57
8. CONCLUSÃO	62
9. REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A medicina terapêutica está constantemente em avanço, sendo o estudo do desenvolvimento dos órgãos e suas funções moleculares um complemento para tal progressão. Entretanto, devido à heterogeneidade destes órgãos e sua baixa transparência, estes são bastante inacessíveis à observação óptica, manipulação experimental e coleta de dados, sendo importante a realização de alternativas para obter maior conhecimento de suas funções (PAMPALONI et al., 2007). Muitos processos biológicos conhecidos atualmente são baseados em estudos de populações celulares cultivadas aderidas à placa (cultivo bidimensional – 2D), como por exemplo reações bioquímicas, vias de sinalização, expressão genética, dentre outros. Porém, no ambiente *in vivo*, as células estão presentes em um microambiente nativo altamente complexo contendo populações de células mistas que interagem entre si em uma matriz extracelular (BAKER; CHEN, 2012), além da presença de fatores externos como, fatores de crescimento, hormônios, células imunes, dentre outros. O modelo 2D facilita a aquisição de fenômenos fisiológicos de células individuais, porém possuem aspectos limitados em relação à reprodução da biologia celular, não capturando fielmente o comportamento fisiológico das células *in vivo* (LARSEN, 2017). Quando incorporadas em um ambiente de cultivo tridimensional (3D), as células possuem capacidade de recuperar sua forma e função fisiológica semelhante ao ambiente corpóreo (BAKER; CHEN, 2012), promovendo assim a modelagem de sistemas biológicos de células para organismos (PAMPALONI et al, 2007).

O modelo 3D é definido como o cultivo celular em suspensão, com a mimetização de uma matriz tridimensional, permitindo o desenvolvimento de agregados celulares com interações complexas, reproduzindo uma arquitetura similar àquela do tecido original (KATT et al., 2016). As técnicas de cultivo 3D permitem o estudo em tempo real de tecidos, pois possibilitam a visualização da base celular da morfogênese epitelial, além de testar os papéis de genes específicos e elucidar a contribuição dos fatores microambientais nos processos normais e patológicos (SHAMIR; EWALD, 2014). Este sistema de cultivo representa com maior precisão fisiológica o ambiente celular *in vivo*, pois proporciona interações célula-célula e célula-matriz, viabilizando assim o desenvolvimento de modelos que facilitem a descoberta de fármacos (WATSON et al., 2017; FATEHULLAH et al., 2016), pois possui a capacidade de aumentar o poder preditivo de triagem de drogas e toxicidade, além de contribuir para a redução do número de animais utilizados pela indústria farmacêutica.

As células-tronco possuem um enorme potencial em áreas terapêuticas. Ao serem cultivadas em suspensão possuem a capacidade de formar organóides, que são definidos como culturas 3D derivadas de tecidos primários, células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco pluripotente induzidas (iPSCs), capazes de realizar autorrenovação e auto-organização, exibindo funcionalidade de órgão semelhante ao tecido de origem (CLEVERS, 2016; MORIZANE; BONVENTRE, 2017). Os organóides permitem o estudo da organogênese, patogênese, além de tratamentos farmacológicos, manipulação genética e transplante terapêutico (CORTEZ et al., 2018). Usualmente, modelos animais são utilizados como substitutos para o estudo fisiológico e patogênico da doença humana. Porém, os organóides possuem o potencial de complementar ou, até mesmo, substituir esses modelos, pois permitem o estudo direto de tecidos humanos, tendo um alto rendimento, menor custo e, conseqüentemente, menores preocupações éticas (YU et al., 2019). Portanto, este modelo organóide é um grande avanço tecnológico, sendo uma ferramenta especial em muitas aplicações básicas de biologia e clínica, possuindo grande potencial no estudo de doenças *in vitro* (FATEHULLAH et al., 2016).

O saco vitelino (SV) é uma membrana extraembrionária localizada na região ventral com importante função de suprir as necessidades nutricionais do embrião até que a placenta seja completamente formada (GALDOS-RIVEIROS et al., 2010). Possui nichos celulares hematopoiéticos e mesenquimais (células-tronco multipotentes presentes em diversos tecidos e com capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares) (MANÇANARES et al., 2015). Além disso, o intestino primitivo se desenvolve a partir de uma parte do SV devido à incorporação deste no corpo do embrião durante a dobra do disco embrionário (KIM et al., 2003). À medida que o embrião progride o crescimento, os intestinos anterior, médio e posterior se desenvolvem a partir do intestino primitivo (CAO et al., 2011). Na maioria dos animais domésticos o SV inicia sua regressão por volta da segunda ou terceira semana gestacional, a medida que o alantoide fusiona com o córion (HAFEZ; HAFEZ, 2004) permanecendo, nestes casos, ativo somente durante o início do desenvolvimento embrionário (GALDOS-RIVEROS et al., 2010). Porém em cães o SV aumenta seu tamanho no decorrer do crescimento do embrião, permanecendo altamente vascularizado até o nascimento (LEE et al., 1983).

O modelo canino é importante para a medicina regenerativa, pois suas características fisiológicas são semelhantes às dos seres humanos (HOLSON et al., 2015). A possibilidade de isolar células mesenquimais caninas a partir de anexos fetais é significativo, uma vez que algumas doenças genéticas caninas são relatadas assemelhando-se às disfunções presentes em

humanos (URANIO et al., 2011). Doenças genéticas intestinais como por exemplo a doença inflamatória intestinal idiopática e câncer intestinal são exemplos destas disfunções (RYCHLIK et al., 2017; DECKER et al., 2017). Além da fisiologia, outro fator que também adequa o cão como modelo animal é que por ser bastante estudado na veterinária, já se tem um bom conhecimento prévio da biologia deste modelo.

Para entender melhor a biologia da célula-tronco, a organogênese e a fisiopatologia, é importante recapitular a arquitetura *in vivo* e funcionalidade de tecidos originais. Com isso, a elaboração de modelos alternativos de estudos para a medicina terapêutica se faz constantemente necessária, podendo o desenvolvimento de organóides fornecer vias alternativas para tal fato.

1.1. JUSTIFICATIVA

O organóide possui importância significativa na terapia celular, podendo ser utilizado como modelo de estudo *in vitro* do desenvolvimento e organogênese de tecidos. Com isso, este trabalho propõe fornecer um novo modelo de protocolo de geração de organóides intestinais para possíveis aplicabilidades futuras no estudo de doenças relacionadas ao intestino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SACO VITELINO

As membranas fetais presentes em mamíferos são constituídas de cório, âmnio, alantoide e saco vitelino (SV), que possuem a função de proteção, oxigenação, nutrição, excreção e produção de hormônios (MOORE; PERSAUD, 2004). O SV é encarregado por transferir, em marsupiais e eutérios, nutrientes provenientes da secreção glandular uterina ou do sangue materno para o feto, sendo a principal fonte de nutrição enquanto a placenta verdadeira não está completamente formada (FREYER; BENFREE, 2009; MANÇANARES et al., 2013). Além de nutrir, desempenha também importantes funções como síntese proteica, atividade fagocitária, hematopoese, sendo também responsável pelo desenvolvimento de parte do sistema circulatório embrionário (GALDOS-RIVEROS et al., 2010). Um recente trabalho analisou em humanos a correlação entre o peso materno e o tamanho do SV verificando que estes são inversamente proporcionais, ou seja, que o SV está envolvido na regulação do crescimento embrionário, autorregulando seu tamanho para compensar menos utilização de recursos maternos, aumentando

sua superfície de difusão para melhor transmissão de nutrientes e gases (KARSLEN et al., 2019).

O saco vitelino desenvolve-se a partir da formação dos folhetos germinativos, onde inicialmente é formado por uma camada fina de ectoderma, com subsequente migração de células da camada do endoderma e, finalmente, com o crescimento do mesoderma entre os dois primeiros folhetos do disco embrionário, formando uma estrutura trilaminar (MOSSMAN, 1937). É uma estrutura anexa presente nos vertebrados em forma de saco ligada à região ventral do embrião (MOORE; PERSAUD, 2004; OLIVEIRA et al., 2015). Este anexo extraembrionário representa uma via promissora de pesquisa em células-tronco devido sua capacidade de hematopoese e à presença de nichos de células-tronco mesenquimais nessa estrutura durante o desenvolvimento embrionário (MANÇANARES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015).

Durante o dobramento embrionário, o SV é incorporado na formação do corpo, formando o revestimento epitelial do intestino (GARCIA; FERNANDÉZ, 2012), encontrando-se conectado ao intestino médio pelo ducto vitelino (OLIVEIRA et al., 2015). Em fases iniciais da gestação o SV é mais evidente macroscopicamente na maioria das espécies mamíferas, iniciando sua regressão à medida que o alantoide se funde com o cório (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Porém, em cães, esta estrutura persiste até o nascimento sendo cada vez mais evidente no decorrer do desenvolvimento fetal.

O bom desenvolvimento do embrião está altamente relacionado à essa estrutura, uma vez que além dos fatores citados anteriormente, é responsável também pela formação dos órgãos fundamentais para a sobrevivência embrionária (MANÇANARES et al., 2013).

2.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs)

As células-tronco são células indiferenciadas ou com baixo grau de diferenciação que tem como principais características a auto-renovação, ou seja, a capacidade de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, além da capacidade de se diferenciar nos mais diversos tipos celulares (LEMISCHKA, 2005). A expressão fenotípica das células-tronco é regulada por sua resposta à estímulos microambientais como fatores de crescimento, citocinas, interações célula-célula e célula-matriz, onde esta matriz extracelular (MEC) produz estímulos mecânicos (tensão, rigidez de substrato e topografia), além moléculas de proteínas, tendo impacto profundo na auto-renovação e diferenciação destas células no controle de transcrição gênica e vias de diferenciação (KSCHITZ et al., 2012). Ou seja, no cultivo *in vitro* 2D, o comportamento

fisiológico celular pode ser afetado, já que estas células são cultivadas em placas de cultura. Diferente do cultivo 3D, onde as células podem ser cultivadas em um ambiente fisiologicamente semelhante do ambiente *in vivo*.

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação, podendo ser totipotentes (capazes de se diferenciar em todas as linhagens celulares, incluindo tecidos extra-embrionários. Incluem os blastômeros até o estágio de mórula), pluripotentes (capazes de se diferenciar nos três folhetos germinativos, como as células-tronco embrionárias – ESCs - e as células-tronco pluripotente-induzidas - iPSCs) (MORGANI et al., 2013), ou ainda multipotentes, sendo estas mais direcionadas ao desenvolvimento tecidual (se diferenciando em todos os tipos celulares de uma determinada linhagem) (KHANLARKHANI et al., 2016). Além de possuir um menor potencial de diferenciação, as células-tronco multipotentes possuem metabolismo mais lento e uma maior estabilidade quando comparadas às células-tronco pluripotentes e totipotentes, características estas que diminuem o risco de rejeição ao paciente (LIAO; TSE, 2013), sendo consideradas ferramentas importantes para aplicabilidade médica.

MSCs são células-tronco multipotentes, com alta plasticidade, capazes de realizar diferenciação em múltiplas linhagens celulares (BYDŁOWSIKY et al., 2009). Por serem heterogêneas, participando do desenvolvimento de várias estruturas, as MSCs são comumente isoladas e caracterizadas a partir do tecido adiposo, medula óssea, cordão umbilical, fígado, além de anexos extra-embrionários como o âmnion e saco vitelino (SEO et al., 2009; URANIO et al., 2011; WENCESLAU et al., 2011; MANÇANARES et al., 2015).

Existem requerimentos mínimos para uma população de células possa ser classificada como MSC: primeiramente que estas, ao serem isoladas em cultivo, sejam aderentes ao plástico com morfologia fibroblastóide; secundamente, que os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, enquanto que CD34, CD45, CD79 ou CD19 (marcadores de células hematopoiéticas) estejam ausentes; que formem colônias quando cultivadas em baixa densidade e por fim, que estas células possam ser diferenciadas em osteócitos, condrócitos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006). As MSCs são fáceis de isolar, podem ser obtidas através de múltiplas fontes, possuem alta capacidade de propagação em cultura, além de sua multipotencialidade e características imuno-reguladoras, o que as tornam ótimas candidatas para a utilização na regeneração tecidual (EMADEDIN et al., 2012).

As MSCs possuem capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares, bem como condrogênicas, adipogênicas, osteogênicas, miogênicas, entre outras. Vários processos estão envolvidos nesta diferenciação, porém os três principais são: interação célula-célula, célula-matriz, divisão celular e regulação gênica (BYDŁOWSKI et al., 2009). Alguns sinais químicos

e/ou biológicos atuam como indutores da diferenciação de MSCs, dentre eles o TGF (fator de crescimento transformador), FGF (fator de crescimento fibroblástico), IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), EGF (fator de crescimento epidermal) e Wnt (proteína sinalizadora da família Wingless) (HASHIMOTO et al., 2006), sendo o Wnt a molécula de sinalização crítica que impulsiona a proliferação do nicho de células-tronco intestinais (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009).

2.3. INTESTINO

O intestino é um órgão que tem como funções fundamentais para a manutenção da homeostase a digestão e absorção de nutrientes e água (VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009; MIURA; SUZUKI, 2018). O desenvolvimento do sistema digestório se inicia com a formação do intestino primitivo a partir da incorporação do endoderma e do saco vitelino durante o dobramento embrionário (MOORE; PERSAUD, 2004). O intestino primitivo é subdividido nos intestinos anterior, médio e posterior, onde a faringe, esôfago, estômago e duodeno são diferenciados a partir do primeiro, enquanto que o intestino médio dá origem ao intestino delgado (jejuno e íleo) e parte do intestino grosso, sendo sua última porção formada a partir do intestino posterior (MIURA; SUZUKI, 2018).

O intestino delgado é composto pelas camadas serosa, muscular, submucosa e mucosa, onde esta última possui um lúmen revestido por uma monocamada de células epiteliais colunares simples distribuídas em um grande número de vilosidades (NAKAMURA, 2018). Estas vilosidades aumentam a área de superfície de contato para facilitar uma maior absorção de nutrientes, possuindo principalmente na sua composição enterócitos, que são o tipo celular mais comum encontrado no epitélio, responsáveis pela absorção de nutrientes, além das células caliciformes, responsáveis por produzirem o muco de revestimento do epitélio para proteção contra patógenos (FAIR et al., 2018). Enquanto que no intestino grosso, apesar de apresentar os mesmos tipos celulares, não apresenta vilosidades em seu epitélio.

Cada vilosidade tem sua base rodeada de criptas intestinais, que contém em sua estrutura células-tronco e células de Paneth, que são células secretoras de peptídeos antimicrobianos (CLEVERS, 2013; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009), além de possuírem também como função regular a diferenciação destas células-tronco (FAIR et al., 2018). O intestino é o órgão com a maior capacidade de autorrenovação no indivíduo adulto, renovando inteiramente seu epitélio a cada 4-5 dias (BARKER et al., 2007). As células epiteliais intestinais são mantidas

devido à proliferação e diferenciação destas células-tronco, que migram a partir da base da cripta, emergindo para as vilosidades (CAO et al., 2011).

Interações recíprocas entre o epitélio e o estroma subjacente são responsáveis pelo crescimento, morfogênese e diferenciação intestinal (BATTIS et al., 2006). Os fatores de transcrição CDX1 e CDX2 são expressos no endoderma em desenvolvimento, com expressão persistente na idade adulta, porém a proteína CDX1 é mais abundante nas criptas intestinais, diminuindo sua expressão nas vilosidades, enquanto o CDX2 é expresso uniformemente ao longo desse eixo (GRAINER et al., 2013). Alguns fatores são responsáveis por essa mediação, como por exemplo BMP (*Bone Morphogenetic Protein* - um regulador do desenvolvimento das criptas intestinais), homeobox (gene regulador do desenvolvimento embrionário), SOX9 (responsável pela diferenciação das células de Paneth), entre outros fatores (FENG et al., 2013). Várias linhas de evidências revelaram que a sinalização Wnt (via associada à proliferação celular e formação tecidual) é o fator mais dominante no controle da proliferação, diferenciação celular e apoptose ao longo do eixo cripta-vilosidade (YEN; WRIGHT, 2006).

Um receptor de células-tronco intestinal regulado pela via Wnt é o Lgr5 (receptor 5 acoplado à proteína G rico em leucina), marcador expresso em um número limitado de células-tronco presentes na base da cripta capaz de se diferenciar em todas as linhagens de células intestinais (SATO et al., 2011). Estas células são cruciais para a renovação contínua do epitélio, dando origem a células-tronco filhas, também conhecidas como amplificadoras de trânsito (TA), que são uma população multipotente altamente proliferativa que se diferenciam nas demais linhagens epiteliais à medida que migram da cripta em direção às vilosidades, ou em células de Paneth quando migram para base da cripta (FAIR et al., 2018). Apesar de ser expresso nas células-tronco intestinais, o Lgr5 também pode ser encontrado em outros tecidos como por exemplo glândulas mamárias e folículos pilosos (WU et al., 2013; JACKS et al., 2018), porém a olfactomedina 4 (Olfm4) é um marcador altamente específico para as células-tronco Lgr5 positivas, sendo estritamente expresso na cripta intestinal (SCHUIJERS et al., 2014), além de ser um marcador adicional de maturação intestinal precoce (FINKBEINER et al., 2015).

Altas concentrações de Wnt3A e EGF estão presentes na base das criptas intestinais, sendo responsáveis pela manutenção e proliferação das células-tronco (CHIA; KUO, 2010). As R-spondinas potencializam a atividade da via Wnt em células-tronco epiteliais, enquanto que noggin inibe os sinais de diferenciação da via BMP (URBISCHERK et al., 2019). Sato et al (2009), em seus estudos com camundongos, verificaram que células intestinais Lgr5 positivas isoladas quando cultivadas tridimensionalmente com combinações de Wnt3A, EGF, noggin e R-spondin, dão origem a estruturas semelhantes a criptas intestinais.

2.4. ORGANÓIDES

Os organóides são modelos de cultivo 3D nos quais células-tronco se desenvolvem em sistemas com fisiologia nativa de seu ambiente *in vivo* (NATASANTI et al., 2016). Em 1975 foram relatados trabalhos com a formação de “agregados celulares” (LEMPERG et al., 1975), porém em 1986 o termo organoide passou a ser utilizado (BASSLEER et al., 1986). Atualmente, os organóides são estruturas tridimensionais auto-organizadas derivadas a partir do cultivo de células-tronco embrionárias pluripotentes (ES), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) ou células-tronco adultas, utilizando meio de cultivo com fatores de crescimento que sintetizam processos de diferenciação de órgãos embrionários (BREVINI et al., 2017; CORTEZ et al., 2018).

O modelo organóide é um avanço tecnológico importante já estabelecido como uma ferramenta essencial em várias aplicações de biologia básica e clínica (FATEHULLAH et al., 2016), pois permitiu que um novo nível de biomimética fosse alcançado (YU et al., 2019), sendo utilizado para a pesquisa fundamental, modelagem de doenças, testes de drogas e transplantes, possibilitando projetar novas estratégias de tratamentos personalizados (NATASANTI et al., 2016). Os organóides introduzem um mecanismo pelo qual os tecidos podem ser estudados utilizando células específicas de pacientes (CORTEZ et al., 2018). Um exemplo deste mecanismo é o cultivo 3D de células-tronco tumorais derivadas de biópsias de carcinomas dando origem a organóides de tumor para avaliar as características histológicas e fisiológicas específicas do paciente, possibilitando assim uma triagem de drogas antes da sua aplicação (DUTTA et al., 2017).

Para ser considerado organóide, este deve possuir como características: estrutura 3D, construções multicelulares complexas, auto-organização, ser cultivado *in vitro* e ser capaz de recapitular métodos de desenvolvimento embrionário (MORIZANE; BONVENTRE, 2017). Atualmente existem três métodos para desenvolver um organóide *in vitro*: no cultivo em matrizes extracelulares artificiais, por agitação em biorreatores ou por método de interface ar-líquido (onde os organóides são cultivados sobre uma matriz em gel tendo seus lúmens expostos ao ar ao invés de estarem submersos ao meio de cultivo) (YU et al., 2019). Devido à influência da MEC no controle fisiológico celular, o tipo de cultivo 3D deve ser avaliado de acordo com a linhagem de célula-tronco a ser utilizada, onde as propriedades físico-químicas devem estar semelhantes ao ambiente *in vivo* onde estas células residem. Por exemplo, a MEC de tecidos cerebrais não possui as mesmas características que a matriz de tecidos intestinais, ou seja, as células-tronco dos respectivos tecidos devem ser cultivadas de maneira diferenciada. O

Matrigel é uma matriz extracelular artificial criada a partir de linhagens de células tumorais por Engelbreth, Holm e Swarm (SIMIAN; BISSEL, 2017), onde células-tronco intestinais são usualmente cultivadas dando origem a organóides tridimensionais (BARKER et al., 2007).

Os organóides intestinais recapitulam as estruturas epiteliais *in vivo*: um lúmen central rodeado por brotamentos semelhantes a criptas, onde estas criptas apresentam o posicionamento de cada tipo celular refletindo a mesma localização do epitélio intestinal (DATE; SATO, 2015). Sato et al. (2009) demonstraram que células-tronco Lgr5 positivas isoladas de criptas intestinais de camundongos poderiam ser capazes de gerar, no cultivo 3D, organóides contendo células enteroendócrinas, células de Paneth, células caliciformes e, até mesmo, enterócitos apresentando “*brush borders*” (microvilosidades na superfície celular). Vários tipos de cultivo *in vitro* baseados em explantes de tecidos ou monocamadas têm sido utilizados para o estudo do epitélio intestinal, porém o cultivo de organóides provou ser o recurso mais valioso no estudo de sua função devido a capacidade das células-tronco se dividirem e produzirem um epitélio polarizado totalmente diferenciado no cultivo 3D, onde estes organóides ainda podem ser mantidos a longo prazo e criopreservados com pouca perda de viabilidade (DERRICOTT et al., 2019).

A utilização de organóides como plataforma de triagem de drogas pode apoiar a identificação de respostas a terapias, poupando a carga desnecessária de tratamentos não responsivos, aumentando assim o benefício das intervenções terapêuticas e diminuindo as chances de efeitos colaterais (MULLER; KULMS, 2018). Por possuírem todos os tipos celulares presentes no epitélio intestinal, os organóides intestinais são ideais para o estudo desses tipos de células especializadas e suas disfunções, como por exemplo a fibrose cística, doença inflamatória intestinal, além de permitir o estudo das interações hospedeiro-microorganismos (NAKAMURA, 2018). Além de servirem como modelo de estudo, existem relatos também da utilização de organóides intestinais para a realização de terapias. Fordram et al. (2013) transplantaram organóides intestinais no cólon lesionado de camundongos e verificaram a regeneração deste epitélio por meio da formação de estruturas semelhantes a criptas epiteliais, expressando marcadores de diferenciação específicos da região.

A formação de organóides intestinais por diferentes linhas celulares pode oferecer um novo sistema experimental, permitindo que novos modelos de estudo possam ser utilizados para uma melhor compreensão das vias de diferenciação intestinal, além de obter maiores informações sobre doenças gastrointestinais e, potencialmente, fornecer novas terapias.

3. HIPÓTESE

O saco vitelino canino possui multipotencialidade para o desenvolvimento de organóides intestinais em cultivo tridimensional.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVOS GERAIS

Verificar se o cultivo tridimensional de células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino é capaz de formar um organoide intestinal.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino através das análises de diferenciação celular (adipogênica, osteogênica e condrogênica) curva de crescimento, unidade formadora de colônia, viabilidade celular e citometria de fluxo;

2. Induzir a diferenciação endodermal e intestinal das células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino com o uso de fatores de crescimento;

3. Verificar se o cultivo tridimensional do saco vitelino canino é capaz de desenvolver um organóide intestinal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A metodologia a seguir foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) gerando o número de protocolo 1186280617. Para melhor compreensão o experimento foi dividido em 2 etapas: cultivo bidimensional com caracterização das MSCs e cultivo tridimensional para diferenciação e formação dos organóides.

5.1. LABORATÓRIO DE ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Células – Tronco e Terapias Gênicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Pirassununga.

5.2. CULTIVO BIDIMENSIONAL – CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs

Para caracterizar as MSCs foram realizados protocolos adaptados de Wenceslau et al. (2011), Maçaneres et al. (2015) e Fratini et al. (2016). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas.

5.2.1. Isolamento de cultivo das MSCs

Os fetos caninos foram obtidos a partir de histerectomias de cadelas sob anestesia realizadas em campanhas de castração na cidade de Pirassununga ou mediações. A idade gestacional dos fetos foi definida de acordo com Evans e Sack (1973) conforme as características morfológicas. Os úteros foram dissecados, as membranas extraembrionárias rebatidas para a exposição e coleta do saco vitelino. Em ambiente estéril e com o auxílio de um bisturi, o SV foi isolado, lavado em PBS (tampão fosfato-salino), plaqueado de acordo com Wenceslau et al. (2011) em placas de Petri de seis poços (Corning) cultivado em α Minimum Essential Medium (α MEM) (Gibco) suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 1% de solução antibiótica (penicilina 10.000 U/ml; 25 mg/ml streptomina 10.000 mg/ml) (Invitrogen), 1% de L-glutamina 200 mM (Invitrogen) e 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma), incubados em uma atmosfera umidificada em 5% de CO₂ a 37°C. Após 48 horas o meio contendo células não aderentes foi removido, sendo substituído a cada dois dias. Ao serem constatadas 80% a 90% de confluência (porcentagem da superfície da placa preenchida por células), foram realizadas passagens para propagação destas e posterior caracterização celular.

5.2.2. Passagem celular

Após apresentarem confluência de 80 a 90%, as células derivadas do isolamento celular (nomeadas P0/passagem 0) foram lavadas duas vezes com PBS para a retirada do SFB

remanescente. Após a lavagem, foi adicionado Tryple express (Gibco) (o suficiente para cobrir a superfície da placa) de 5 a 8 minutos a 37°C para a retirada das células. Após este período, foi adicionado meio de cultivo com SFB para inativação da enzima, o meio com células transferido para microtubos (Kasvi) e centrifugados a 1600g por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet (agregado celular visível no fundo do tubo) foi ressuspensionado com 600ul de meio suplementado. Este meio foi distribuído para duas novas placas (100ul por poço), completando 2ml em cada poço. As placas foram novamente cultivadas em ambiente controlado para aderência e multiplicação celular. A cada passagem o aumento de placas, consequentemente de células, é exponencial, sendo estas denominadas de acordo com a passagem sofrida (P1, P2, P3, etc).

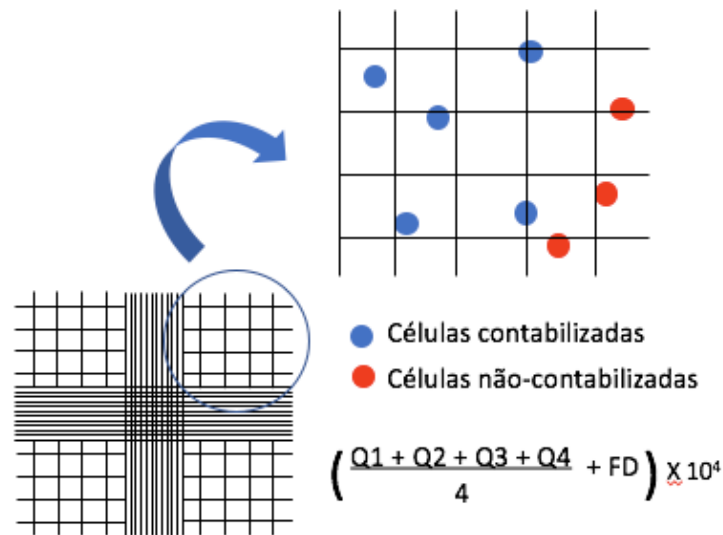
5.2.3. Congelamento/descongelamento celular

Para realização o congelamento as células foram tripsinizadas com tryple express (Gibco) (como descrito no item anterior). Após a centrifugação o pellet foi ressuspensionado com meio de cultivo. As células foram transferidas para criotubos (Corning), adicionando na seguinte proporção: 45% de α MEM (Gibco) + 45% de SFB (Gibco) e 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma), sendo os criotubos postos em freezer -80°C em Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific) por no mínimo 6 horas e posteriormente em nitrogênio líquido. Para o descongelamento, o criotubo foi aquecido a 40°C em banho-maria, centrifugado a 1600g por 5 minutos e o pellet remanescente ressuspensionado em meio de cultivo.

5.2.4. Viabilidade celular

Para determinar a quantidade de células viáveis pós congelamento, amostras de 1×10^5 células foram congeladas e conservadas em nitrogênio líquido por uma semana. Após este período foram descongeladas, coradas com Trypan blue (Gibco) e contadas (Fig. 1) para determinar a quantidade de células vivas e células mortas. A viabilidade foi expressa em porcentagem de células não coradas (viáveis) em relação às coradas (não viáveis).

Figura 1: Representação de contagem celular em câmara de Neubauer. 10ul de meio utilizado para ressuspender o pellet é colocado sobre a malha, onde as células contabilizadas são aquelas que se encontram inteiramente ou maior parte dentro de cada quadrante. O cálculo realizado foi representado, sendo o fator de diluição (FD) a quantidade de meio utilizado para ressuspender o pellet (em ml).



Fonte: Autoria própria

5.2.5. Unidade formadora de colônia (UFC)

Amostras de 1×10^4 , 5×10^4 e 1×10^5 foram plaqueadas em placas de Petri de 100mm (Corning). As células foram mantidas em cultivo por 15 dias, sendo o meio de cultivo trocado a cada dois dias. Após este período, as células foram lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos e coradas com Giemsa 0,1% (Sigma) por 15 minutos. Apenas colônias contendo mais de 50 células foram utilizadas para a contabilização.

5.2.6. Diferenciação in vitro

Para o teste de diferenciação, foram utilizados protocolos pré-estabelecidos pelo fabricante (R&D Systems), sendo o grupo controle cultivado em meio α MEM.

5.2.6.1. Diferenciação osteogênica

Foram plaqueadas em placas e Petri de 35 mm 1×10^5 células em meio de diferenciação StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media (CCM007) com adição de

1% de antibiótico. Ao atingir 70% de confluência, o meio foi suplementado com o diferenciador StemXVivo™ Osteogenic Supplement Media Supplement for Human MSC Osteogenesis (CCM008) com adição de 1% de antibiótico, sendo cultivado durante 21 dias e trocado a cada 3 dias. Após este período, as células foram fixadas durante 30 minutos em paraformaldeído 4% e coradas com Alizarim Red por 15 minutos.

5.2.6.2. Diferenciação condrogênica

Foram suspendidas $2,5 \times 10^5$ células em 500 μ l de meio básico StemXVivo™ Human/Mouse Chondrogenic (CCM005) com adição de 1% de antibiótico em tubos Falcon de 15 ml. As células foram centrifugadas a 300g por 5 minutos e cultivadas durante 4 dias. Após este período, o meio básico foi suplementado com o diferenciador StemXVivo™ Human/Mouse Chondrogenic Supplement, Media Supplement for Human and Mouse MSC Chondrogenesis (CCM006). As células foram cultivadas por 21 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias. Após este período, os sedimentos foram fixados por 30 minutos em paraformaldeído 4%, com posterior processo de desidratação e imersão em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 5 μ m e corados com Alcian Blue (Sigma).

5.2.6.3. Diferenciação adipogênica

Foram cultivadas 1×10^5 células em placas de Petri de 35mm em meio de cultura de diferenciação StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic (CCM007) com 1% de antibiótico, sendo este meio trocado a cada 3 dias. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi suplementado com o diferenciador StemXVivo™ Adipogenic Supplement (CCM011). As células foram cultivadas até completar o período de 21 dias, sendo o meio trocado a cada 3 dias, posteriormente fixadas 30 minutos em paraformaldeído 4%, lavadas três vezes em PBS e coradas com Sudan Black (Gibco) por 5 minutos.

5.2.7. Curva de crescimento

Para avaliar a capacidade de propagação celular e o perfil de replicação, células derivadas do cultivo primário (P1) foram plaqueadas em placas de 12 poços (Corning) na densidade de 3×10^4 por poço. Após 96 horas, as células foram tripsinizadas e contabilizadas para determinar

o número total resultante em cada poço. A partir desta contagem, foram novamente plaqueadas 3×10^4 células por poço. Este procedimento foi repetido até não se obter mais esta densidade celular. Com os dados obtidos durante todas as passagens foi estabelecido o padrão da curva de crescimento da linhagem celular.

5.2.8. Citometria de fluxo

Amostras de 1×10^5 células foram centrifugadas em PBS a 1800rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, a solução bloqueio foi adicionada PBS + 0,5% Tween 20 + 0,1% albumina bovina sérica (Sigma) para posterior adição dos anticorpos primário e conjugados, deixando agir 20 min a 4°C. Após duas lavagens com PBS, os anticorpos secundários foram adicionados por 1 hora a 4°C. As células foram passadas em um citômetro de fluxo (Accuri) utilizando o software CellQuest e analisadas com o software Paint-A-Gate. Os marcadores analisados foram: CD105 (abcam ab156756) [1:1], CD90 (12-5900-42) [1:100], CD34 (12-0340-42) [1:100] e CD45 (11-5450-42) [1:100] (CD90, CD34 e CD45 - eBioscience).

5.3. CULTIVO CELULAR TRIDIMENSIONAL

5.3.1. Isolamento de criptas intestinais caninas

Baseando-se no protocolo de Sato et al. (2011), intestinos de fetos caninos foram isolados para serem utilizados no cultivo como grupo controle. Com o auxílio de um estereomicroscópio (Labomed) e bisturi, os intestinos foram transferidos para uma placa de Petri 100mm (Corning), sendo lavados em PBS frio. Posterior à lavagem, os intestinos foram picados em fragmentos de aproximadamente 2mm e transferidos para um tubo Falcon 50ml (Nest Scientific) contendo 10ml de PBS. Com o auxílio de uma pipeta sorológica (Kasvi), os fragmentos intestinais em PBS foram ressuspensos três vezes, sendo posteriormente sedimentados por aproximadamente 30 segundos, descartando o sobrenadante. Este procedimento de ressuspensão e sedimentação foi reproduzido por aproximadamente 20 vezes, até o sobrenadante apresentar-se límpido. Os fragmentos foram então imersos em 25 ml de tryple express (Gibco) (por 15 minutos a 37,5°C. Posteriormente, o meio foi centrifugado a 800g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, sendo os fragmentos ressuspensos três vezes em 10ml de PBS frio contendo 0,1% de SFB (Gibco). Após a sedimentação, o sobrenadante foi

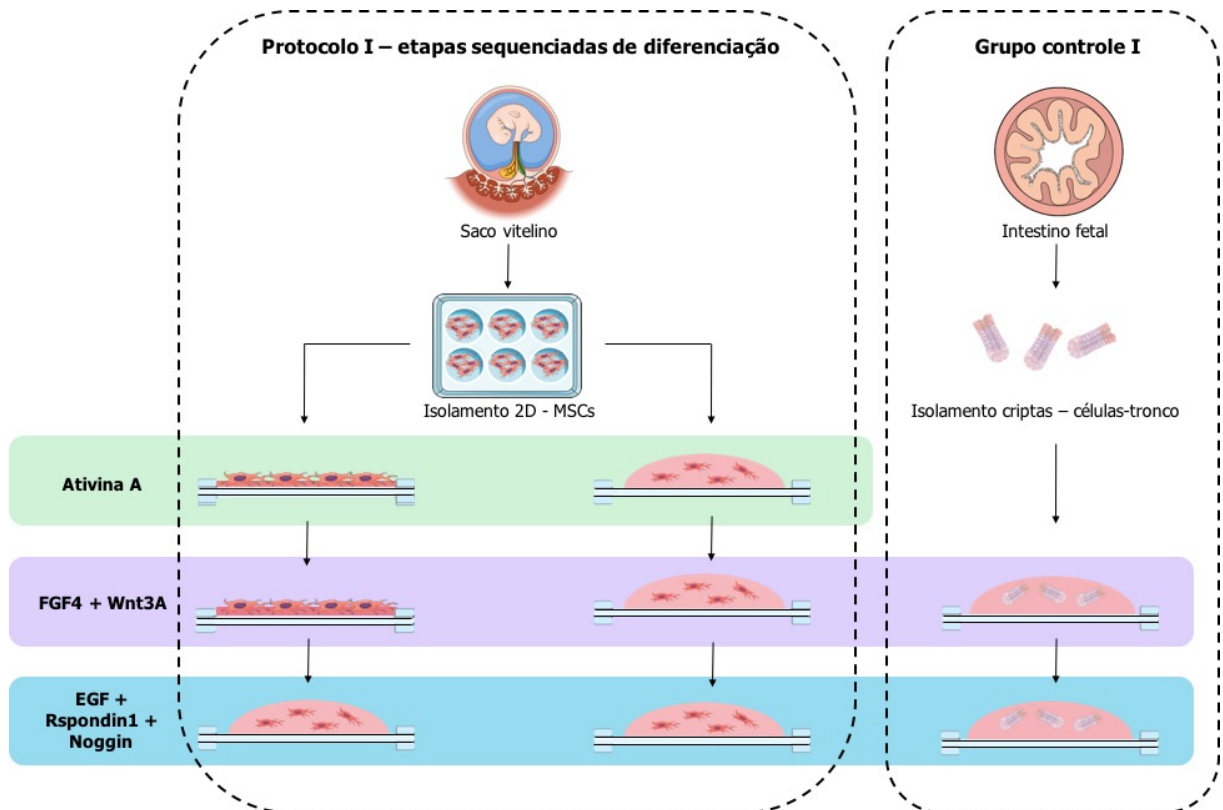
filtrado em um cell strainer 100um (Falcon) em um novo tubo Falcon, sendo este filtrado denominado filtrado 1. Este procedimento de ressuspensão dos fragmentos e filtração do sobrenadante foi repetido duas vezes, gerando os filtrados 1, 2 e 3, respectivamente. Um ml de cada filtrado foi transferido para placas de 35mm (Corning) para verificar em um microscópio de luz qual possuía uma maior quantidade de criptas intestinais íntegras e menor quantidade de debris celular. O filtrado escolhido foi centrifugado a 800g por 5 minutos a 4°C e o pellet remanescente utilizado para o cultivo dos grupos controles.

5.3.2. Diferenciação celular

Dois protocolos principais de cultivo foram realizados com diferentes combinações dos fatores de crescimento na tentativa de desenvolver organóides intestinais derivados do saco vitelino. O primeiro protocolo, baseado em McCracken et al. (2011), consistiu do cultivo em cama e em gotas de Matrigel (Corning) das MSCs do saco vitelino, passando por etapas sequenciadas de diferenciação (diferenciação endodermal, indução intestinal e crescimento dos organóides), sendo representado na figura 2. Já o segundo protocolo, esquematizado na figura 3, foi adaptado posterior aos primeiros resultados, realizando o cultivo em gotas de Matrigel das MSCs e do tecido do saco vitelino (sem isolamento celular), passando por uma única etapa de diferenciação.

5.3.2.1 Protocolo I – Cultivo sequenciado de diferenciação

Figura 2: Desenho experimental do protocolo I. Células-tronco mesenquimais cultivadas em cama e gota de Matrigel, passando por etapas sequenciadas de diferenciação endodermal (verde), intestinal (lilás) e, por fim, indução do crescimento de organóides (azul), tendo como grupo controle a indução do crescimento de organóides de células-tronco intestinais na gota de Matrigel.



Fonte: Autoria própria.

5.3.2.1.1 MSCs sobre a cama de Matrigel

Em uma placa de 24 poços (Nunclo - Thermo Scientific) foram adicionados 200ul de Matrigel na base de cada poço. A placa forrada foi inserida em uma estufa a 37,5°C por 10 minutos para a solidificação do gel. MSCs provenientes de quarta passagem diluídas em meio α MEM (Gibco) [15% SFB (Gibco) + penicilina-estreptomicina 10.000UI (Gibco) + L-glutamina 2mM (Gibco) + aminoácido não-essencial 100x (Sigma) + 1ul/ml anfotericina (Gibco)] foram adicionadas sobre a cama de Matrigel e cultivadas sob atmosfera controlada (37,5°C, 5% CO₂) durante três dias na tentativa de obter aderência e confluência destas células. Posterior à aderência, o meio α MEM foi substituído por meio de diferenciação endodermal [RPMI 1640 (Corning) + 1% L-glutamina 2mM + 1% penicilina-estreptomicina 10.000UI + Ativina A 100ng/ml (Peprtech)]. As células foram cultivadas por três dias, sendo o meio trocado a cada dia com adições crescentes de SFB (Gibco) [0,2% (vol/vol) após 24 horas e 2%

(vol/vol) após 48 horas]. Ao fim das 72 horas o meio foi substituído por meio de diferenciação intestinal [RPMI 1640 (Corning) + 1% L-glutamina 2mM + 1% penicilina-estreptomicina 10.000UI + FGF4 500ng/ml (Peprtech) + Wnt3A 500ng/ml (Peprtech)], onde as MSCs foram cultivadas por 4 dias, sendo este meio trocado a cada 24 horas. Após a etapa de diferenciação intestinal, esperava-se a formação de esferóides (pequenas colônias celulares) sobrepostas ao gel. Estas células e esferóides foram retirados da cama de Matrigel (protocolo descrito no item 5.4). Após a centrifugação, o pellet foi mensurado em ul (comparando o espaço que o pellet ocupava no fundo do tubo em relação à quantidade de microlitros de meio presente em um outro microtubo). Para cada 1ul de célula foram adicionados 25ul de Matrigel. As células foram ressuspensas e o gel transferido para placa de 24 poços formando gotas de 50ul em cada poço. Após a solidificação (10 minutos em estufa), as gotas de Matrigel contendo as células foram submersas em meio de crescimento de organóides [DMEM/F12 (Corning) + L-glutamina 2mM + penicilina-estreptomicina 10.000UI + B27 1X (Invitrogen) + Rspodin1 500ng/ml (Peprtech) + EGF 100ng/ml (Peprtech) + noggin 100ng/ml (Peprtech)] e cultivadas durante 14 dias, sendo o meio trocado a cada quatro dias.

5.3.2.1.2. MSCs na gota de Matrigel

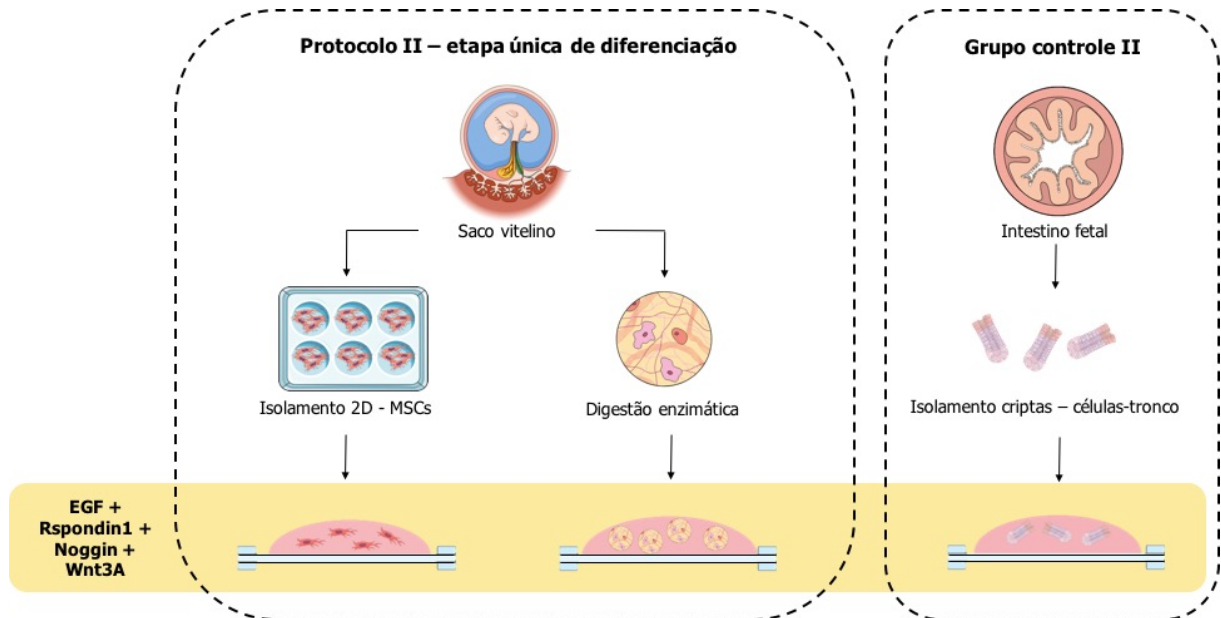
As MSCs provenientes de quarta passagem foram centrifugadas a 1600g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet mensurado em tamanho e transferido para gotas de 50ul de Matrigel (Corning) [1:25], como descrito no protocolo anterior. Após a solidificação das gotas em estufa, as células passaram pelas mesmas etapas descritas de diferenciação endodermal, indução intestinal e crescimento de organóides, por 3, 4 e 14 dias, respectivamente.

5.3.2.1.3. Grupo controle I – criptas intestinais em cultivo sequenciado

O pellet do filtrado selecionado do isolamento intestinal foi mensurado em tamanho, centrifugado a 800g por 5 min a 4°C, sendo imerso em Matrigel (Corning) em gotas de 50ul [1:25]. Após a solidificação, as células passaram pelo processo de indução intestinal e crescimento de organóides (4 e 14 dias, respectivamente), não passando pelo processo de diferenciação endodermal.

5.3.2.2 Protocolo II – Cultivo único de diferenciação

Figura 3: Desenho experimental do protocolo II. Células-tronco mesenquimais isoladas e o tecido do saco vitelino digerido em collagenase foram cultivados em gotas de Matrigel submersas em um único meio de indução do crescimento de organóides, tendo como grupo controle células-tronco intestinais cultivadas sob mesmas condições.



Fonte: Autoria própria.

5.3.2.2.1. MSCs na gota de Matrigel

MSCs isoladas provenientes de terceira passagem foram centrifugadas, o pellet remanescente medido, ressuspensão em Matrigel (Corning) [2:25], sendo as gotas de 25ul transferidas para placa de 48 poços. Após a solidificação, as gotas foram cultivadas submersas em meio de diferenciação intestinal (com Rspodin1, EGF, noggin e Wnt3A – todos Peprotech), nas mesmas concentrações citadas anteriormente, durante 14 dias.

5.3.2.2.2. Tecido do saco vitelino em gota de Matrigel

Após a digestão enzimática em collagenase IV (Sigma) do tecido, o SV foi centrifugado, o sobrenadante descartado, sendo o pellet medido em tamanho e ressuspensão em Matrigel (Corning) [2:25]. Em placa de 48 poços (Costar) foram distribuídas gotas de 25ul (a concentração, o tamanho das gotas e dos poços foram alterados na tentativa de reduzir o espaço célula/célula e célula/matriz), solidificadas e submersas por meio de diferenciação intestinal [DMEM/F12 (Corning) + L-glutamina 2mM + penicilina-estreptomicina 10.000UI + B27 1X

(Invitrogen) + Rspodin1 500ng/ml (Peprotech) + EGF 100ng/ml (Peprotech) + noggin 100ng/ml (Peprotech) + Wnt3A 500 ng/ml (Peprotech)]. As células foram cultivadas por 14 dias, sendo o meio trocado a cada 4 dias.

5.3.2.2.3. Grupo controle II

O pellet do filtrado selecionado do isolamento intestinal foi centrifugado a 800g por 5 minutos a 4°C e ressuspenso em Matrigel (Corning) [2:25]. Gotas de 25ul foram transferidas para placa de 48 poços e cultivadas em meio de diferenciação intestinal por 14 dias em atmosfera controlada.

5.4. REMOÇÃO DAS CÉLULAS DO MATRIGEL

O meio diferenciador foi substituído por Cell Recovery (Corning) e a placa sobreposta em gelo por 20 min para a liquefação do Matrigel (Corning). Com o auxílio de uma pipeta, as matrizes contendo as células de cada poço foram aspiradas e transferidas para tubos [Falcon 15ml (Nest Scientific) no protocolo I e microtubo 1,5ml (Kasvi) no protocolo II], onde foram adicionados meio base (meio respectivo ao utilizado em cada etapa de diferenciação – RPMI1640 ou DMEM/F12 – ambos Corning), ressuspenso 100 vezes em gelo e centrifugadas a 800g por 5 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o processo de ressusensão e centrifugação foi repetido até o pellet apresentar-se visualmente livre de Matrigel.

5.5. RT-qPCR

Para a análise da formação dos organoides intestinais e diferenciação endodermal, foram realizados testes de expressão gênica de marcadores intestinais CDX2, CDX1, LGR5 e TBX1, além dos marcadores de endoderme definitiva TRH e GABPB1, sendo a sequência dos oligonucleotídeos descritas na tabela 1. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit Trizol (Sigma), tratado com DNase I (Invitrogen), sendo a concentração total de RNA celular e a análise da integridade deste RNA determinados através da utilização do espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). O RNA extraído foi armazenado a -80°C até o momento da análise. Após a extração, o RNA foi convertido em cDNA com o kit Enzima

Transcriptase reversa superscript III (Invitrogen) em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A amplificação do cDNA foi realizada utilizando-se *primers* desenhados no software Primer-blast (NCBI) a partir de sequências obtidas do banco de dados do GenBank (NCBI), para a expressão dos marcadores. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando-se o kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Os genes considerados para uma dada amostra foram amplificados utilizando-se a placa de PCR. Os valores de expressão gênica foram relacionados à expressão do gene endógeno GAPH. A quantificação das amostras foi avaliada utilizando método $2^{-\Delta CT}$, em duplicatas (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados para o RT-qPCR. CE: células epiteliais; CT: células-tronco; EC: ectoderme; ED: endoderme definitiva; ID: intestino delgado; IG: intestino grosso; ME: mesoderme. *marcadores de camadas germinativas não expressos no saco vitelino.

Genes	Foward	Reverse	Marcação	Tm °C
LGR5	TCCAACCTCAGCGTCTTCAC	GCAAGACGTAGCTCCTCCAG	CT intestinais (SATO et al., 2009)	62
CDX2	TCGGGAGCCAAGTGAAAACC	CAGCTTCTCCGGATGGTG	CE intestinais (SILBERG et al., 2000)	62
CDX1	GGTCTACACTGACCACCAGC	CCAGTCTTCACCTGCCGTT	CE intestinais (SILBERG et al., 2000)	62
GABPB1*	CTACAGACTGGCTGGGAACC	CGGTCCACTTTGGTCTTGC	ED, EC, ME, ID, IG (HOU et al., 2007)	62
TRH*	GAGTCAGAGTCCCAGACGGT	TCCTCTTCTCTTCGACCCC	ED, ID (HOU et al., 2007)	62
TBX1*	TCAAGTGAAGCTCTTCGGCAT	ATAGACAACATGGAAGCGGGG	ME, ID (HOU et al., 2007)	62
GADPH	CTTCACCACCATGGAGAAGC	CAGCTCAGGGATGACCTTGC	Endógeno (SOUZA et al., 2019)	62

Fonte: Autoria própria

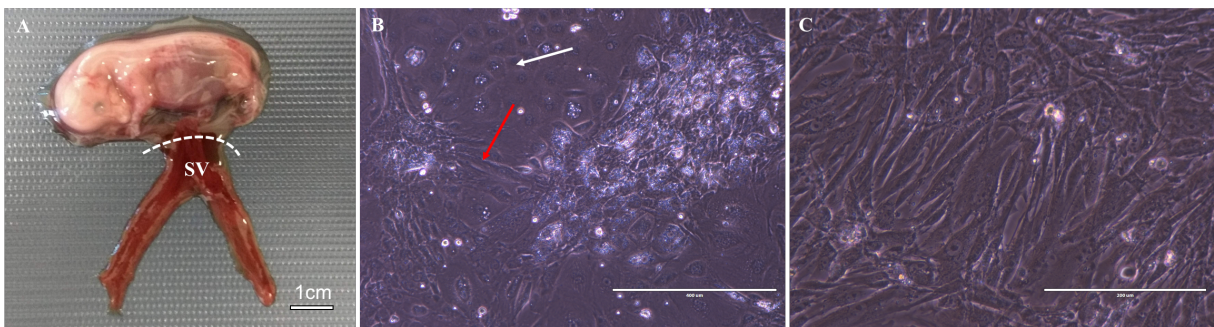
6. RESULTADOS

6.1. CULTIVO BIDIMENSIONAL – CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs

6.1.1. Isolamento e cultivo das MSCs

Foram obtidos em diferentes coletas fetos caninos com idades gestacionais variando aproximadamente entre 25 e 50 dias, onde a partir destes, os sacos vitelinos foram isolados e cultivados (Fig. 4). As células provenientes do cultivo apresentavam, em sua maioria, morfologia fibroblastóide, sendo cultivadas em média por um período de 4 a 5 dias para atingirem 80 a 90% de confluência. Estas células sofreram passagens para replicação (no máximo até terceira passagem), sendo posteriormente estocadas congeladas. Os fragmentos teciduais em cultivo primário aderiram à placa liberando células em diferentes morfologias, onde algumas se apresentavam globosas com núcleo proeminente, enquanto outras se apresentavam fusiformes semelhantes a fibroblastos (fibroblastóide), sendo estas muito mais abundantes. Estas diferenças na morfologia iam reduzindo com o decorrer das passagens, apresentando a partir da terceira passagem, apenas células com formato fusiforme (Fig. 4C).

Figura 4: Isolamento do saco vitelino e cultivo de células-tronco. A) Feto com idade aproximada de 28 dias de gestação apresentando o saco vitelino na região ventral (membrana cório-alantoideana extraída); a linha pontilhada mostra o local da secção. B) Fotomicrografia do cultivo primário; presença de células fibroblastóides (seta vermelha) e células globosas (seta branca). C) Fotomicrografia da terceira passagem evidenciando a presença somente de células fibroblastóides. SV= saco vitelino. A = 10x; B = 20x.

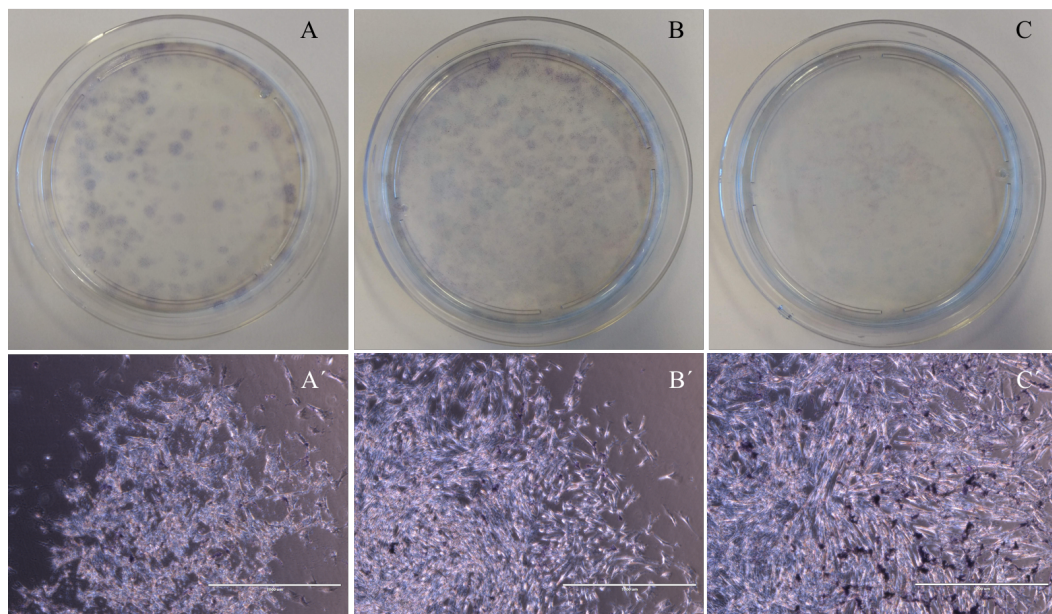


Fonte: Autoria própria.

6.1.2. Unidade formadora de colônia (UFC)

Três densidades diferentes (1×10^4 , 5×10^4 e 1×10^5) foram cultivadas por 15 dias para verificar a formação de colônias na placa (Fig. 5).

Figura 5: Fotomicrografias do Ensaio de unidade formadora de colônia das células saco vitelino de embriões caninos. A, B e C) Análises macroscópicas evidenciando formação de colônias em A e B, tendo em C confluência de 100%. A', B' e C') Análises microscópicas das colônias formadas (em A' e B') e da confluência alcançada em C. Densidades: A, A': 1×10^4 ; B, B': 5×10^4 ; C, C': 1×10^5 . Aumento: A', B', C' = 4x.



Fonte: Autoria própria

As células cultivadas nas densidades de 1×10^4 e 5×10^4 foram capazes de formar em média 144 e 238 colônias, respectivamente. Foi observada uma variedade na quantidade de células entre as colônias, onde as células cultivadas na densidade de 5×10^4 apresentaram alta densidade celular e, às vezes, sobreposição entre estas células, enquanto as cultivadas na densidade de 1×10^4 apresentaram baixa densidade celular. As placas contendo 1×10^5 células obtiveram confluência de 100%, não formando colônias. As células em todas as densidades testadas apresentaram morfologia fibroblástóide.

6.1.3. Viabilidade celular

Para verificar se as células permaneciam viáveis após o congelamento celular, foi realizado o teste de viabilidade, onde as células foram descongeladas após uma semana em nitrogênio líquido (Tabela 2).

Tabela 2: viabilidade das MSCs do saco vitelino canino pós descongelamento.

<i>Placa</i>	<i>n° de células cultivadas</i>	<i>n° de células recuperadas</i>	<i>% vivas</i>	<i>% mortas</i>
1	1x10 ⁵	75x10 ⁴	73,33%	26,67%
2	1x10 ⁵	65x10 ⁴	76,92%	23,08%
3	1x10 ⁵	70x10 ⁴	71,42%	28,58%
Média		70x10 ⁴	73,89%	26,11%

Fonte: Aatoria própria.

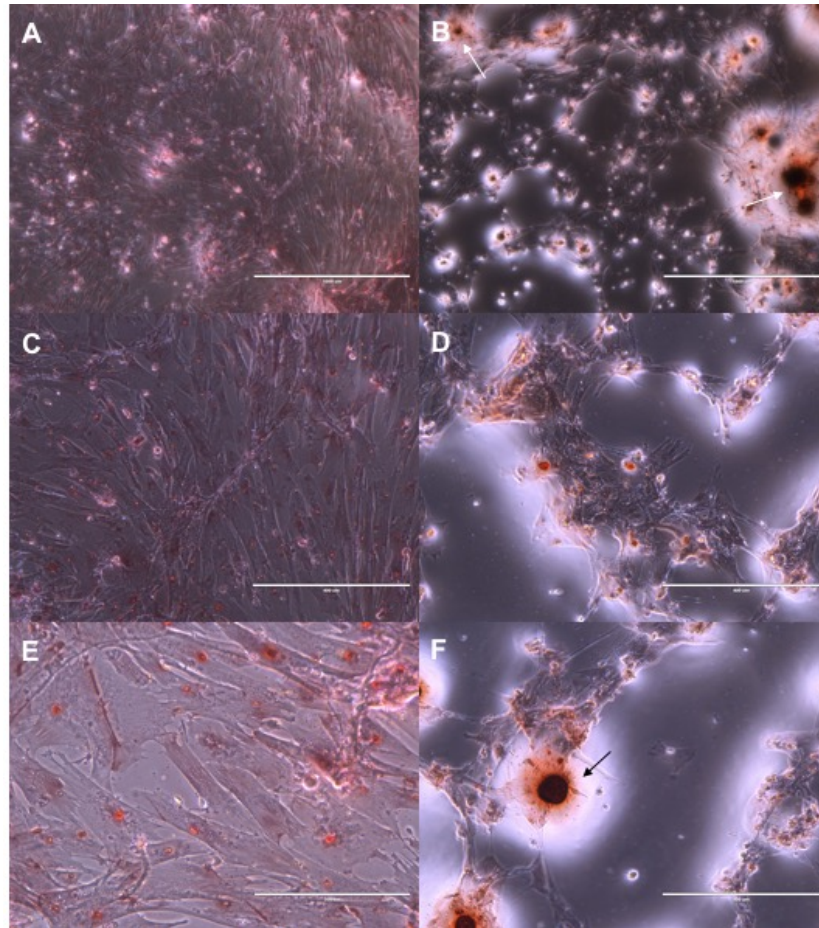
A porcentagem de células não coradas (viáveis) foi superior a 70%, enquanto que as não coradas, abaixo de 30%. Os testes de unidade formadora de colônia e diferenciação celular foram realizados a partir do descongelamento celular, ou seja, depois de descongeladas estas células foram capazes de atingir 100% de confluência e de se diferenciarem.

6.1.4. Diferenciação celular

6.1.4.1. Diferenciação osteogênica

Após atingirem 70% de confluência, as células foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico durante 21 dias e coradas para testar a capacidade de formar osteoblastos (Fig. 6).

Figura 6: Fotomicrografias das MSCs pós protocolo de diferenciação osteogênica coradas com Alizarin red. A, C e E) Grupo controle: MSCs cultivadas em meio alfamem sem diferenciador apresentando morfologia fibroblastóide. B, D e F) MSCs cultivadas com o meio de diferenciação osteogênica apresentando morfologia diferenciada em relação ao grupo controle e presença de depósitos de cálcio (setas), indicando a diferenciação. Aumento: A=4x; B=4x; C=10x; D=10x; E=20x; F=10x.



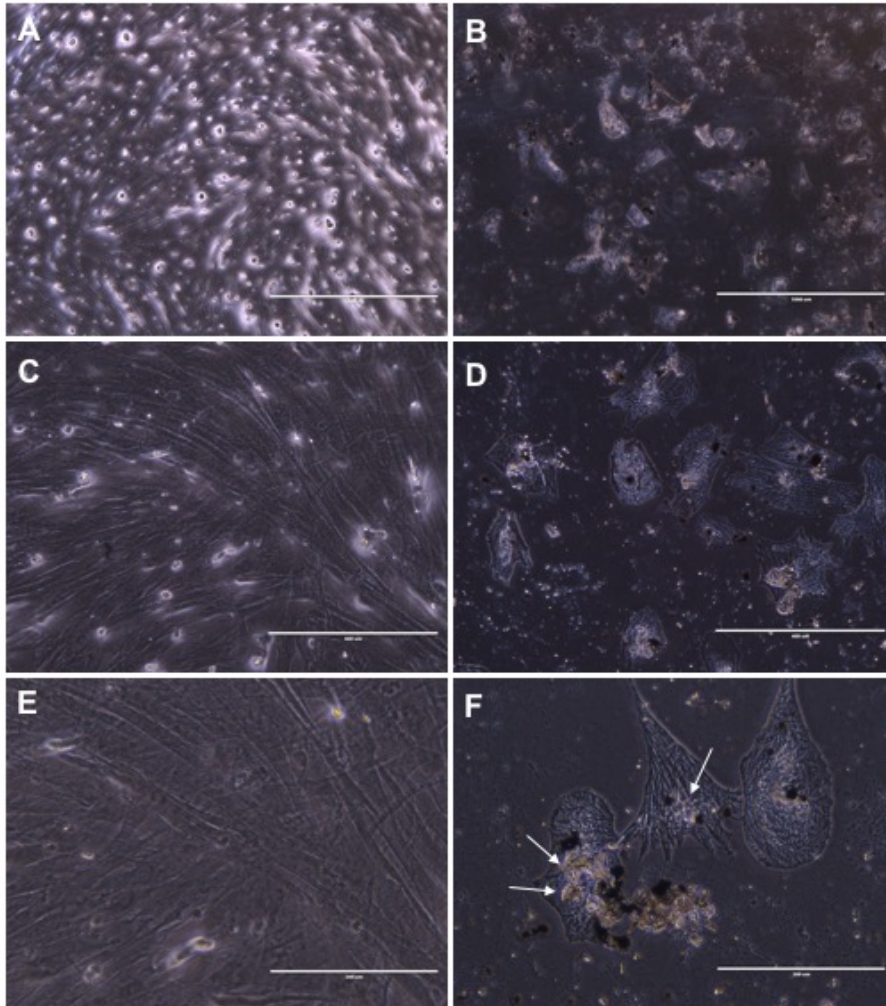
Fonte: Autorialia própria

Após o cultivo em meio de diferenciação, as células se apresentaram em ilhotas, não permanecendo fibroblastóides, aparentando um formato achatado e com presença de depósitos de cálcio corados pelo Alizarin red.

6.1.4.2 Diferenciação adipogênica

Após atingirem 100% de confluência em meio alfamem, as células foram cultivadas com meio de diferenciação adipogênico para testar a capacidade de formação de gotículas de lipídio. Após os 21 dias de cultivo, as células do grupo experimental apresentavam morfologia diferenciada e com presença de gotículas de lipídio no citoplasma (fig 7). Diferente do grupo controle, que permaneceu fibroblastóide e sem depósitos de lipídios.

Figura 7: Fotomicrografias das MSCs pós protocolo de diferenciação adipogênica coradas com Sudan black. A, C e E) Grupo controle: MSCs apresentando morfologia fibroblastóide após serem cultivadas em meio alfaMEM sem diferenciador. B, D e F) MSCs cultivadas com o meio de diferenciação adipogênica apresentando morfologia diferenciada em relação ao grupo controle e presença de gotículas de lipídios (setas), indicando a diferenciação. Aumento: A=4x; B=4x; C=10x; D=10x; E=20x; F=20x.

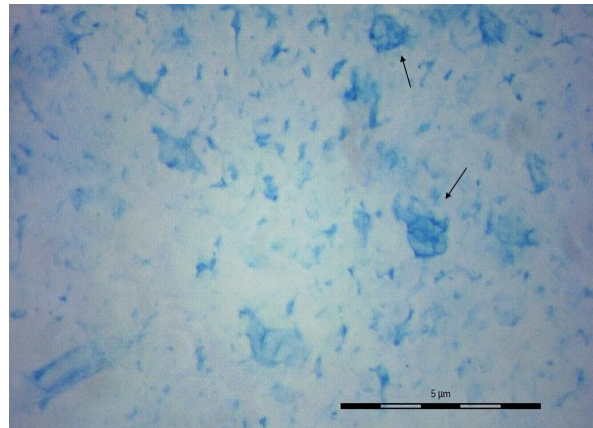


Fonte: Autoria própria

6.1.4.3. Diferenciação condrogênica

Após a realização de histologia e coloração dos pellets de MSCs foi possível a visualização de depósitos de proteoglicanos em microscopia de luz, glicosaminoglicanos que conferem rigidez à matriz, tendo assim uma indicação de diferenciação em condrócitos (fig 8).

Figura 8: Fotomicrografia histológica em parafina do pellet de células-tronco mesenquimais após o cultivo em meio de diferenciação condrogênico, corado com Alcian blue. Marcação de proteoglicanos (setas). Aumento=4x.

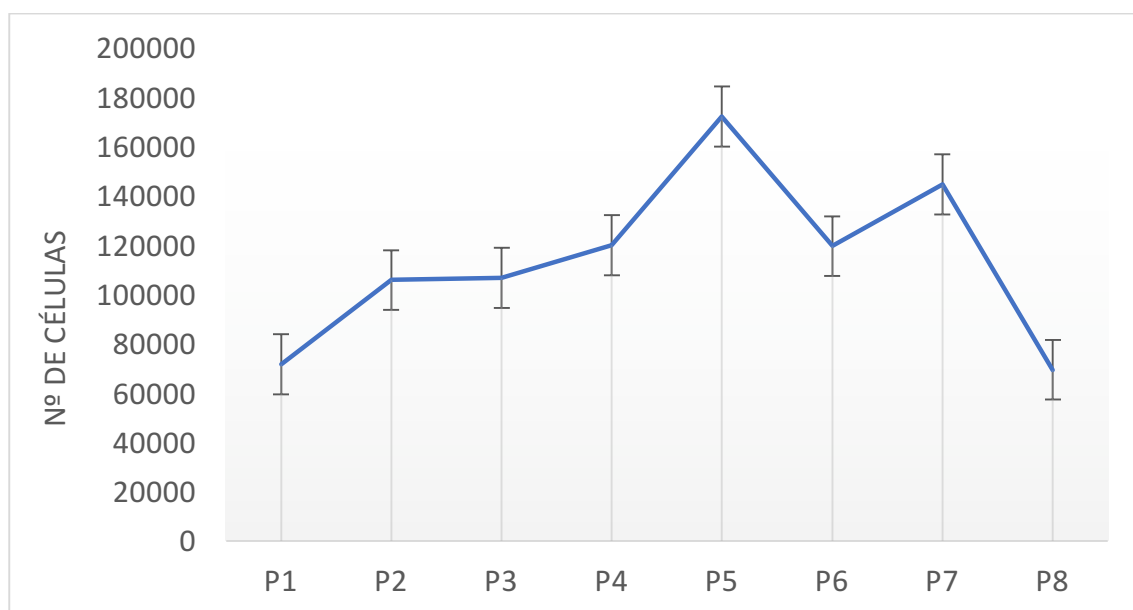


Fonte: Autoria própria

Não foi possível a realização de um grupo controle, devido à não agregação de um pellet no fundo do tubo com o cultivo em meio alfaMEM.

6.1.5. Curva de crescimento

Gráfico 1: Curva padrão de crescimento das células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino cultivadas em alfaMEM 15% SFB.



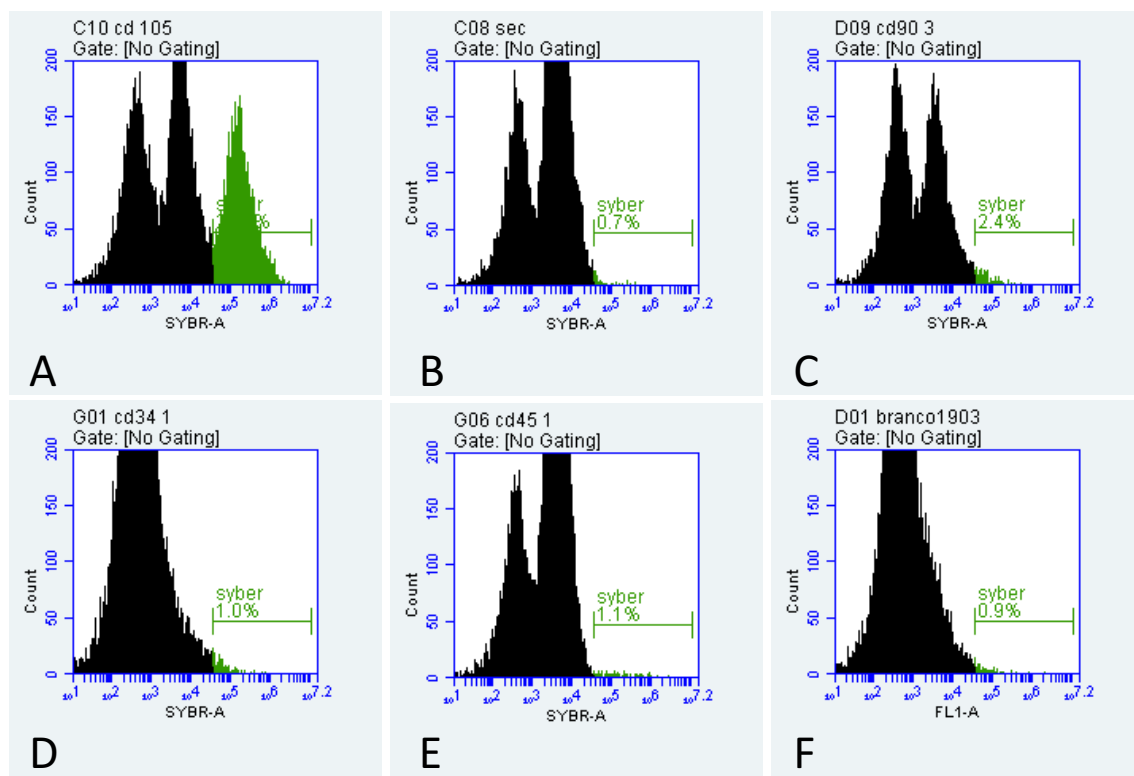
Fonte: Autoria própria.

A curva padrão de crescimento (gráfico 1) demonstrou que as MSCs de saco vitelino canino possuem a capacidade de se manter em expansão até a oitava passagem celular, tendo um crescimento gradual até a quinta passagem, sendo esta o seu pico máximo de proliferação.

6.1.6. Citometria de fluxo

As MSCs derivadas de 5^o passagem do isolamento do SV de cães por volta de 35 dias de gestação foram submetidas à técnica de citometria de fluxo para avaliar a presença dos marcadores de membrana CD105 e CD90 e ausência dos marcadores CD45 e CD34 (fig. 9).

Figura 9: Expressão de glicoproteínas de superfície das células-tronco mesenquimais do saco vitelino canino. A) CD105; B) anticorpo secundário do CD105; C) CD90; D) CD34; E) CD45; F) branco.



Fonte: Autoria própria.

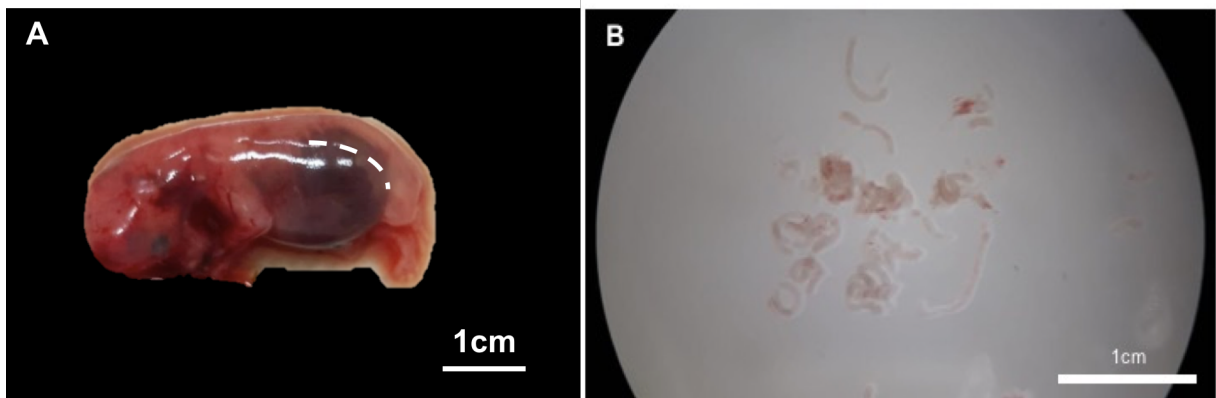
Dentro os marcadores enumerados acima, as células foram positivas somente para CD105, na porcentagem de 26,74%. Porém o outro anticorpo sugestivo para linhagem mesenquimal, CD90, foi negativo. Assim como o CD34 e CD45, de linhagem eritropoética, com valores de expressão em torno de 1%.

6.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL

6.2.1. Isolamento das criptas intestinais caninas

Intestinos de fetos caninos com aproximadamente 30 dias foram isolados (fig. 10).

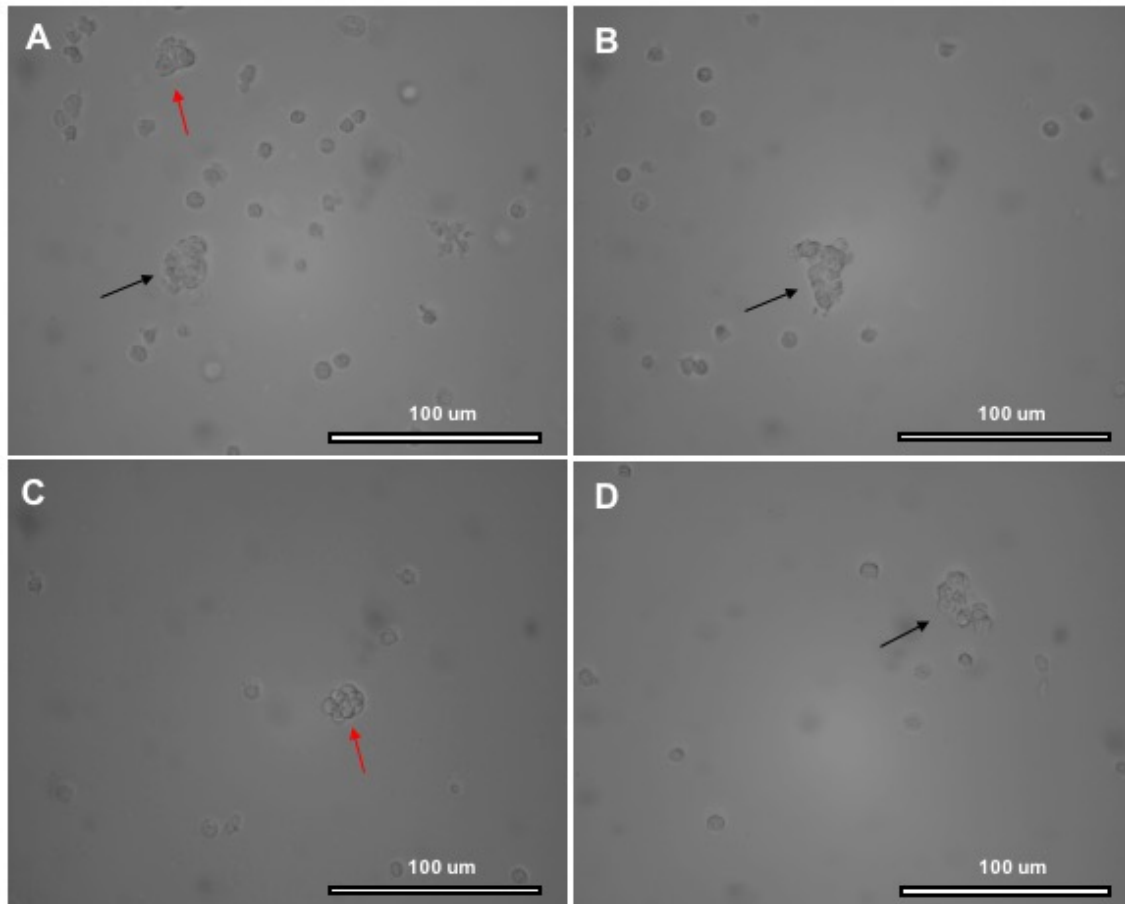
Figura 10: Isolamento do intestino canino. A) Feto com aproximadamente 30 dias de gestação. Linha pontilhada mostra o local de secção para retirada do intestino; B) Intestinos extraídos do feto canino em uma placa de 35mm após lavagem em PBS visualizados em estereomicroscópio.



Fonte: Autoria própria.

Os filtrados derivados da digestão tecidual foram analisados para verificar a integridade das criptas (fig. 11). Dentre os quatro filtrados, o escolhido foi o 1, pois apesar de possuir grande quantidade de debri, era o que possuía também uma maior quantidade de criptas intestinais íntegras, sendo este último fator mais relevante para o cultivo de organóides.

Figura 11: Fotomicrografia de células intestinais resultante dos filtrados do isolamento do intestino de fetos caninos. A) filtrado 1 (escolhido para o grupo controle) com presença de fragmentos e criptas intestinais íntegras, debris e outros tipos celulares não identificados. B) filtrado 2 com menores quantidades de debris e criptas intestinais. C) filtrado 3 com criptas em pequenas quantidades e fragmentadas. D) Análise do sobrenadante de uma suspensão celular após as filtragens; presença de poucas células e criptas intestinais, apesar destas apresentarem-se íntegras. Setas vermelhas: criptas intestinais fragmentadas. Setas pretas: criptas intestinais íntegras. Aumento: A, B e C= 10x; D= 20x.



Fonte: Autoria própria.

6.2.2. Diferenciação celular

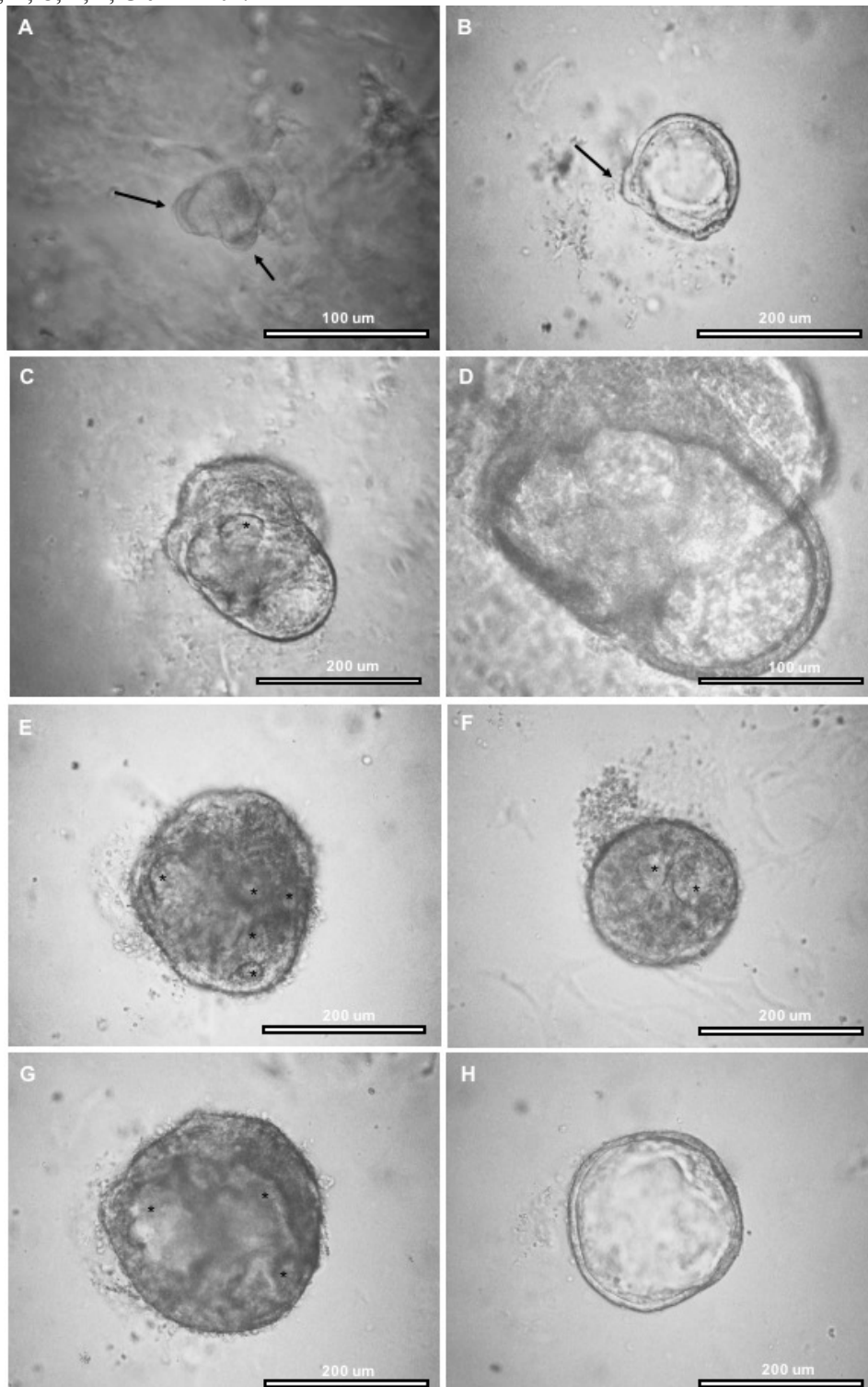
6.2.2.1. Protocolo I – Cultivo sequenciado de diferenciação

6.2.2.1.1. Grupo controle I – criptas intestinais em cultivo sequenciado

Após a centrifugação do filtrado 1, o pellet foi inserido em gotas de Matrigel e cultivados com FGF4 e Wnt3A, fatores de indução do início do desenvolvimento intestinal. Após os quatro dias de cultivo foi possível a visualização de pequenas estruturas apresentando pequenas projeções (fig 12A), porém sem características de organóides intestinais. Após a indução

intestinal, o meio foi trocado para promover a diferenciação celular em células presentes no epitélio intestinal. Após quatro dias de cultivo, as estruturas presentes se apresentavam arredondadas, com uma membrana externa bem destacada (fig. 12B), onde algumas ainda chegavam a apresentar projeções císticas, característico de organóides intestinais em início de desenvolvimento. Após 10 dias de cultivo neste meio as estruturas permaneceram com membrana na periferia, porém o lúmen apresentava-se mais denso (indicando uma proliferação celular), com possível visualização de vacúolos internos (fig. 12C) e maiores projeções de membrana (fig. 12D). No 12º dia de cultivo, havia uma maior quantidade de vacúolos presentes no lúmen das estruturas (fig. 12E e 12F). Após o término dos 14 dias de cultivo os vacúolos aumentaram de tamanho (fig. 12G), porém algumas estruturas deram início ao desenvolvimento (arredondadas com membrana externa destacada) (fig. 12H).

Figura 12: Organóides desenvolvidos a partir do cultivo de criptas intestinais caninas (grupo controle I) em distintas etapas de diferenciação. A) pequena estrutura aparente após o quarto dia de cultivo de indução intestinal, apresentando pequenas projeções na periferia (setas). B) Organóide com quatro dias de cultivo em meio de crescimento de organóides possuindo uma membrana visível e uma pequena projeção cística (seta). (C e D) mesmo organóide, porém com oito dias de cultivo em meio de crescimento visualizado em diferentes lentes objetivas (C-10x/D-20x), sendo possível a visualização de vacúolo e maiores projeções na membrana. (E e F) Organóides com 12 dias de cultivo, apresentando maiores quantidades de vacúolos. (G e H) Organóides com 14 dias de cultivo, porém apresentando diferentes características de etapa de desenvolvimento; G) Presença de vacúolos em maiores tamanhos; H) Presença de membrana externa destacada. Asteriscos: vacúolos. Aumento: A, D = 20x; B, C, E, F, G e H = 10x.



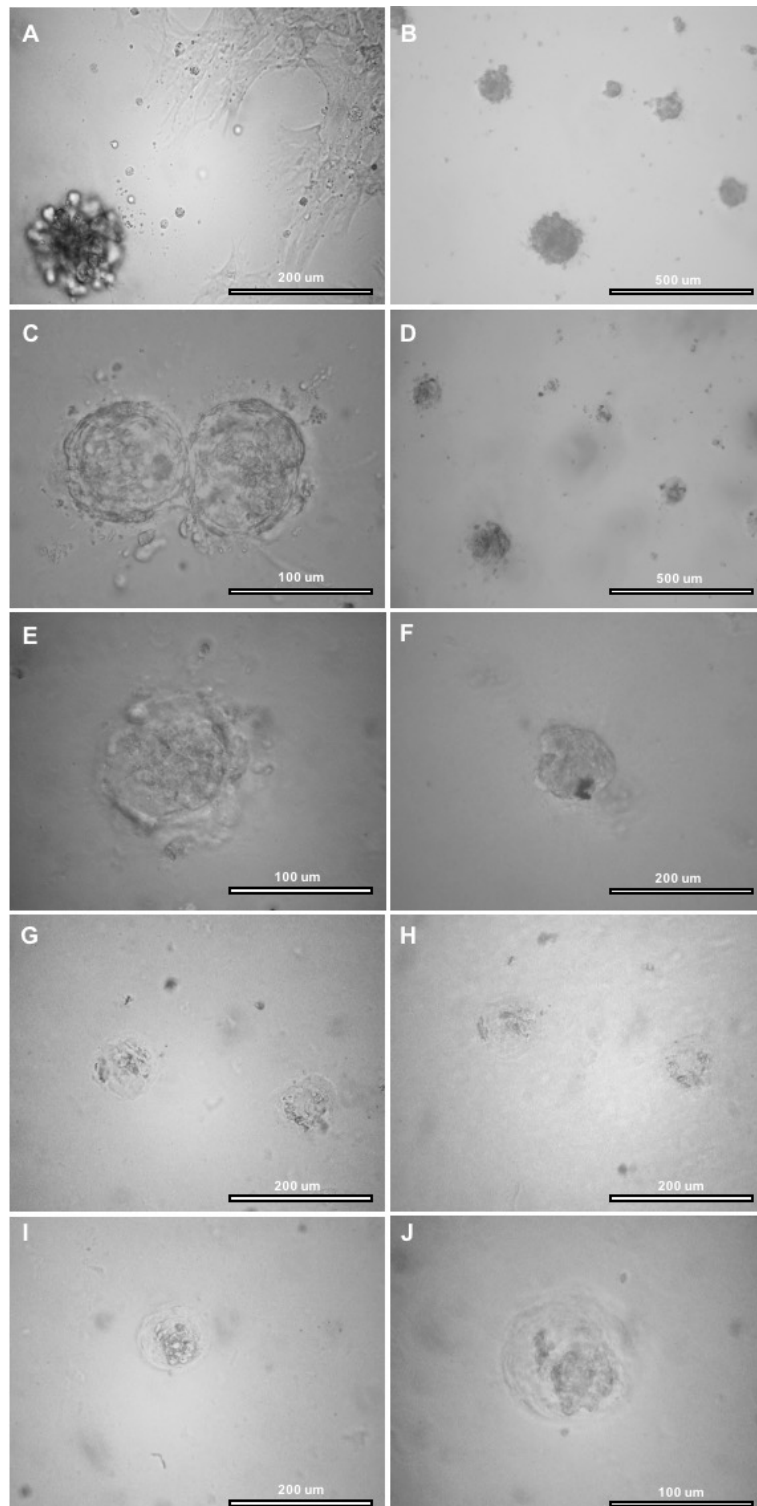
Fonte: Autoria própria.

Apesar do cultivo das criptas intestinais em diferentes etapas de diferenciação ter sido capaz de desenvolver organóides, estes se apresentaram em poucas quantidades tendo em média três estruturas por gota (onde deveriam apresentar por volta de 30). Além disso, as projeções desenvolvidas possuíam formato irregular ou arredondado, onde deveriam apresentar formato semelhante a uma flor, com um lúmen rodeado de criptas intestinais.

6.2.2.1.2. MSCs sobre a cama de Matrigel

Para a diferenciação das MSCs, o pellet foi distribuído uniformemente sobre camas de Matrigel e cultivadas em meio alfamem para a proliferação celular. Após os três dias de cultivo algumas células se agregaram formando colônias, enquanto outras aderiam ao gel apresentando morfologia fibroblastóide (fig. 13A). Poucos poços apresentaram células aderidas ao gel, estando a grande maioria agregadas em colônias (fig. 13B), ou seja, não houve uma confluência destas células sobre o gel. Posterior ao cultivo em alfamem, iniciou-se a diferenciação endodermal nas colônias. Após os três dias de diferenciação, as colônias alteram seu formato chegando a apresentar membrana em sua periferia (fig. 13C), porém, apesar desta característica, as células também apresentaram membranas irregulares rodeadas de pequenas estruturas, aparentando corpos apoptóticos (fig. 13D). Devido à presença de membrana e à incerteza de apoptose deu-se sequência à etapa de diferenciação intestinal e indução de crescimento de organóides, porém no decorrer do cultivo as colônias não apresentaram um aumento no diâmetro, nem características que levassem ao desenvolvimento de organóides (fig. 13E-J).

Figura 13: Células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino cultivadas sobre a cama de Matrigel em diferentes etapas de diferenciação. (A e B) células cultivadas em alfamem para expansão celular; A) presença de colônias e algumas células fibroblastóides; B) presença de várias colônias sobre a cama de gel. (C e D) etapa de diferenciação endodermal; C) após o primeiro dia de diferenciação, colônias apresentando morfologia diferenciada em relação ao cultivo com alfamem; D) após o último dia de diferenciação, colônias apresentando um aspecto de degradação celular. (E e F) Diferenciação intestinal, colônias apresentando membrana, porém com morfologia irregular. (G-J) Indução do crescimento de organóides; G) 4 dias, H) 8 dias, I) 12 dias, J) 14 dias; colônias sem crescimento ou alteração na morfologia. Aumento: A, F, G, H e I = 10x; B = 4x; C, E e J = 20x.

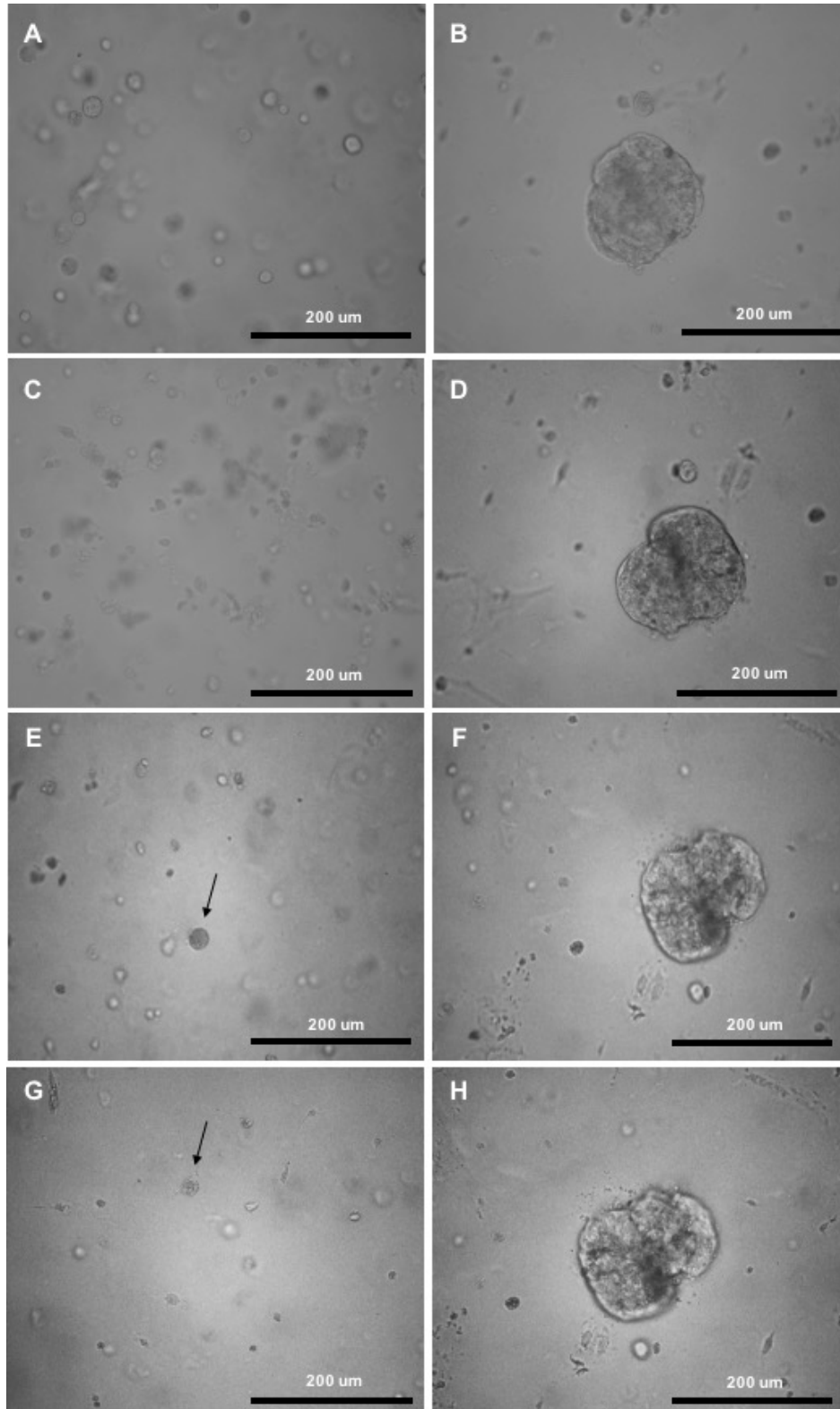


Fonte: Autoria própria.

6.2.2.1.3. MSCs na gota de Matrigel

As mesmas MSCs utilizadas para o cultivo sobre o Matrigel também foram utilizadas para o cultivo na gota. As gotas foram submersas diretamente em meio de diferenciação endodermal (fig. 14A). Após o término desta diferenciação, as células não apresentaram alteração na morfologia, porém com formação de um único agregado celular (fig. 14B). Posteriormente ao cultivo de diferenciação intestinal e indução do crescimento de organóides, as células, em sua maioria, permaneceram com a morfologia inalterada (fig. 14C-H), porém algumas células isoladas apresentaram um pequeno aumento no diâmetro nos primeiros dias de indução do crescimento (fig. 14E), mas degeneraram após o término no cultivo (fig. 14G). O agregado celular alterou um pouco a sua morfologia após a diferenciação intestinal (fig. 14D), mas permaneceu inalterado durante toda a indução do crescimento de organóides, sem formação de membranas em sua periferia e vacúolos no lúmen (fig. 14E e 14F).

Figura 14: Células-tronco mesenquimais derivadas do saco vitelino canino cultivadas na gota de Matrigel em diferentes etapas de diferenciação. A) células após a imersão na gota antes do início da diferenciação; B) agregado celular formado após o terceiro dia de diferenciação endodermal; (C e D) diferenciação intestinal, C) segundo dia de cultivo, D) após o último dia de diferenciação; (E-H) Cultivo em meio de indução do crescimento de organóides. (E e F) dia 4, (G e H) dia 14. Aumento: A, B, C, D, E, F, G e H = 10x.



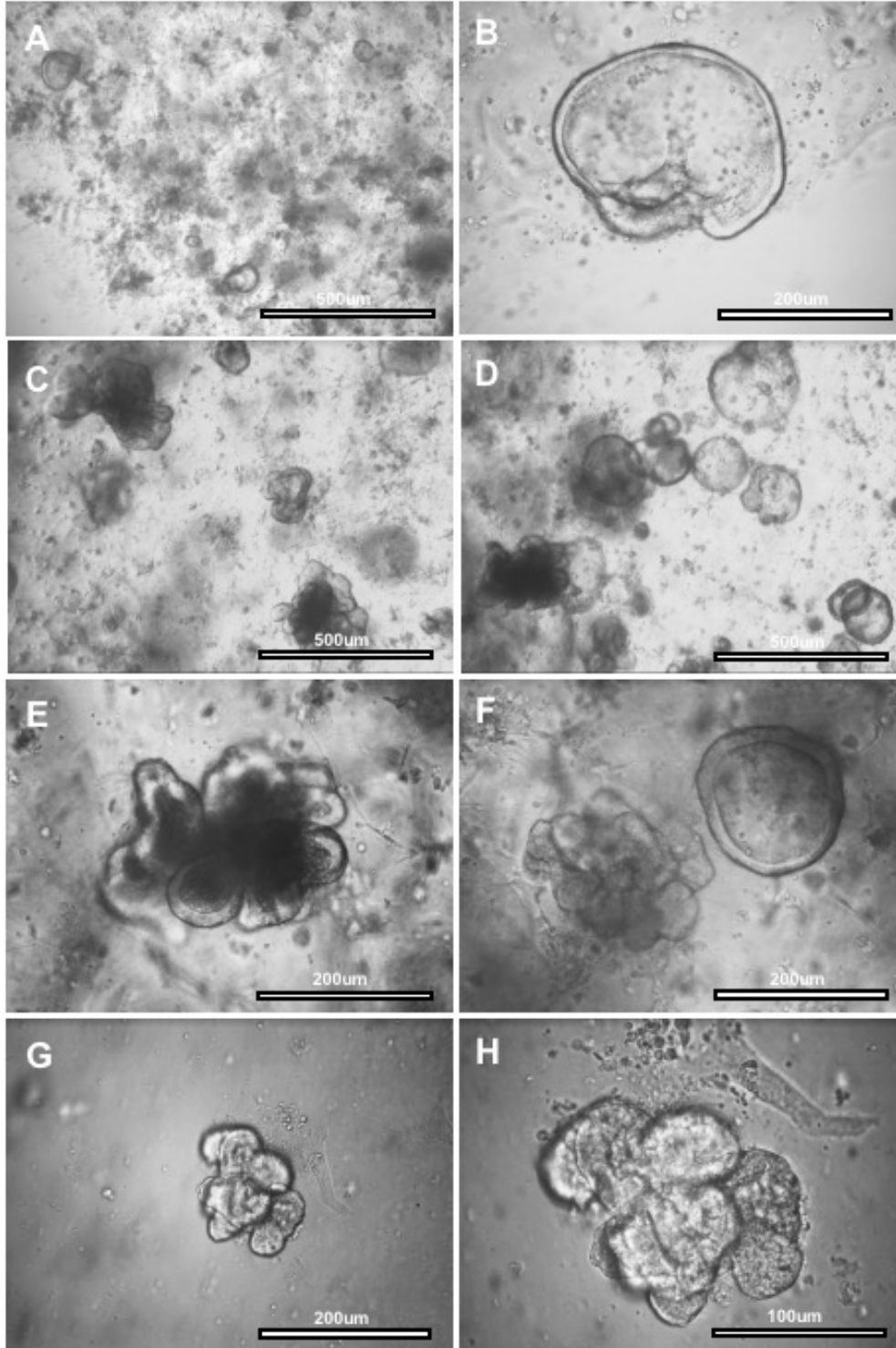
Fonte: Autoria própria.

6.2.3. Protocolo II – cultivo único de diferenciação

6.2.3.1 Grupo controle II – criptas intestinais em cultivo único

As criptas intestinais derivadas do filtrado 2 foram cultivadas em gotas de Matrigel submersas em meio contendo EGF, noggin, Rspodin1 e Wnt3A por 15 dias, sofrendo passagem após o sétimo dia. Após o segundo dia de cultivo já foi possível observar o desenvolvimento de pequenas estruturas esféricas, onde estas apresentavam-se mais robustas no quarto dia, contendo uma membrana evidenciada em sua periferia (fig. 15A e 15B). No sétimo dia, além das estruturas esféricas, foi possível visualizar estruturas distintas com morfologia semelhante a uma flor, contendo um centro rodeado de projeções que se assemelhavam a criptas intestinais (fig. 15E). Membranas também estavam evidenciadas na periferia de cada projeção. Do décimo dia de cultivo até o último, apesar de reduzidas em número, as estruturas que continham projeções mantiveram sua morfologia, enquanto que as esféricas passaram a apresentar características de morte celular, rodeadas de corpos apoptóticos e aspecto degenerado.

Figura 15: Organóides desenvolvidos a partir do cultivo de criptas intestinais caninas (grupo controle II) a partir de cultivo único de diferenciação. (A e B) estruturas formadas após 4 dias de cultivo; (C – F) após 7 dias de cultivo, presença de dois tipos distintos de organóides, onde alguns apresentavam projeções semelhantes a criptas intestinais (evidenciado em E), enquanto outros apresentavam-se em formato esférico com membrana evidenciada na periferia (evidenciado em F); (G e H) após 10 dias de cultivo, visualização somente de estruturas com projeções. Aumento: A, C e D = 4x; B, E, F e G = 10x; H = 20x.

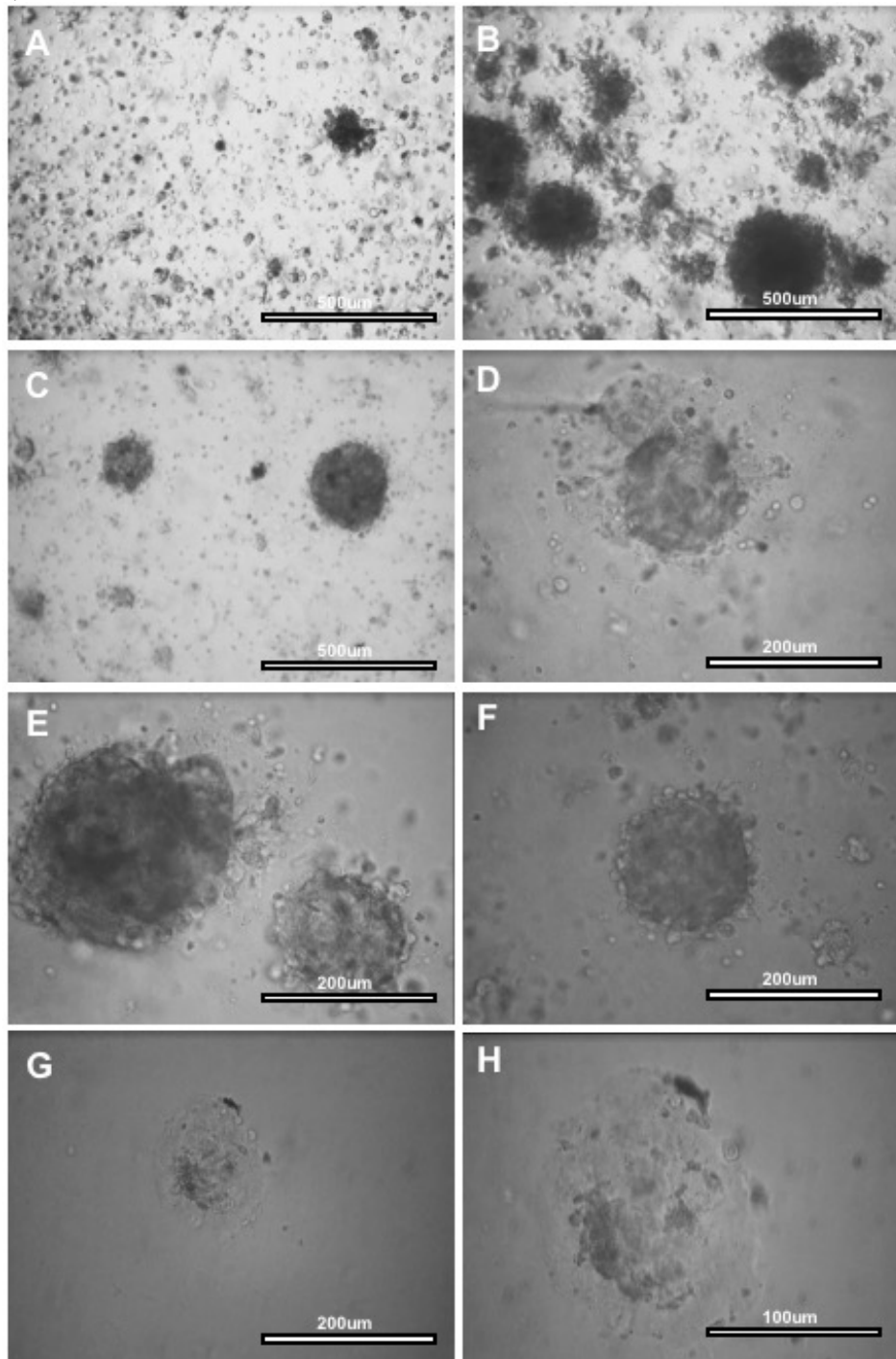


Fonte: Autoria própria.

6.2.3.2. MSC na gota de Matrigel em cultivo único

Após o isolamento bidimensional, as células-tronco mesenquimais derivadas de terceira passagem foram imersas em gotas de Matrigel e cultivadas por 14 dias em meio de diferenciação intestinal. Após o segundo dia de cultivo, já foi possível visualizar o início do desenvolvimento de estruturas tridimensionais, porém em baixa densidade (fig. 16A). Somente após o quarto dia estas estruturas aumentaram em número e em tamanho (fig. 16B), porém, apesar de maiores, não apresentavam delimitações em sua periferia, rodeadas de células em expansão. No 9º dia de cultivo, apesar de ainda apresentarem células em seu torno, as periferias dessas estruturas tridimensionais exibiram uma maior delimitação, porém sem evidenciar uma membrana externa (fig. 16F). No decorrer do cultivo, até o 14º dia, estas estruturas manifestaram sinais de degeneração celular.

Figura 16: Cultivo de MSCs derivadas do saco vitelino canino em gota de Matrigel com cultivo único de diferenciação. A) dia 2: início do desenvolvimento de estruturas tridimensionais; B) grande aumento em número e tamanho no dia 4; (C – F) após o dia 9 as estruturas apresentavam-se mais esféricas, porém sem membrana evidenciada na periferia; (G e H) sinais de degeneração no dia 14 de cultivo. Aumento: A, B e C = 4x; D, E, F, e G = 10x; H = 20x.

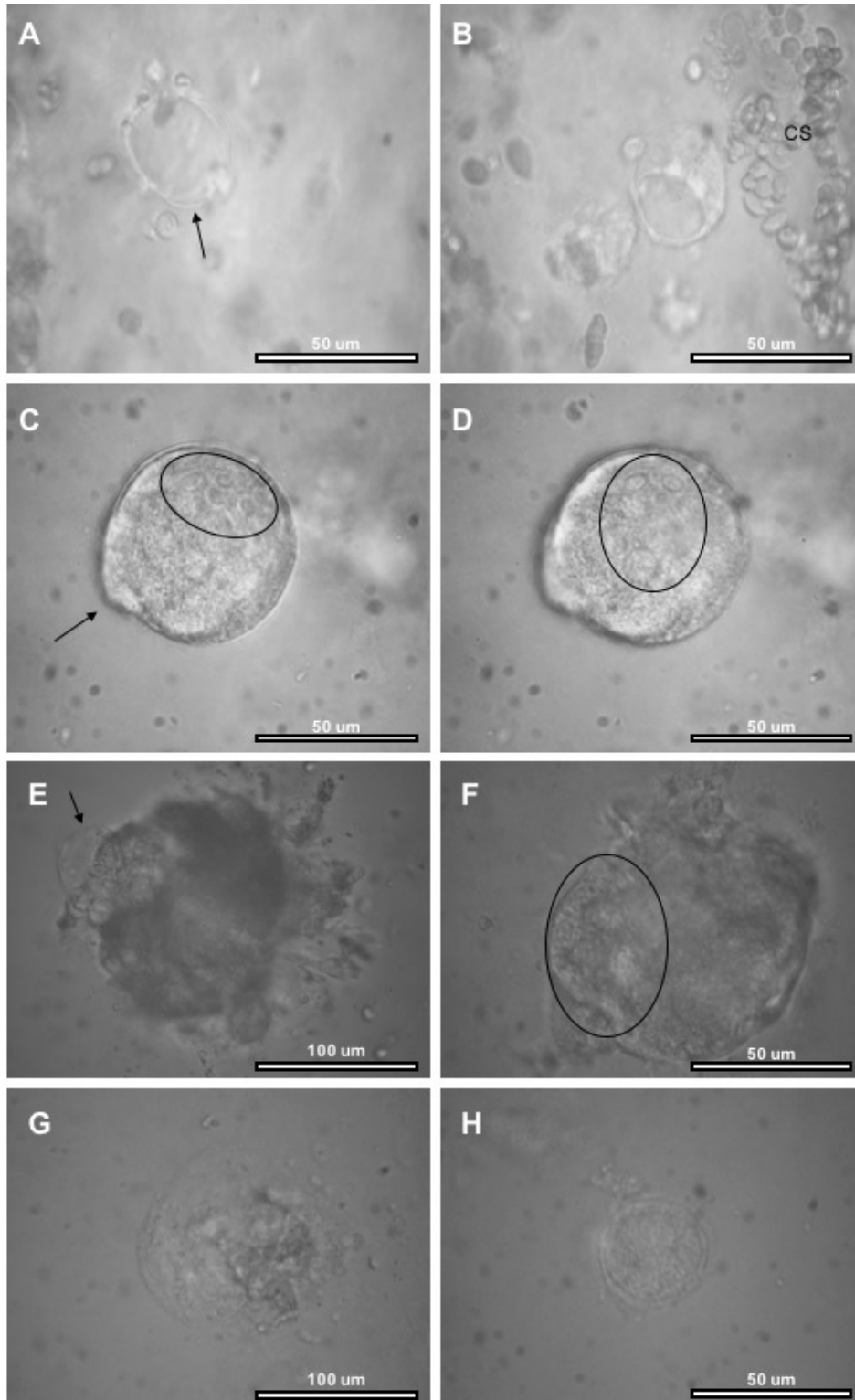


Fonte: Autoria própria.

6.2.3.3. Tecido do saco vitelino em gota de Matrigel

Saco vitelino de embriões de 23 dias de gestação foram isolados. Após a digestão e centrifugação o pellet foi mensurado e cultivado inteiro em gotas de Matrigel. Diversos tipos celulares foram visualizados em microscópio, incluindo muitas células sanguíneas. As gotas foram submersas com meio de diferenciação intestinal e cultivadas durante 14 dias. No quarto dia já foi possível a visualização de estruturas contendo membrana e vacúolo, porém de tamanho reduzido. No sexto dia estas estruturas apresentavam-se em maior tamanho, com uma maior quantidade de vacúolos e pequenas projeções císticas, assim como visualizado no grupo controle I. Com o decorrer do tempo algumas estruturas aumentaram de tamanho, outras começaram a se desenvolver e outras entraram em processo apoptótico, tendo no dia 14 (o último dia de cultivo) uma grande quantidade de células mortas e alguns poucos organóides de pequeno tamanho em início de desenvolvimento. Apesar do aumento de tamanho de alguns organóides no decorrer do cultivo, nenhum chegou a desenvolver projeções e vacúolos mais evidentes como observado no grupo controle. A quantidade de organóides formados nas gotas contendo tecido de saco vitelino foi reduzida (contendo aproximadamente cinco estruturas por gota), como também observada no cultivo de células intestinais.

Figura 17: Cultivo do tecido do saco vitelino canino com cultivo único de diferenciação. (A e B) Dia 4 do cultivo, A) agregado celular com membrana em sua periferia (seta), B) presença de um vacúolo no lúmen; (C e D) Dia 6 de diferenciação, estruturas apresentando vários pequenos vacúolos no lúmen (círculo) C) projeção cística na membrana (seta); E) Dia 8, projeções apresentando membranas (seta), porém estruturas com membranas degradadas; F) Dia 11, vacúolos em maior diâmetro (círculo); (G e H) Último dia de cultivo, G) estruturas com aspecto degradado arredoadas de pequenos corpos apoptóticos, H) Início da formação de pequenas estruturas com membranas. Aumento: A, B, C, D, F e H = 40x; E e G = 20x.

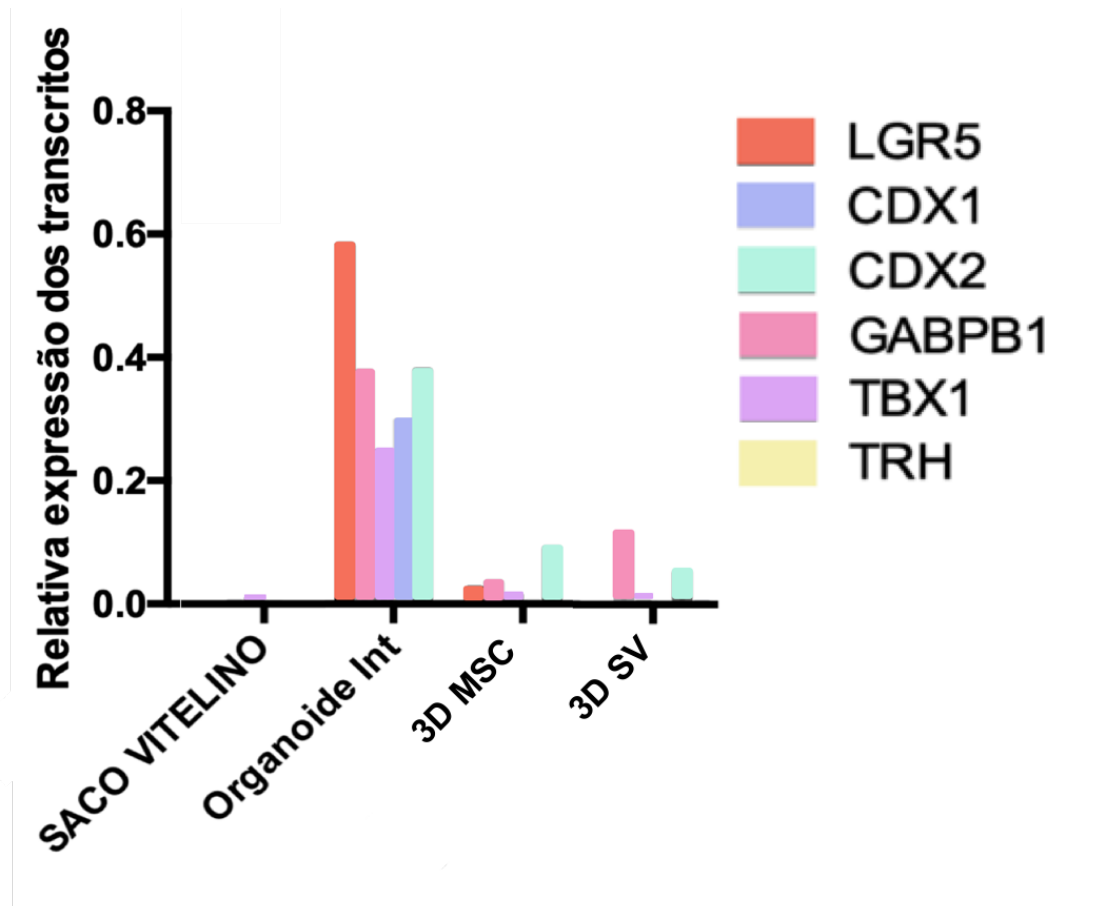


Fonte: Autoria própria.

6.3. RT-qPCR

Para avaliar a eficiência da diferenciação celular, as estruturas derivadas do cultivo tridimensional das células-tronco intestinais, MSCs e do tecido derivado do saco vitelino digerido foram analisadas para presença de genes intestinais (LGR5, CDX2 e CDX1) e da endoderme definitiva (GABPB1, TBX1 e TRH). MSCs isoladas bidimensionalmente do saco vitelino foram utilizadas como controle negativo destas marcações. A expressão dos marcadores foi demonstrada no gráfico 2.

Gráfico 2: Níveis de expressão dos marcadores nos grupos amostrais. MSCs do saco vitelino (SACO VITELINO) utilizadas como controle negativo; organóides originados do cultivo 3D de células-tronco intestinais (Organoide Int) como controle positivo; estruturas desenvolvidas a partir do cultivo 3D das células-tronco mesenquimais do saco vitelino (3D MSCs); estruturas desenvolvidas a partir do cultivo 3D do saco vitelino dirigido sem isolamento celular (3D SV).



7. DISCUSSÃO

7.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS MSCs

As células do SV canino foram cultivadas em atmosfera controlada, sofrendo passagens para o aumento do banco de células e o isolamento destas, sendo posteriormente caracterizadas. Durante as primeiras passagens foi possível visualizar duas morfologias celulares distintas: presença de células globosas e de células fibroblastóides, sendo ambas aderentes ao plástico, um dos fatores que caracteriza uma célula-tronco mesenquimal (DOMINICI et al., 2006). Estas células globosas também foram visualizadas em SV isolados em outros trabalhos (FAVARON et al., 2014; WENCESLAU et al., 2011; GAO et al., 2014), porém, assim como neste cultivo, em todos os trabalhos estas células globosas não sobreviveram a passagens contínuas, permanecendo somente células fibroblastóides após a terceira passagem. Mançanares et al (2015) verificou que as células presentes na área transicional entre o SV e o intestino primitivo bovino também apresentavam formato irregular, sendo planas ou globosas, sugerindo assim a possível presença destas células de transição no cultivo realizado. Além da capacidade de aderência ao plástico com formato fibroblastóide, quando cultivadas em baixa densidade as células apresentaram a capacidade de formar colônias, mesma característica definida por Friedenstein et al. (1976). Wenceslau et al. (2011) e Mançanares et al. (2015) também relataram formação de colônias em baixa densidade celular. As células cultivadas em alta densidade atingiram confluência, recobrando toda a superfície da placa, não formando colônias.

Muitos laboratórios necessitam preservar um grande número de células para obter uma quantidade precisa em futuras aplicações clínicas. Para isso, são realizados protocolos de criopreservação para o estoque destas células. Para verificar se as células permaneciam efetivas após o descongelamento foi realizado o teste de viabilidade celular, onde uma taxa de sobrevivência acima de 70% foi apresentada. Mançanares et al. (2015) relatou 100% de sobrevivência de MSCs do SV bovino, porém resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados em células mesenquimais isoladas do tecido adiposo canino (KIM et al., 2016). Os testes de unidade formadora de colônia e diferenciação foram realizados a partir de células estocadas congeladas, ou seja, além de uma boa taxa de sobrevivência, as MSCs do saco vitelino canino também apresentaram a capacidade de atingir a confluência e se diferenciarem após o descongelamento.

Outra característica das células mesenquimais definida por Dominici et al. (2006) foi a capacidade de se diferenciarem em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas. Na

tentativa de provar que as células em cultivo são realmente células mesenquimais, foram realizados os testes de diferenciação, onde foi possível verificar a presença de depósitos de cálcio na diferenciação osteogênica, além de acúmulo de lipídios e proteoglicanos nas diferenciações adipogênica e condrogênica, respectivamente. Além dos depósitos, as células também adquiriram morfologia diferenciada em relação ao grupo controle (que se mantiveram fibroblastóides), apresentando-se poligonais, com citoplasma repleto de vacúolos e citoesqueleto evidenciado. Acredita-se que este processo é regulado por várias etapas, onde espécies reativas de oxigênio interagem com outras moléculas afetando cascatas de sinalização necessárias para a diferenciação das MSCs (ATASHI et al., 2015). Resultados semelhantes a este trabalho foram encontrados por Favaron et al., (2014) e Mançanares et al. (2015) demonstrando assim a capacidade de diferenciação das MSCs do saco vitelino canino.

Com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular, foi realizada a curva de crescimento, verificando um aumento exponencial de células-tronco mesenquimais até a quinta passagem. Devido à grande capacidade de expansão e por não conter células além das fibroblastóides, a passagem 5 foi escolhida para ser analisada imunofenotipicamente por citometria de fluxo. Foi realizada a caracterização destas MSCs a partir da presença de marcadores de superfície celular, verificando marcação positiva para CD105 e ausência dos marcadores CD34 e CD45, resultados semelhantes aos encontrados por Wang et al. (2008) e Mançanares et al. (2015), característico de células-tronco mesenquimais (DOMINICI et al., 2006). Apesar do CD90 ser caracterizado na literatura como positivo, a marcação nas células analisadas foi baixa. Essa diminuição do nível da expressão possivelmente pode ter variado de acordo a passagem celular, já que a partir da 5ª há uma diminuição da proliferação celular. Mançanares et al. (2015) verificou positividade para CD90 de MSCs derivadas de passagem 5 do SV bovino, porém em sua curva de crescimento há um aumento da proliferação após esta passagem. Por haver um decaimento da proliferação celular e uma redução imunofenotípica de CD90 a partir da 5ª passagem, células derivadas de terceira passagem foram escolhidas para serem cultivadas em Matrigel para formação de organóides.

7.2. CULTIVO TRIDIMENSIONAL

O cultivo 3D de organóides é um recurso valioso no estudo da função de órgãos, explorando a capacidade de células-tronco se renovarem produzindo um epitélio diferenciado (DERRICOTT et al., 2019). Os organóides intestinais representam modelos de estudo do desenvolvimento e da base molecular dos diferentes tipos celulares presentes no epitélio

intestinal, como células caliciformes, células de Paneth, enterócitos, células enteroendócrinas e células-tronco (NAKAMURA, 2018). Além disso, esses modelos podem ser usados para obter informações sobre doenças gastrointestinais e fornecer novas terapias (FAIR et al., 2018). A elaboração de protocolos alternativos de cultivo 3D de organóides intestinais é importante para fornecer diversas vias de desenvolvimento destes modelos. Para isso, tentamos produzir organóides intestinais pelo cultivo de diferentes técnicas de cultivo do saco vitelino.

Há um aumento do número de modelos *in vitro* com organização complexa imitando a estrutura e função dos órgãos *in vivo* a partir de células-tronco cultivadas sob tratamentos apropriados com fatores de crescimento (YU et al., 2019). As células-tronco pluripotentes são capazes de se diferenciar em endoderma definitivo por efeito da ativina A, sendo posteriormente induzidas a se diferenciarem em intestino posterior por FGF4 e Wnt3a, desenvolvendo tridimensionalidade com EGF, noggin e R-spondin1 (MIURA; SUZUKI, 2018). Baseando-se no protocolo de formação de organóides a partir de células-tronco pluripotentes de McCracken et al. (2011), as células foram inicialmente cultivadas em camas de Matrigel para proliferação e indução da diferenciação endodermal. Após três dias de cultivo, não foi possível verificar confluência destas células na superfície do gel. Como proposto no mesmo protocolo, as células após a diferenciação endodermal foram passadas para uma gota de Matrigel e cultivadas para diferenciação intestinal. Porém, devido à pouca confluência na superfície do gel, houve muita perda celular, conseqüentemente, após passadas para as gotas, não houve crescimento de estruturas tridimensionais. Devido a isso, foi realizado o cultivo direto do isolamento para a gota de Matrigel na diferenciação endodermal. Mesmo em alta confluência, as células não foram capazes de desenvolver estruturas maciças, mantendo sua morfologia inalterada durante todo o cultivo. Diferente do grupo controle que, quando cultivado em mesmas condições, foi capaz de desenvolver estruturas esféricas.

Vários autores relataram o desenvolvimento de organóides intestinais a partir de células-tronco intestinais, onde estes apresentavam um lúmen rodeado por criptas intestinais (SATO et al., 2009; GRABINGER et al., 2014; van der HEE et al, 2018). Estes organóides com esta morfologia são denominados em fase de brotamento, nos quais produzem sua própria população celular por autorrenovação, originando várias linhagens de células epiteliais intestinais (SATO et al., 2009). Apesar de cultivar células-tronco intestinais em Matrigel sob indução de fatores de crescimento, as estruturas formadas não foram semelhantes às encontradas pelos autores citados anteriormente, onde apresentavam-se esféricas. Organóides derivados do cultivo de células-tronco de cólon foram anteriormente relatados, onde estes também formavam estruturas esféricas, contendo marcadores de células epiteliais específicas desta região (SATO et al., 2011;

YUI et al., 2012). Como o isolamento intestinal neste trabalho foi realizado em fetos de aproximadamente 35 dias de gestação, não foi possível distinguir visualmente os intestinos delgado e grosso, sugerindo assim um possível cultivo de células-tronco de cólon. Porém, Fordham et al. (2013) verificou que organóides intestinais esféricos podem desenvolver brotamentos como resultado de estimulações seriadas de Wnt, pois esta sinalização é considerada a principal via de proliferação das células Lgr5 positivas (células-tronco intestinais), consequentemente a principal via responsável pelo brotamento das criptas (FAIR et al., 2018), sendo esta via regulada por R-spondin1 e Noggin (LESLIE et al., 2015).

Por o Wnt3A e EGF serem cruciais para regular a autorrenovação, proliferação e diferenciação das criptas intestinais (CHIA; KUO, 2010), o cultivo das MSCs passou a ser realizado com o uso desses fatores de crescimento do início ao fim, seguindo o meio e as concentrações utilizadas no protocolo de Sato et al. (2009), utilizando o cultivo de células-tronco intestinais em mesmas condições como grupo controle. Neste segundo grupo controle as células foram capazes de desenvolver organóides com duas morfologias distintas: as esféricas, semelhantes às desenvolvidas no primeiro controle, além de estruturas de brotamento, como encontradas por Sato et al. (2009), mostrando assim a importância da utilização concomitante do EGF com o Wnt3A para o desenvolvimento de criptas intestinais.

Diferente dos resultados obtidos com etapas sequenciadas do uso dos fatores de crescimento, quando utilizados em um único meio de cultivo, as MSCs foram capazes de desenvolver estruturas tridimensionais. Porém estas estruturas não se assemelharam com as obtidas no grupo controle, sendo estruturas maciças, sem bordas delimitadas, ausência de uma membrana evidenciada perifericamente e criptas intestinais, além de apresentarem indícios de degeneração celular após 10 dias de cultivo.

O SV é importante para a sobrevivência inicial do embrião, por atuar como fonte de nutrição até a formação da placenta (MANÇANARES et al., 2015). Além de células mesenquimais, esta membrana também possui nichos hematopoiéticos, sendo o único fornecedor de células sanguíneas para o feto no início da gravidez (FREYER; BENFREE, 2009). A principal sinalização responsável por regular estas células progenitoras da hematopoiese do saco vitelino é a via Wnt (FRAME et al., 2016). Por ser a sinalização central na proliferação de células-tronco Lgr5 positivas e células-tronco hematopoiéticas do SV, optou-se por realizar o cultivo do tecido do saco vitelino apenas digerido quimicamente com colagenase, sem realizar o isolamento prévio das MSCs, para testar se as células progenitoras hematopoiéticas poderiam ter algum tipo de indução na diferenciação intestinal. Os meios e condições de cultivos foram os mesmos realizados no grupo controle 2. Após as primeiras 72

horas de cultivo foi possível visualizar a presença de estruturas tridimensionais esféricas com membrana evidente na periferia, como as encontradas em ambos os grupos controles. Com o decorrer do cultivo estas estruturas aumentaram em número e em tamanho, passando a apresentar pequenos vacúolos em seu interior. Apesar de não desenvolver organóides com brotamentos como encontrados no grupo controle 2, algumas estruturas desenvolvidas a partir do cultivo do tecido do saco vitelino foram capazes de apresentar uma quebra de simetria em sua periferia após o sexto dia de cultivo. Serra et al. (2019) obtiveram o mesmo achado quando cultivaram células-tronco Lgr5 positivas e negativas de camundongos em mesmas condições e verificaram que esta perda de simetria nas esferas era ocasionada pela diferenciação em células de Paneth, onde este passo representou o evento mais crucial para determinar o local futuro do desenvolvimento de criptas nos organóides intestinais. Estes mesmos autores também verificaram que os organóides que não desenvolveram os brotamentos consistiam inteiramente de enterócitos, sendo desprovidos de outros tipos celulares intestinais (SERRA et al, 2019).

Os organóides intestinais e as estruturas desenvolvidas a partir do cultivo tridimensional das MSCs e do tecido do SV foram submetidas ao teste de RT-qPCR para quantificar a expressão de marcadores intestinais e endodermiais, utilizando o SV como controle negativo. Ao realizar a análise dos organóides intestinais, pôde-se verificar alta expressão de LGR5. Ao realizar a mesma análise nas estruturas derivadas do cultivo 3D das MSCs e tecidual do SV, pôde-se verificar uma expressão em baixas quantidades somente no grupo das MSCs. O LGR5, além de ser um marcador de células-tronco intestinais, também é o responsável pela modulação de células-tronco adultas de diferentes órgãos, como estômago, glândula mamária, folículo capilar e rim (WU et al., 2013; JACKS et al., 2018; BARKER et al, 2007). Esta via é regulada pela sinalização Wnt, que também é responsável por determinar o destino de diferenciação das MSCs. (LIN et al., 2019a). A sinalização canônica das Wnt foi responsável por aumentar a expressão de LGR5 em MSCs em camundongos (LIN et al., 2019b). Ou seja, o tratamento com Wnt realizado no cultivo 3D das MSCs do saco vitelino, pode ter estimulado a expressão de LGR5. Fair et al. (2018) verificaram que esta via LGR5 é a principal responsável pelo brotamento das criptas intestinais. As estruturas desenvolvidas no grupo tecidual possuíam uma morfologia esferoide, sem formação de brotamentos, o que pode explicar a ausência da expressão deste marcador. A alta expressão no grupo dos organóides desenvolvidos a partir do cultivo de células-tronco intestinais, que apresentavam brotamentos em suas estruturas, reforça esta hipótese.

Os níveis de CDX1 e CDX2 também foram testados. Estes são fatores intestinais específicos, responsáveis por direcionar a diferenciação, o desenvolvimento e o fenótipo

intestinal (SILBERG et al., 2000). A expressão de ambos os genes foi detectada nos organóides intestinais. Porém, somente a presença de CDX2 foi detectada nas estruturas desenvolvidas a partir do SV. Os fatores CDX1 e CDX2 iniciam sua expressão no endoderma em desenvolvimento, porém, no intestino adulto, a expressão de CDX1 é graduada ao longo do eixo cripta-vilosidade, sendo abundante nas criptas e diminuindo nas vilosidades, enquanto que o CDX2 é expresso uniformemente por todo o epitélio (GRAINGER et al., 2013), sendo este último o principal fator que compromete a linhagem epitelial (SUN et al., 2017). Por ter sido o único grupo capaz de desenvolver brotamentos, ou seja, criptas, os organóides intestinais expressaram CDX1, enquanto que os que formaram somente estruturas esféricas não apresentaram esta expressão. Apesar disso, todos os grupos expressaram CDX2 em seu fenótipo, indicando a presença de linhagem epitelial intestinal.

Os genes GABPB1, TRH e TBX1 foram testados nos grupos cultivados para avaliar capacidade da diferenciação endodermal e a especificação do terço intestinal das estruturas formadas. O GABPB1 é um marcador encontrado nos três folhetos germinativos, presente nos intestinos delgado e grosso, não sendo expresso no SV, enquanto que o TBX1 e o TRH são marcadores endodermiais presentes somente no intestino delgado (HOU et al., 2007). Nos organóides desenvolvidos a partir do cultivo 3D de células intestinais, assim como o do grupo tecidual do SV, foi possível observar a expressão de GABPB1, sendo pouco expresso no grupo das MSCs. Enquanto que os marcadores TBX1 e TRH obtiveram pouca ou nenhuma expressão por parte dos grupos celulares e teciduais do SV. Os organóides intestinais desenvolvidos apresentavam tanto estruturas esféricas quanto de brotamento, enquanto que as estruturas formadas a partir do tecido do SV apresentavam somente formato esférico. Corroborando com os achados de Yui et al. (2012), onde os organóides desenvolvidos a partir do cultivo de células-tronco de cólon formavam apenas estruturas esféricas. Por apresentar maiores níveis de GABPB1, baixas expressões de TRH e TBX1, além da presença de CDX2, pode-se prever que as estruturas desenvolvidas do cultivo 3D das MSCs e do tecido do SV possuíam maiores características fisiológicas de partes do intestino grosso do que do intestino delgado.

8. CONCLUSÃO

As MSCs do saco vitelino canino foram isoladas e caracterizadas. Apesar de terem passado pelo processo de diferenciação endodermal e possuírem a expressão de marcadores intestinais, estas células não foram capazes de desenvolver estruturas morfológicamente semelhantes a organóides intestinais quando cultivadas tridimensionalmente. Por toda via, quando cultivamos o tecido do saco vitelino em mesmas condições, este foi capaz de gerar estruturas equivalentes a organóides intestinais de cólon, assim como o cultivo de células-tronco intestinais caninas, que além de desenvolver o mesmo tipo de estrutura, também deu origem a organóides de brotamento.

9. REFERÊNCIAS

ATASHI, F.; MODARRESSI, A.; PEPPER, M.S. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. **Stem Cells Dev**, v. 24, 2015.

BAKER, M.; CHEN, C.S. Deconstructing third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, v. 125, p. 3015-3024, 2012.

BARKER, N. et al. Identification of stem cell in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, v. 449, p. 1003-1007, 2007.

BASSLEER, C. et al. Human chondrocytes in tridimensional culture. **In Vitro Cellular and Developmental biology**, v. 22, 1986.

BATTS, L.E. et al. Bmp signaling is required for intestinal growth and morphogenesis. **Dev Dyn**, v. 235, p. 1563-1570, 2006.

BREVINI, T.A.L. et al. Use of a super-hydrophobic microreactors to generate and boost pancreatic mini-organoids. **Methods in Molecular Biology**, v. 47, p. 1-9, 2017.

BYDŁOWSKI, S.P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2009.

CAO, L. et al. Intestinal lineage commitment of embryonic stem cells. **Differentiation**, v. 81, p. 1-10, 2011.

CHIA, L.A.; KUO, C.J. The intestinal stem cell. **Prog Molecular Biology Transl Science**, v. 96, p. 157-173, 2010.

CLEVERS, H. The intestinal crypt, a prototype stem cells compartment. **Cell Press**, v. 154, p. 274-284, 2013.

CLEVERS, H. Modeling development and disease with organoids. **Cell**, v. 165, p. 1586-1597, 2016.

CORTEZ, A.R. et al. Transplantation of human intestinal organoids into the mouse mesentery: A more physiologic and anatomic engraftment site. **Surgery**, v. 19, p. 1-8, 2018.

DECKER, W.K. et al. Cancer immunotherapy: Historical perspective of a clinical revolution and emerging preclinical animal models. **Front In Immunology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

DERRICOTT, H. et al. Developing a 3D intestinal epithelium model for livestock species. **Cell and Tissue Research**, v. 375, p. 409-424, 2019.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International society cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.4, p. 315-317, 2006.

DUTTA, D.; HEO, I.; CLEVERS, H. Disease modeling in stem cell-derived 3D organoid systems. **Cell Press**, v. 1222, p. 1-18, 2017.

EMADEDIN, M. et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. **Arch Iran Med**, v. 15, p. 422-428, 2012.

EVANS, H.E.; SACK, W.O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anat Histol Embryol**, v. 2, p. 11, 1973.

FATEHULLAH, A.; TAN, S.H.; BARKER, N. Organoids as an *in vitro* of human development and disease. **Nature Cell Biology**, v. 18, p. 246-254, 2016.

FAVARON, P.O. et al. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from new world mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. **Plos One**, v. 9, 2014.

FENG, Y. et al. Sox9 induction, ectopic Paneth cells, and mitotic spindle axis defects in mouse colon adenomatous epithelium arising from conditional biallelic Apc inactivation. **The American Journal of Pathology**, v. 183, 2013.

FINKBEINER, S.R. et al. Transcriptome-wide analysis reveals hallmarks of human intestine development and maturation in vitro and in vivo. **Stem Cell Reports**, v. 15, p.122-128, 2015.

FORDHAM, R.P. et al. Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. **Cell Stem Cell**, v.13, p.734-744, 2013.

DATE, S.; SATO, T. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. **The Annual Review of Cell and Developmental Biol**, v. 31, p. 1-21, 2015.

FAIR, K.L.; COLQUHOUN, J.; HANNAN, N.R.F. Intestinal organoids for modelling intestinal development and disease. **Philosophical Transactions Royal Society**, v. 373, p. 1-10, 2018.

FRATINI, P. et al. Endothelial differentiation of canine yolk sac cells transduced with VEGF. **Research in Veterinary Science**, v. 104, p. 71-76, 2016.

FRAME, J.M., et al. Definitive hematopoiesis in the yolk sac emerges from Wnt-responsive hemogenic endothelium independently of circulation and arterial identity. **Stem Cells**, v. 34, p. 431-444, 2016.

FREYER, C.; BENFREE, M.B. The mammalian yolk sac placenta. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 312B, p. 545-554, 2009.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinetic**, v. 3, p. 393-403, 1976.

GALDOS-RIVEROS, A.C. et al. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia Biosfera**, v. 6, p. 1-13, 2010.

GAO, Y. et al. All-trans retinoic acid promotes nerve cell differentiation of yolk sac-derived mesenchymal stem cells. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 174, p. 682-692, 2014.

GARCIA, S.M.L.; FERNANDÉZ, C.G. **Sistema digestório**. In: GARCIA, S.M.L.; FERNANDÉZ, C.G. Embriologia. Porto Alegre: Artmed, v. 3, 2012.

GRABINGER, T. et al. Ex vivo culture of intestinal crypt organoid as a model system for assessing cell death induction on intestinal epithelial cells and enteropathy. **Cell Death and Disease**, v. 5, p. 1-10, 2014.

GRAINGER, S.; HRYNIUK, A.; LOHNES, D. CDX1 and CDX2 exhibit transcriptional specificity in the intestine. **Plos one**, v. 8, 2013.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, v. 7, 2004.

HASHIMOTO, J.; KARIYA, Y.; MIYAZAKI, K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). **Stem Cells**, v. 24, p. 2346-2354, 2006.

HOLSON, J.F. et al. Absence of developmental toxicity in a canine model after infusion of a hemoglobina-based oxygen carrier: Implications for risk assessment. **Reproductive Toxicology**, v. 52, p. 101-107, 2015.

JACKS, V., et al. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. **Nature Genetics**, v. 40, p. 1291–1299, 2018.

KATT, M.E. et al. In vitro tumor models: advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. **Front Bioeng Biotechnol**, v. 12, 2016.

KARSLEN, H.O. et al. The human yolk sac size reflects involvement in embryonic and fetal growth regulation. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.98, p.176-182, 2019.

KHANLARKHANI, N. et al. Multipotent stem cell and reproduction, **J Stem Cell**, v. 11, p. 219-229, 2016.

KIM, M. et al. Comparison of viability and antioxidant capacity between canine adipose-derived mesenchymal stem cells and heme oxygenase-1-overexpressed cells after freeze-thawing. **J Vet Med Sci**, v. 78, p. 619-625, 2016.

KIM, W.K. et al. Timetable for intestinal rotation in staged human embryos and fetuses. **Birth Defects Research**, v. 67, p. 941-945, 2003.

KSCHITIZ. et al. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. **Integr Biol (Camb)**, v.9, p.1008-1018, 2012.

LARSEN, C.J. Sphéroides: le modèle de référence pour la culture in vitro des tumeurs solides? **Bulletin du Cancer**, v. 10, 2017.

LEE, S.Y. et al. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog II: the yolk sac. **The American Journal of Anatomy**, v. 166, p. 313-327, 1983.

LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1044, p. 132-138, 2005.

LEMPERG, R.K.; BERGENHOLTZ, A. Calf articular cartilage in organ culture in a chemically defined medium. **Society for In Vitro Biology**, v. 11, p. 286-290, 1975.

LESLIE, J.L. et al. Persistence and toxin production by *Clostridium difficile* within human intestinal organoids result in disruption of epithelial paracellular barrier function. **Infect. Immun.**, v. 83, p. 138 – 145, 2015.

LIAO S.Y; TSE, H.F. Multipotent (adult) and pluripotent stem cells for heart regeneration: What are the pros and cons? **Stem Cell Research and Therapy**, v. 6, 2013.

LIN, W. et al. Characterisation of multipotent stem cells from human peripheral blood using an improved protocol. **Journal of Orthopaedic Translation**, 2019a.

LIN, W. et al. LGR5-overexpressing mesenchymal stem cells augment fracture healing through regulation of Wnt/ERK signaling pathways and mitochondrial dynamics. **The FASEB Journal**, v. 33, p. 1-13, 2019b.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MANÇANARES, C.A.F. et al. A morphological analysis of the transition between the embryonic primitive intestine and yolk sac in bovine embryos and fetuses. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, p. 756-766, 2013.

MANÇANARES, C.A.F. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 84, p. 887-898, 2015.

MCCRACKEN, K.W. et al. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 6, p. 1920-1928, 2011.

MIURA, S.; SUZUKI, A. Brief summary of the current protocols for generating intestinal organoids. **Development, Growth and Differentiation**, v. 60, p. 387-392, 2018.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia básica**. 6 ed. São Paulo: Elsevier, 2004, p. 462.

MORIZANE, R.; BONVENTRE, J.V. Kidney organoids: a translational journey. **Cell Press**, v.23, p. 246-263, 2017.

MORGANI, S.M. et al. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. **Cell Rep**, v.6, p. 1954-1957, 2013.

MOSSMAN, H.W. Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. **Carnegie Intitute Contrivutions to Embryology**, v. 26, p. 129-246, 1937.

MULLER, L.; KULMS, D. A 3D organotypic melanoma spheroid skin model. **Journal of Visualized Experiments**, v. 135, 2018.

NAKAMURA, T. Recent progress in organoid culture to odel intestinal epithelial barrier functions. **The Japanese Society for Immunology**, v. 31, p. 13-21, 2018.

NATASANTI, S. et al. Consise review: organoides are powerful tool for the study of liver disease and personalized treatment desing in human and animals. **Stem Cell Transl Med**, v.3, p. 325-330, 2016.

OLIVEIRA, V.C. et al. Characterization of putative hematopoietic cells from bovine yolk sac. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, p. 1132-1140, 2015.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E.G.; STELZER, E.H.K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature reviews Mol Cell Biol**, v. 8, p. 839-845, 2007.

RYCHLIK, A.; GONKOWSKI, S.; NOWICKI, M. Inflammatory bowel disease affects density of nitrergic nerves fibers in the mucosal layer of the canine gastrointestinal tract. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 81, p. 129-136, 2017.

SATO, T. et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, p. 262-265, 2009.

SATO, T. et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. **Nature**, v. 469, p. 415-418, 2011.

SCHUIJERS, J. et al. Robust Cre-mediated recombination in small intestinal stem cells utilizing the Olfm4 locus. **Stem Cell Reproduction**, v. 3, p.234–241, 2014.

SEO, M.S. et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **J Vet Med**, v. 10, p. 181-187, 2009.

SERRA, D. et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development. **Nature**, p. 1-23, 2019.

SHAMIR, E.R.; EWALD, A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. **Nature Review Mol Cell Biol**, v. 10, p. 647-664, 2014.

SILBERG, D.G. et al. CDX1 and CDX2 expression during intestinal development. **Division of Gastroenterology**, v. 119, p. 961-971, 2000.

SIMIAN, M.; BISSEL, M.J. Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. **The Journal of Cell Biology**, v. 216, p. 31-40, 2017.

SOUZA, A.F. et al. The timeline development of female canine germ cells. **Reproduction Domestic Animals**, 2019.

SUN, X. et al. AMPK improves gut epithelial differentiation and barrier function via regulating CDX2 expression. **Cell Death and Differentiation**, v. 24, p. 819-831, 2017.

URANIO, M. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization an in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol Reprod Dev.**, v. 78, p. 361-373, 2011.

URBISCHEK, M. et al. Organoid culture media formulated with growth factors of defined cellular activity. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-11, 2019.

VAN DER FLIER, L.G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annu Rev Physiol**, v. 71, p. 241-260, 2009.

VAN DER HEE, B. et al. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture systems from porcine intestinal organoids. **Stem Cell Research**, v. 28, p. 165-171, 2018.

WANG, X.Y. et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**, v. 111, p. 2436-2443, 2008.

WATSON, P.M. et al. Bioengineered 3D glial cell culture systems and applications for neurodegeneration and neuroinflammation. **SLAS Discov**, 2017.

WENCESLAU, C.V. et al. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow. **Tissue Engineer**, v. 17, p. 2165-2176, 2011.

WU, C., et al. Lgr5 expression as stem cell marker in human gastric gland and its relatedness with other putative cancer stem cell markers. **Gene**, v. 525, p. 18-25, 2013.

YEN, T.H.; WRIGHT, N.A. The gastrointestinal tract stem cell niche. **Stem Cell Reviews**, v. 2, p. 203-212, 2006.

YU, F.; HUNZIKER, W.; CHOUDHURY, D. Engineering microfluidic organoid-on-a-chip platforms. **Micromachines**, v. 10, p. 1-12, 2019.

YUI, S. et al. Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5 stem cell. **Technical Reports**, v. 18, p. 618-624, 2012.