

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA PROGENITORA  
HEPÁTICA NO CULTIVO CELULAR DE FÍGADO DE  
FETO CANINO**

Mariana Riboli Tavares

Médica Veterinária

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA PROGENITORA  
HEPÁTICA NO CULTIVO CELULAR DE FÍGADO DE  
FETO CANINO**

**Mariana Riboli Tavares**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo**

**Coorientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia**

**Coorientador: Profa. Dra. Annelise Carla Camples**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal.

2016

Tavares Mariana Riboli  
T233c Caracterização de célula progenitora hepática no cultivo celular de fígado de feto canino/ Mariana Riboli Tavares – – Jaboticabal, 2016  
VI, 61 p.: il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientadora: Gilson Hélio Toniollo

Coorientador.: Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Annelise Carla Camplesi dos Santos

Banca examinadora: Maricy Apparício Ferreira, Fabiana Ferreira  
de Souza

Bibliografia

1. EpCAM. 2. NCAM. 3. Célula-tronco. I. Título. II. Jaboticabal-  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA PROGENITORA HEPÁTICA NO CULTIVO CELULAR DE FÍGADO DE FETO CANINO

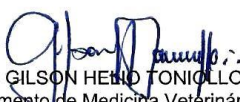
**AUTORA: MARIANA RIBOLI TAVARES**

**ORIENTADOR: GILSON HELIO TONIOLLO**

**COORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA**

**COORIENTADORA: ANNE LISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GILSON HELIO TONIOLLO  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP Jaboticabal

  
Profa. Dra. MARI CY APARECIDA FERREIRA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

  
Profa. Dra. FABIANA FERREIRA DE SOUZA  
Departamento de Reprodução Animal Radiologia Veterinária / FMVZ / UNESP Botucatu

Jaboticabal, 25 de fevereiro de 2016

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARIANA RIBOLI TAVARES** – nascida no município Muzambinho, MG, aos 6 dia do mês de outubro de 1986. Concluiu o curso colegial no “Colégio Lyceu”, na cidade de Muzambinho, em dezembro de 2004. Ingressou em março de 2009 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no município de Jaboticabal, SP; realizou uma iniciação científica com bolsa da FAPESP de 2011-2012. Concluiu, em dezembro de 2013, o curso superior em Medicina Veterinária. Em março de 2014 ingressou, no programa de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Sou muito grata aos meus pais Cristina e Manoel pelo incentivo e amor incondicional. Ao meu irmão Felipe e ao meu companheiro Willy que sempre me apoiou e tem muita paciência comigo.

Eu não tenho palavras para agradecer a colaboração que a Raquel me deu ao longo dos anos do mestrado sem ela à caminhada teria sido bem mais árdua.

Sou grata ao meu orientador Prof. Gilson Hélio Toniollo pela oportunidade da realização deste trabalho e por todos os ensinamentos ao longo destes anos.

## Sumário

	Páginas
Dados curriculares da autora.....	I
Agradecimento.....	II
Sumário.....	III
Certificado Comissão de Ética no uso de animais.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	2
2.1 Cultivo celular.....	9
2.2 Imunofenotipagem.....	10
3. Bibliografia.....	11
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>20</b>
Resumo.....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.1 Meios e reagentes.....	24
2.2 Obtenção dos fetos.....	25
2.3.Cultura primária de células hepáticas.....	25
2.4 Passagem celular.....	26
2.5 Contagem celular.....	26
2.6 Curva de crescimento.....	27
2.7 Criopreservação celular .....	27
2.8 Imunocitoquímica.....	28
2.9 Citômetro de fluxo.....	29
3. RESULTADO.....	31
4. DISCUSSÃO.....	37
5. REFERÊNCIAS.....	39
Anexo I – Normas da revista .....	43



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009131/14 do trabalho de pesquisa intitulado "**Cultivo e caracterização de células do fígado de fetos caninos**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de junho de 2014.

Jaboticabal, 06 de junho de 2014.

  
Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA



## CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA PROGENITORA HEPÁTICA NO CULTIVO CELULAR DE FÍGADO DE FETO CANINO

**Resumo** - Com a descoberta das células-tronco abriu-se um leque de possibilidades nas pesquisas de nichos destas em diferentes órgãos e também no estudo de doenças e regeneração tecidual. O fígado vem sendo alvo de muitos estudos já que as doenças crônicas deste órgão tem como resolução um transplante, o que é caro e há poucos doadores. O fígado é composto, principalmente, por hepatócitos, no entanto, seu cultivo e manutenção *in vitro* são difíceis. Assim, uma alternativa é a manutenção das células progenitoras hepáticas. Elas são conhecidas em camundongos, humanos, mas, pouco mencionadas em cães. Esse trabalho objetivou mostrar a existência das células progenitoras hepáticas no cultivo celular de fígado fetal de cães por imunocitoquímica e citometria de fluxo a fim de saber se este nicho celular existe no cultivo e se é possível num futuro próximo a separação desta linhagem nesta espécie. Foram utilizados para a realização do trabalho 10 fetos sendo que destes foi possível o aproveitamento em sete animais. Foi realizado no trabalho isolamento, cultivo de células hepáticas, criopreservação, curva de crescimento celular, imunocitoquímica e citometria de fluxo. A cultura celular durou sete passagens, com dobramento populacional de 31,7 horas, na imunocitoquímica as células foram marcadas positivamente para os seguintes marcadores: EpCAM, NCAM, Nestina e Thy-1. Na citometria de fluxo foi possível realizar a dupla marcação das células com os marcadores EpCam e NCAM que resultaram em 0,5%  $\pm$ 0,173 do total de células analisadas, conclui-se que o objetivo da pesquisa almejado foi conseguido, existe células progenitoras hepáticas no cultivo celular de fígado fetal canino.

Palavras chave: EpCAM, NCAM; célula-tronco hepática; cão

## **Characterization of hepatic progenitor cell in cell culture canine fetus liver**

**Abstract** - With the discovery of stem cells has opened up a range of possibilities in niche research these in different organs and also in the study of diseases and tissue regeneration the liver has been the subject of many studies since chronic diseases of this organ has the resolution a transplant, which is expensive and there are few donors. The liver consists mainly of hepatocytes; however, its cultivation and maintenance in vitro are difficult. Thus, an alternative is to maintain the hepatic progenitor cells. They are known in mice, humans, but rarely mentioned in dogs. This study aimed to show the existence of hepatic progenitor cells in cell culture fetal liver of dogs by immunocytochemistry and flow cytometry in order to know if this cell niche exists in the cultivation and whether it is possible in the near future the separation of this lineage in this species. They were used to carry out the work 10 fetuses and of these it was possible to use in seven animals. Work was carried out in isolation, cultivation of liver cells, cryopreservation, cell growth curve, immunocytochemistry and flow cytometry. The cell culture lasted seven passes, doubling time in 31.7 hours, in immunocytochemistry cells were positively stained for the following markers: EpCAM, NCAM, Nestin and Thy-1. In flow cytometry it was possible to double staining of cells with EpCam markers and NCAM which resulted in  $0.5 \% \pm 0.173$  of the total of the cells analyzed. Concludes that the purpose of the desired search has been achieved there liver progenitor cells in fetal liver cell culture canine

**Keywords:** EpCAM, NCAM, stem cells hepatic, dog

## Capítulo 1 - Considerações Gerais

### 1. Introdução

As células-tronco são designadas como células indiferenciadas, com elevada capacidade proliferativa e com habilidade de autorrenovação. São aptas a regenerar um tecido após um trauma ou lesão e tem a capacidade de modular as funções celulares envolvidas nestes processos (França, 2011). As células-tronco podem ser classificadas em três categorias de acordo com o período de isolamento durante a ontogênese: embrionária, fetal e adulta. O termo célula-tronco refere-se a células com habilidade em gerar células filhas com características similares à célula mãe, bem como se diferenciar em células especializadas (Gage, 2000).

As células-tronco fetais ganharam ênfase nas pesquisas por exibirem características únicas com uma riqueza de informações e novas descobertas sobre a compreensão da biologia das células-tronco em geral. Podem ser exploradas como uma fonte potencial para a terapia celular. As células-tronco fetais podem ser derivadas a partir do feto ou a partir das estruturas de suporte extra-embrionária, que são de origem fetal (Hemberger, 2008).

Os recentes avanços nos estudos da disposição anatômica do parênquima hepático e epitélio biliar mostram a existência de vários compartimentos de células-tronco compostos de células progenitoras de diferentes linhagens (Cardinale, Wang, Carpino, et al., 2012). Neste contexto o fígado humano de todas as idades apresenta células progenitoras hepática, bipotentes, podendo se diferenciar em hepatócitos ou colangiócitos (Schmelzer et al., 2007). Durante a lesão hepática grave e persistente, os hepatócitos já não tem a capacidade de proliferar enquanto que as células-tronco progenitoras hepática são induzidas a se multiplicarem. Este aumento do crescimento celular é também conhecido como, reação dos ductos biliares, reação de células oval ou hiperplasia de células oval. As células progenitoras hepáticas existem ao entorno dos ductos biliares e canais de Hering (Kuwahara et al., 2008). Assim, estas células apresentam características peculiares, podendo ser utilizadas como fontes para estudos de terapia celular (Forbes ; Newsome, 2012).

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, em 2014 foram realizados 1769 transplantes de fígado e a lista de espera constituía 2024 pessoas. O transplante de fígado só é indicado para pessoas com doenças hepáticas agudas ou crônicas, irreversíveis e progressivas. A hepatite crônica por vírus da hepatite C (VHC) e a cirrose alcoólica representam cerca de 50% das etiologias que levam pacientes adultos ao transplante. Na população pediátrica, as principais indicações de transplante hepático são a atresia de vias biliares (57%) seguida das doenças metabólicas (19%) (Ministério da saúde, 2016).

Pelo fato do *Canis lupus familiaris*, o cão doméstico, apresentar homologia de 75% do DNA com o ser humano (Klug, 2010) foi escolhido como material de estudo neste trabalho. Desta forma, o presente trabalho objetivou conseguir estabelecer um cultivo de células hepáticas de fetos caninos a fim de descobrir se neste, por marcação com os anticorpos EpCAM e NCAM, existe a presença de células progenitoras hepáticas para provir subsídios para posterior separação das mesmas estabelecendo uma cultura pura.

## **2. Revisão da literatura:**

Um dos primeiros experimentos que impulsionaram os demais com cultivo celular foi o realizado por Ross G. Harrison há mais de cem anos, na Universidade Johns Hopkins. Este estudo demonstrou que tecidos cultivados de embriões de anfíbios sobreviviam por até quatro semanas (Rebello, 2014).

O conceito da existência de uma hierarquia dentre as células, sendo o lugar do topo ocupado pela célula tronco, de modo que as demais descendam dela, surgiu pela primeira vez na década de 60, com os experimentos de McCulloch e Till (1961). Neste trabalho pioneiro foi identificada a primeira população de célula-tronco na medula óssea de camundongos adultos. Outros estudos, realizados nas décadas de 1970 e 1980 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein ampliaram o potencial de uso das células-tronco no caso, mesenquimais, demonstrando sua capacidade de autorrenovação e diferenciação (Drzewiecki et al., 2010). Na época, devido à semelhança

morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (Torres, 2009).

As células-tronco podem ser definidas como células não diferenciadas de embriões, fetos ou tecidos adultos, que tem como particularidade o potencial de gerar células de diversos tecidos sob o estímulo bioquímico, hormonal e mecânico adequado, *in vitro* ou *in vivo* (Csaki et al., 2007), preservando sua própria população, gerando células filhas idênticas (Zago, 2005).

Baseado no potencial de diferenciação as células-tronco podem ser classificadas em pluripotentes, aquelas que podem gerar todos os diferentes tipos celulares, como as células da massa celular interna do blastocisto; e multipotentes, precursoras de diferentes tipos celulares de uma mesma linhagem, do tecido onde se insere como, as células-tronco hematopoiéticas. As células-tronco ainda podem ser classificadas como oligopotentes, que podem originar células de diferentes linhagens celulares de um mesmo tecido, como as células-tronco neurais; e aquelas que originam apenas um tipo celular, com função repositora, como as células-tronco da epiderme, chamadas unipotentes (Friel et al., 2005).

As células-tronco podem ser de origem embrionária, obtidas a partir da massa celular de embriões em fase inicial de desenvolvimento, ou originária de tecidos adultos. Essas últimas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, substituindo células perdidas pelo desgaste natural ou necessárias para a regeneração de órgãos e tecidos após lesões variadas (Zago, 2005). Em 1998, pesquisadores nos Estados Unidos isolaram pela primeira vez células tronco embrionárias de humanos (Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998). As células-tronco embrionárias são aquelas oriundas de tecido embrionário especificamente da fase blastocística que compreende entre o quarto e quinto dia após a fecundação na espécie humana, mas antes da implantação no útero que ocorre por volta do sexto dia após a fecundação (Segura et al., 2007).

Dentre as células-tronco adultas a mais conhecida são as células-tronco hematopoiéticas cujas principais fontes são a medula óssea e as células de cordão umbilical. Diferentes das células-tronco embrionárias e fetais, que são

pluripotentes, as células-tronco adultas são multipotentes, não especializadas (Csaki et al., 2007).

As células-tronco fetais podem ser isoladas a partir do próprio feto e de estruturas extra-fetais de suporte (Bossolaco, 2004). Observa-se interesse crescente na utilização das células fetais em engenharia tecidual, para correção de diversos defeitos congênitos (Fuchs et al., 2003). O feto e os tecidos fetais apresentam-se como potencial fonte para os transplantes celulares, pois possuem menor risco e contaminação viral e/ou bacteriana quando comparado com os tecidos adultos, por residirem em um ambiente imunoprivilegiado dentro do útero. Além disso, a maioria das células fetais prolifera mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células adultas e outra característica apresentada pelos tecidos fetais é a ausência de questionamento ético quanto a sua utilização clínica em transplantes (Bruder et al., 1997, Abdulrazzak et al., 2010). As células-tronco fetais podem ser isoladas a partir de sangue fetal e da medula óssea, bem como de outros tecidos fetais, incluindo fígado e rim (O'Donoghuek; Fisk, 2004).

O fígado fetal é excepcionalmente volumoso, ocupando um amplo espaço da cavidade abdominal (König e Liebich, 2004). É o principal sitio para o desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos, atuando na diferenciação e maturação da linhagem hematopoética definitiva (Koury et al., 2002) e esta função é assumida pelo fígado fetal a partir do terço médio da gestação em mamíferos (Badylak, 2002). Entretanto, o fígado ganhou destaque nas pesquisas com células-tronco pela sua alta capacidade proliferativa e regenerativa através de células hepáticas (Fausto, 1994). A capacidade proliferativa dos hepatócitos adultos e do tecido epitelial biliar pode ser observado quando é realizada uma hepatectomia em ratos e camundongo, do quais é retirado dois terços do fígado e o órgão se regenera (Russo ; Parola, 2011; Fausto et al., 2012).

O fígado tem origem embriológica do divertículo hepático, protuberância da endoderme, localizada na porção distal do intestino anterior. A porção cranial do divertículo hepático origina o fígado e as vias biliares intra-hepáticas, enquanto a sua porção caudal origina a vesícula biliar e as vias biliares extra-

hepáticas. O divertículo hepático é constituído por hepatoblastos; células bipotenciais, com capacidade para originar hepatócitos ou colangiócitos, encontrando-se em estreita relação com a mesoderme cardíaca e com o *septum transversum*. Os hepatoblastos proliferam rapidamente e penetram o *septum*, formando cordões de hepatócitos, designados por placas hepáticas. Estas se encontram separadas por células da mesoderme que formam o endotélio especializado poroso, constituindo os sinusóides hepáticos (Sadler; Jan Langman's, 2010). As células dos ductos biliares, bem como os hepatócitos, tem, portanto, uma origem endodérmica, enquanto as células de Kupffer e as células endoteliais dos sinusóides hepáticos tem origem na mesoderme do *septum transversum* (Grijalva ; Vakili, 2013).

A embriologia do fígado é composta por múltiplos estágios de desenvolvimento, no qual a indução da destinação hepática depende de interações recíprocas entre o endoderma ventral do intestino anterior e o tecido mesenquimal adjacente (Zaret, 2002). O fígado é formado por hepatócitos e colangiócitos, dois tipos de células epiteliais. Este órgão tem importância no metabolismo, particularmente pela síntese de proteínas e enzimas, regulando o consumo energético, auxiliando a digestão e contribuindo ainda para a eliminação de moléculas endógenas e exógenas (Alpini et al., 2002).

O hepatócito é uma célula de natureza epitelial, altamente diferenciada, conseqüentemente, dificilmente se divide. Apenas um hepatócito entre 20.000 pode estar em processo de divisão em algum momento, durante a vida do ser humano ou animal, essa divisão ocorre de uma a duas vezes para cada célula (Jesus, et al., 2000). O hepatócito maturo ou o hepatócito de fígado de neonato são considerados candidatos potenciais para o transplante celular. Porém, a baixa viabilidade de órgãos para isolar hepatócitos maduros e a dificuldade de expandi-los *in vitro* limitam seu uso (Tolosa et al., 2014). Zhang et al.(2011) conseguiram isolar hepatócitos de fígado de bezerros, com 72 horas de cultivo celular, neste estudo, os hepatócitos se apresentaram funcionais, secretando albumina, desidrogenase láctica e ureia, porém, a cultura durou 10 dias (Zhang et al., 2012). Quando ocorre lesão aguda no fígado, inicialmente, os hepatócitos e os colangiócitos sofrem divisão celular para compensar a perda

celular/tecidual. Entretanto, danos crônicos podem suprimir essa capacidade proliferativa destas células hepáticas. Em consequência, as células progenitoras intra-hepáticas entram em ação para contribuir na regeneração do órgão (Itoh et al., 2011).

As células-tronco progenitoras hepáticas em seres humanos encontram-se nas placas ductais dos fígados fetais e nos canais de Hering no fígado adulto. Estas podem ser isoladas utilizando a molécula de adesão da célula epitelial (EpCAM) como um marcador de células progenitoras hepáticas. As células positivas para EpCAM quando classificadas por imunoselecção, constitui 0,5-2,5 % do parênquima hepático de doadores de todas as idades. O transplante de células EpCAM positivas ou células-tronco progenitoras hepáticas são uma alternativa para terapias com células-tronco hepáticas( Rao et al., 2008 ). As células progenitoras hepáticas, são denominadas células ovais no roedor. Estão localizadas na área portal e periportal e contribuem para a regeneração do fígado (Zhang; Bai; Huang, 2003; Haridass; Narain; Ott, 2008). Estas células surgem no parênquima, geralmente sob a forma de neoductules, diferenciando-se em hepatócitos e colangiocitos maduros para restaurar o fígado danificado. (Wang et al., 2003)

Schmelzer et al. (2007) mostraram em seu trabalho que as células nas placas ductal do fígado fetal e neonatalis e nos canais de Hering em fígados pediátricos e adultos são células progenitoras hepáticas. Estas podem ser isolados com eficiência por condições de cultura selectivas e por imunoselecção para EpCAM (CD326) e/ou da NCAM (CD56) .

O EpCAM é uma glicoproteína transmembranar expressa, principalmente em epitélios simples, células progenitoras, células estaminais normais e malignas e ainda em vários carcinomas de origens diferentes. As funções do EpCAM são numerosas e incluem a adesão célula- célula, a proliferação, a manutenção de estados indiferenciados, regula a diferenciação celular, migração e invasão ( Munz; Baeuerle; Gires, 2009; Went, et al., 2004) Por imunohistoquímica, Balzar et al., (1999), observaram que hepatoblastos no fígado embrionário humano são EpCAM positivo, ao passo que os hepatócitos maduros são EpCAM negativo.



O marcador de superfície celular NCAM (CD56) inicialmente utilizado para fenotipagem de células da glia, células musculares e neurônios, é também encontrado na maioria das células progenitoras hepáticas derivadas de fígado fetal e neonatal, entretanto, no fígado adulto a marcação de NCAM aparece em 40 % das células positivas para EpCAM (Goridis ; Brunet, 1992).

Vestenoft et al.(2011) mostraram em seu trabalho que fígado fetal humano com idade gestacional de 15 semanas possui marcação positiva para Nestina na área porta em células do mesenquima hepático, nas células epiteliais das vias biliares e células endoteliais arteriais.

Gridelli et al. (2012) identificaram por citometria de fluxo que logo após o isolamento das células hepáticas em humanos há uma expressiva marcação associada a células mesenquimais sendo que 1,5-2% destas são positivas para Thy -1 (CD90).

A literatura tem como enfoque as células-tronco progenitoras hepáticas em camundongo, rato e homem. Existe pouca publicação destas em canino e menos ainda em felinos ou outras espécies. A resposta das referidas células são muitas vezes mencionadas como proliferação do ducto biliar quando observado em secções histológicas do fígado (Yoshioka K. et al., 2004; Warren , et al., 2011).

As células-tronco tem como finalidade do seu estudo a abordagem terapêutica visando à medicina regenerativa. A terapia celular é promissora e permanece em destaque mundialmente, pois propõe o estabelecimento da manutenção da qualidade de vida de indivíduos que sofrem de alterações que não possuem cura descrita e debilitam o paciente (Lima et al., 2009). Utilizadas há várias décadas em transplantes de medula óssea, as células-tronco se apresentam na ciência como fontes de tecidos para a regeneração daqueles que apresentam alguma anormalidade no organismo (Cabeleira et al., 2010). Para o uso de implante celular as células progenitoras apresentam maior segurança em relação às células-tronco embrionárias, embora estas sejam totipotentes, podendo diferenciar em qualquer tipo celular de um organismo elas possuem maior facilidade de alteração tendo a possibilidade de transformação tumoral. Já as células progenitoras por serem mais diferenciadas sofrem menos influências

do meio e tem menor índice de formação tumoral. Assim, as células progenitoras são uma opção mais segura para o uso em implantes (Dan; Geoge, 2008).

A doença hepática grave que debilita o paciente humano acaba por levá-lo a necessidade de um transplante de fígado. Um dos empecilhos para o transplante hepático é o número insuficiente de doadores para a demanda crescente de candidatos (Júnior et al., 2015). De acordo com a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos no Brasil de janeiro a setembro de 2015 fez-se 1.326 transplantes de fígado. Pelo baixo número de doadores perante o alto número de candidatos ao transplante hepático há uma decorrente busca por alternativas como o uso de xenotransplantes, principalmente com a utilização de porcos geneticamente modificados, bem como o uso da bioengenharia, com a criação de fígado sintético em laboratório, o que pode mudar drasticamente o panorama da falta de órgãos (Cooper et al., 2013). Em cães e gatos, a incidência de hepatopatia e doenças do trato biliar é cerca de 1% a 2% de todos os casos clínicos, mas essa taxa depende da raça do animal (Rothuizen, 2001).

O cão é um modelo animal utilizado para os estudos dos mecanismos e tratamentos de diversas alterações, tais como câncer de próstata, doenças cardiovasculares, diabetes e leucemia. O modelo canino representa um modelo pré-clínico para o estudo de doenças humanas, pois tanto as manifestações clínicas das doenças como a fisiologia da espécie canina apresentam similaridade com a espécie humana. O cão é a espécie predominantemente utilizada para as pesquisas de transplantes celulares, por apresentar a cinética da célula-tronco e a demanda hematopoiética similares ao organismo humano (Horn et al., 2004).

As primeiras células-tronco utilizadas em transplante foram às células tronco hematopoiéticas para o tratamento de doenças neoplásicas, hematológicas ou não, doenças metabólicas e deficiências imunológicas. No entanto, sua utilização traz certas limitações como a necessidade de testes de imunocompatibilidade entre o doador-receptor (Azevedo e Ribeiro, 2000), enquanto que as células-tronco isoladas dos tecidos fetais são imunogênicas, ampliando a sua utilização terapêutica (O'Donogue e Fisk, 2004).

## 2.1 Cultivo celular

O cultivo celular é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo, mantendo as características próprias (Freshney, 1994). Células isoladas de tecidos ou órgãos só podem ser cultivados *in vitro* quando mantidos em instalações adequadas, isto é, em temperaturas definidas e suplementados com um meio contendo nutrientes e fatores de crescimento. Além disso, o conhecimento de morfologia celular, procedimentos básicos de cultura celular e técnicas assépticas rigorosas são essenciais para a manutenção de células *in vitro* livre de qualquer tipo de contaminação (Freshney, 2005).

Por convenção denomina-se uma cultura celular como primária, quando suas células são diretamente obtidas de um tecido humano ou animal. Linhagens celulares contínuas, por outro lado, são aquelas nas quais as células sofreram imortalização, adquiriram a capacidade de se multiplicar indefinidamente (Freshney, 2006).

Células normais apresentam um padrão de crescimento celular no cultivo chamada curva de crescimento sigmoide, com quatro fases de crescimento celular em cultura: lag, log, plateau e morte celular. Na fase lag o número de células varia pouco, pois não há proliferação imediata após a adição de células ao meio de cultura. A fase log é a fase de crescimento logarítmico com máximo crescimento. Há maior viabilidade e atividade metabólica, sendo o período ideal para experimentação e estudo. A duração dessa fase depende da densidade inicial das células, da taxa de crescimento celular e da densidade de saturação da linhagem. Fase plateau, caracterizada por grande formação de células acompanhadas pela redução da velocidade de crescimento e fase de morte celular nesta há redução do número de células que excede a quantidade de células vivas (Jayabalan, 1993).

## 2.2 Imuno-fenotipagem

Tecidos e órgãos são compostos por múltiplos tipos celulares para o seu perfeito funcionamento. Esta mistura de células também compõem o cultivo celular, o que torna necessário identificar as células. A identificação pode ser por morfologia, mas a maneira mais eficiente é por marcadores celulares específicos que refletem a função celular *in vivo* (Martin, 1994).

Um tipo de marcador celular é o conjunto de diferenciação (CD), os quais são compostos por moléculas de superfície classificadas de acordo com um sistema internacionalmente aceito, e que são identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais. Estes receptores de superfície constituem um modo de comunicação da célula e o ambiente externo (Tizard, 1986; Janeway et al., 2002).

A imuno-citoquímica é o conjunto de metodologias em que se utilizam anticorpos como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes teciduais que funcionam como antígenos. Esta ligação permite situar e identificar a presença de variadas substâncias nas células e tecidos por intermédio da cor que é associada ao complexo antígeno-anticorpo formado. Assim, a imuno-citoquímica se apresenta como um meio de identificação de várias estruturas celulares e teciduais (Polak ;Van Noorden, 2003).

Outra maneira de realizar a marcação celular é por citometria de fluxo, uma técnica bastante importante que tem sido utilizada em áreas como, imunologia, hematologia, oncologia, anatomia patológica e biologia celular (Ribeiro, 2010). Com o citômetro de fluxo é possível definir características de células ou partículas utilizando as propriedades de dispersão de luz das mesmas pela emissão de fluorescência de anticorpos marcados (Lucidi et al., 2011).

A possibilidade de obtenção de células progenitoras hepáticas contribuirá para clínica médica veterinária podendo se estender para a humana no parâmetro da medicina regenerativa, aumentando a possibilidade dos tratamentos das doenças hepáticas.

### 3. Referências:

ALPINI, G.; MCGILL, J.M. AND LARUSSO ,N.F.. The pathobiology of biliary epithelia. **Hepatology**, v. 35, n. 5, p. 1256-1268, 2002.

ABDULRAZZAK, H.; MOSCHIDOU, D.; JONES, G. AND GUILLOT, P. V. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. **J. Royal Soc.** v. 7, p. 689-706, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=450&c=934&s=0&friendly=links>>. Acesso em 01/02/2016.

BADYLAK S.F. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. **Seminars Cell Dev. Biol.** v.13, p. 377-383, 2002.

BALZAR, M., WINTER, M., J.; DE BOER, C., J. and LITVINOV, S.,V. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 699–712, 1999.

BRUDER, S.,P.; JAISWAL, N.;HAYNESWORTH, S., E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J. Cell Biochem.** v. 64, p. 278-294,1997.

BOSSOLACO, P. Characterization and multilineage differentiation of amniotic fluid cells. **Abstracts of the 2nd Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research**, p. 218, 2004.

CABELEIRA, A. VIERA, M.; MATOS, T.; GOMES, A.; RIVERA, D. O sangue do cordão umbilical em medicina regenerativa: uma revisão dos avanços científicos mais recentes. **Acta Obstetrícia e Ginecologia Portuguesa**, Coimbra, v. 4, n. 2, p. 81-87, jun. 2010.

CARDINALE, V.; WANG, Y.; CARPINO, G.; MENDEL, G.; ALPINI, G.; GAUDIO, E.; REID, L., M.; ALVARO, D. The biliary tree--a reservoir of multipotent stem cells. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 9, p. 231-40, 2012.

COOPER, D., K.; HARAA, H.; EZZELARAB, M.; BOTTINOB, R.; TRUCCOB, M.; PHELPSC, C., AYARESC, D.; DAID, Y. The potential of genetically-engineered pigs in providing an alternative source of organs and cells for transplantation. **J Biome Res.**; v. 27, n. 4, p. 249-53, 2013.

CORADEGHINI, R.; GUIDA, C.; SCANAROTTI, C.; SANGUINETI, R.; BASSI, A.M.; PARODI, A.; SANTI, P., L.; RAPOSIO, E. A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 466-477, 2010.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A., Y., E, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 128, n. 6, p. 507-520, 2007.

DAN, Y., Y.; GEORGE, C., Y. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. **J Gastroenterol Hepatol**; v. 23, n. 5, p. 687-98, 2008.

DRZEWIECKI, B., A.; THOMAS, J., C.; TANAKA, S., T. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. **Stem Cells**, n. 765167. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4061/2010/765167>>

FAUSTO, N., Liver stem cells. In: Arias, I.M. (Ed.), *The Liver: Biology and Pathobiology*. **Raven Press**, New York, p. 1501-1518, 1994.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **J Hepatol.**, v. 57, p. 692-4, 2012.

FRIEL, R., VAN DER SAR, S.; MEE, P., J. et al. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling. **Advanced Drug Delivered Reviews**, v. 57, p. 1894-1903, 2005.

FRANÇA, S. Células-tronco aumentam opções terapêuticas. **Assoc Paul Cir Dent**; v. 65, n. 2, p. 86-89, 2011.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Technique** – 4th Edition, p. 672. , New York, 1994.

FRESHNEY, R. I. Basic principles of cell culture. *Culture of Cells for Tissue Engineering* (eds G. Vunjak-Novakovic and R. I. Freshney), **John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.**, p. 03-22, 2006.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5<sup>ed</sup>. New York: Wiley-Liss, Ch. 4, **Laboratory Design and Layout**. p. 43-53, 2005.

FORBES, S.,J.; NEWSOME, P., N. New horizons for stem cell therapy in liver disease. **J Hepatology**, v. 56, p. 496-492, 2012.

FUCHS, J., R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, S.; VACANTI, J. P.; FAUZA, D., O. et al., Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow mesenchymal progenitor cells. **Journal Pediatric Surgical**,v. 38, n.6, p. 984-987, 2003.

GAGE, F. H.; Mammalian neural stem cells.**Science**, v. 287, p. 1433-1438, 2000.

GRIDELLI, B.; VIZZINI, G.; PIETROSI, G.; LUCA, A.; SPADA, M.; GRUTTADAERIA, S.; CINTORINO, D.; AMICO, G.; CHINNICI, C.; MIKI, T.; SCHMELZER, E.; CONALDI, P., G.; TRIOLO, F.; GERLACH, J, C. Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation. **Liver Transpl** ,v. 18, p. 226-237, 2012 .

GRIJALVA, J. and VAKILI, K. "Neonatal liver physiology." *Seminars in pediatric surgery*. v. 22. No. 4. WB Saunders, 2013.

GORIDIS, C.; BRUNET, J., F. Neural cell adhesion molecule (NCAM): structural diversity, function and regulation of expression. **Semin. Cell Biol.**, v. 3, p. 189 – 197, 1992.

HARIDASS, D.; NARAIN, N.; OTT, M. Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. **Current opinion in organ transplantation**, v. 13, n. 6, p. 627-632, 2008.

HEMBERGER, M.; YANG, W.; NATALE, D.; BROWN, T., L.; DUNK, C.; GARGETT, C., E.; TANAKA, S. Stem cells from fetal membranes. **A Workshop Report**. Placenta, v. 22, p. 17-19, 2008.

HORN, P., A.; MORRIS, J., C.; NEFF, T.; KIEM, H., P. et al. Stem cell gene transfer-efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, v. 10, p. 417-43, 2004.

ITOH, T.; TANAKATANAKA, M.; MIYAJIMA, A. Liver Stem Cells. In **Regenerative Medicine**; p. 327-349, Springer Netherlands, 2011.

JANEWAY, C., A.; TRAVES, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença**. Porto Alegre: Artmed Editora, 5.ed., 2002, p.767.

JAYABALAN, M. Biological interactions: causes for risks and failures of biomaterials and devices. **J Biomater.**, v. 8, p. 64-71, 1993.

JESUS, R. P.; WAITZENBERG, D., L.; CAMPOS, F., G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Rev. Ass Méd Brasil.**, v. 46, n. 3, p. 242-254, 2000.

JÚNIOR, R. F., M.; SALVALAGGIO, P.; REZENDE, M. B.; EVANGELISTA, A. S.; GUARDIA, B. D.; MATIELO, C. E. L.; NEVES, D. B.; PANDULLO, F. L.; FELGA, G. E. G.; ALVES, J. A. S.; CURVELO, L. A.; DIAZ, L. G. G.; RUSI, M. B.; VIVEIROS, M. M.; ALMEIDA, M. D.; PEDROSO, P. T.; ROCCO, R. A.; FILHO, S. P., M. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives **Einstein (São Paulo)**, v.13, n.1, São Paulo, Jan./Mar, 2015. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S1679-45082015RW3164>>



- KLUG, W. S. **Conceitos de genética**, 9. Ed., **Artmed** Porto Alegre, 2010, p.548.
- KONIG, H., E. ; LIEBICH, H., G. Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido. **Artmed**, Porto Alegre, 2004, p.400.
- KOURY, M., J.; SAWYER, S., T.; BRANDT, S., J. New insights into erythropoiesis. **Current opinion in hematology**. v.9, p.93-100, 2002.
- KUWAHARA, R.; KOFMAN, A., V.; LANDIS, C., S.; SWENSON, E., S.; BARENDSSWAARD, E.; THEISE, N. D. The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. **Hepatology**, v. 47, p. 1994–2002, 2008.
- LIMA, R., S.; SOARES, M., P., B.; SANTOS, R., R. Terapia celular na doença de Chagas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 878- 9, maio 2009.
- LUCIDI, C., A.; TAKAHIRA, R., K.; GERLACH, J., A.; DAVIS, J., M.; SCHWARTZ, K., A. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Journal of Veterinary Clinical Pathology*, v. 40, n. 4, p. 435-443, 2011.
- MARTIN B. M. **Tissue Culture Techniques an Introduction**, Ed. Birkhauser, Boston, 1994, p. 132.
- MCCULLOCH, E., A.; TILL, J., E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. **Radiationresearch**, v. 13, p.115–125.,1960. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.2307/3570877>>
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016 . Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/366-sas-raiz/dahu-raiz/transplantes-raiz/transplantes/21634-figado>>. Acesso em: 31/01/2016.
- MUNZ, M.; BAEUERLE, P. A.; GIRES, O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. **Cancer Research**, v. 69, p. 5627–5629, 2009.

O'DONOGHUE K.; FISK N., M. Fetal stem cells. **Best Practice e Research Clinical Obstetrics e Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 853-875, 2004.

POLAK, J., M.; VAN NOORDEN, S. Introduction to immunocytochemistry. **Oxford: BIOS Scientific Publishers**; 2003.

RAO, M., S.; KHAN, A., A.; PARVEEN, N.; HABEEB, M., A.; HABIBULLAH, C., M.; PANDE, G. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. **World J. Gastroenterology**, v. 14, p. 5730-5737, 2008.

REBELO, M. A. **Fundamentos da cultura de tecido e células animais**. Ed. Rubio, 2014, p. 208.

RIBEIRO, N., F., S. Relatório de estágio em citometria de fluxo 2010 **Dissertação de Mestrado em Oncologia**. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar- Universidade do Porto, 2010.

ROTHUIZEN, J. Hepatopatias e doenças do trato biliar. In: DUNN, J.K. (Ed.). **Tratado de medicina de pequenos animais**. Roca, São Paulo, 2001, p. 444-493.

RUSSO, F. P.; PAROLA, M. Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair. **Cytotherapy**, v. 13, p. 135-144, 2011.

SADLER, T. W.; LANGMAN'S, J. **Medical Embryology**., Philadelphia: Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins. 11th ed., 2010, p. 191.

SCHMELZER, E.; ZHANG, L.; BRUCE, A.; WAUTHIER, E.; LUDLOW, J.; YAO, H. L.; MOSS, N.; MELHEM, A.; MCCLELLAND, R.; TURNER, W.; KULIK, M.; SHERWOOD, S.; TALHEDEN, T.; CHENG, N.; FURTH, M., E.; REID, L., M. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donor, **J Exp Med**, v. 204, p. 1973-1987, 2007.

SEGURA, D. C. A.; NASCIMENTO, F., C.; RUTHES, T.; SANTOS, W., P. Células-tronco: as células capazes de gerar outros tipos de células. **Arquivos de ciências da saúde da Unipar**. v. 11, n. 2, p. 145-152, Maio/ago. 2007.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONOVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13726-13731, 1998.

SILVA JUNIOR, F. C.; ODONGO, F., C., A.; DULLEY, F., L; Células-tronco hematopoiéticas: utilidades e perspectivas. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 31, p. 53-58, 2009.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat.** v. 14, p. 213–222, 1961. Disponível em : <<http://dx.doi.org/10.2307/3570892> >

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

TIZARD, I. A., **Veterinary immunology: an introduction**, 5ed, Philadelphia, Saunders, 1986, p.531.

TOLOSA, L.; PAREJA-IBARS, E.; DONATO, M. T.; CORTES, M.; LOPEZ, S.; JIMENEZ, N.; MIR, J.; CASTELL, J., V; GOMEZ-LECHON, M. J. Neonatal livers: a source of goodperforming hepatocytes for cell transplantation. **Cell Transplante**, v. 23, n. 10, p. 1229-1242, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3727/096368913X669743>>

TORRES, F. C. Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco 2009. Tese (doutorado): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2009.

VESTENTOFT, P. S.; JELNES, P.; HOPKINSON, B. M., VAINER, B.; MOLLGARD, K.; QUISTORFF, B.; BISGOARD, H. C.. Three-dimensional reconstructions of intrahepatic bile duct tubulogenesis in human liver. *BMC Dev Biol.*; v. 11, p. 56, 2011.

YOSHIOKA, K.; ENAGA, S.; TANIGUCHI, K.; FUKUSHIMA, U.; UECHI, M.; MUTOH, K. Morphological characterization of ductal reactions in canine liver disease. *J Comp Pathol*, v. 130 , n. 2-3, p. 92-98, 2004.

WANG, J.; CLARK, J. B.; RHEE, G. S.; FAIR, J. H.; REID, L. M.; GERBER, D. A. Proliferation and hepatic differentiation of adult-derived progenitor cells. *Cells Tissues Organs*, v. 173, p. 193-203, 2003.

WARREN, A.; CENTER, S.; MCDONOUGH, S.; CHIOTTI, R.; GOLDSTEIN, R.; MESECK, E.; JACOBSEN, M.; ROWLAND, P.; SIMPSON, K. Histopathologic features, immunophenotyping, clonality, and eubacterial fluorescence in situ hybridization in cats with lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *Vet Pathol*, v. 48 , n. 3, p. 627-641, 2011.

WENT, P. T.; LUGLI, A.; MEIER, S.; BUNDI, M.; MIRLACHER, M.; SAUTER, G.; DIRNHOFER, S. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*, v. 35, p. 122–128, 2004.

ZAGO, M. A. Terapia com células tronco: fundamentos, oportunidades e obstáculos. *Revista da sociedade brasileira de hipertensão*, v. 8, n. 4, p. 145-150, 2005.

ZARET, K. S. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *National Reviews Genetic*, v. 3, p. 499-512, 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrg837>>.

ZHANG, Y.; BAI, X. F.; HUANG, C. X. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol*, v. 9, p. 201-204, 2003.

ZHANG, Z. G.; LI, X. B.; GAO, L.; LIU, G. W.; KONG, T.; LI, Y. F.; WANG, H.;ZHANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, R., Na updated method for the isolation and culture of primary calf hepatocytes. **The Veterinary Journal**, v. 191, n. 3, p. 323-326, 2012.

## Capítulo II

Artigo será submetido para a revista *Reproduction in Domestic Animals*, estando nas normas desta revista.

## **CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULA PROGENITORA HEPÁTICA NO CULTIVO CELULAR DE FÍGADO DE FETO CANINO**

### Resumo

Com a descoberta das células-tronco abriu-se um leque de possibilidades nas pesquisas de nichos em diferentes órgãos e também no estudo de doenças e regeneração tecidual. O fígado é alvo de muitos estudos visto que as doenças crônicas deste órgão tem como resolução o transplante. O fígado é composto, principalmente, por hepatócitos, no entanto, seu cultivo e manutenção *in vitro* são difíceis. Assim, uma alternativa é a manutenção das células progenitoras hepáticas. São conhecidas em camundongos, humanos, mas, pouco mencionadas em cães. Esse trabalho objetivou mostrar a existência das células progenitoras hepáticas no cultivo celular de fígado fetal de cães por imunofenotipagem pelos anticorpos de superfície celular EpCAM e NCAM a fim de saber se este nicho celular existe no cultivo e se é possível num futuro próximo a separação desta linhagem nesta espécie. Foram utilizados para a realização do trabalho 7 fetos caninos. Foi realizado no trabalho: isolamento, cultivo de células hepáticas, criopreservação, curva de crescimento celular, imunocitoquímica e citometria de fluxo. A cultura celular durou sete passagens, com dobramento populacional de 31,7 horas, na imunocitoquímica as células foram marcadas positivamente para os seguintes marcadores: EpCAM, NCAM, Nestina e Thy-1. Na citometria de fluxo foi possível realizar a dupla marcação das células com os marcadores EpCam e NCAM que resultaram em 0,5%  $\pm 0,173$  de células duplo marcadas do total de células analisadas.

Palavras chave: EpCAM, NCAM, célula-tronco hepática; cão

## 1. Introdução

O conceito de uma hierarquia celular, de maneira que uma se diferencia nas demais dentro de uma linhagem celular, surgiu pela primeira vez na década de 60 com os experimentos de McCulloch e Till, em 1961. Neste trabalho pioneiro eles identificaram a primeira população de células-tronco na medula óssea de camundongos adultos.

Todas as células-tronco possuem três características principais que as diferenciam dos outros tipos celulares. São indiferenciadas e não especializadas e são capazes de se dividir e se autorrenovarem indefinidamente. Ainda, possuem capacidade de se direcionar para a diferenciação em células especializadas quando submetidas a certas condições específicas ambientais, fisiológicas ou experimentais (Silva Júnior et al., 2009; Valentini et al., 2010).

As células-tronco são divididas em duas categorias: embrionárias e adultas. A vantagem da célula-tronco adulta é o fato de ser autogênica e da embrionária é a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares (Chen et al., 2012; Rai et al., 2014). O feto e os tecidos fetais apresentam-se como uma potencial fonte para os transplantes celulares, pois possuem menor risco de contaminação viral e/ou bacteriana quando comparado aos tecidos adultos, por residirem em um ambiente imunoprivilegiado dentro do útero. Além disso, a maioria das células fetais prolifera mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células adultas (Bruder et al. 1997, Abdulrazzak et al. 2010). As células-tronco fetais podem ser isoladas a partir de vários tecidos como o sangue fetal e a medula óssea, assim como de outros tecidos fetais incluindo fígado e rim (O'Donoghue e Fisk, 2004).

O fígado ganhou destaque nas pesquisas com célula-tronco pela sua alta capacidade proliferativa e regenerativa através de células hepáticas (Fausto, 1994). A capacidade proliferativa do fígado adulto e do tecido epitelial biliar é observada após a hepatectomia em



ratos e camundongo, na qual se retirou dois terços do fígado e o órgão se regenerou totalmente (Fausto et al., 2012; Russo et al., 2011).

O transplante de hepatócito maturo ou de hepatócitos de neonatos são considerados candidatos potenciais para o implante celular. Porém, a baixa viabilidade de órgãos humanos para isolar hepatócitos maduros e a dificuldade de expandir *in vitro* limitam seu uso (Tolosa et al., 2014).

Perante as dificuldades do uso de hepatócitos maduros existe a alternativa de cultivar células progenitoras hepáticas. No roedor, são denominadas células ovais, que se localizam na região porta ou áreas periportais e contribuem para regeneração do fígado (Zhang, et al., 2003; Haridass, et al., 2008). Estas células surgem no parênquima hepático, geralmente sob a forma de novos ductos e se diferenciam em hepatócitos e colangiócitos maduros para restaurar o fígado danificado. No entanto, a origem exata dessas progenitoras bipotentes ainda é incerta (Wang, et al, 2003; Coradeghini, et al, 2010).

As células-tronco progenitoras hepáticas em seres humanos encontram-se nas placas ductais dos fígados fetais e nos canais de Hering no fígado adulto. Podem ser isoladas utilizando a molécula de adesão da célula epitelial (EpCAM) como um marcador de células progenitoras hepáticas. As células positivas para EpCAM, quando classificadas por imunoseleção, constituem 0,5-2,5 % do parênquima hepático de doadores de todas as idades. O transplante de células EpCAM positivas ou células tronco progenitoras hepáticas é uma alternativa para terapias com célula-tronco no fígado (Rao et al., 2008). Schmelzer et al. (2007) afirmaram em seu trabalho que as células progenitoras hepáticas humanas podem ser isoladas eficientemente por condições de imunoseleção utilizando apenas os marcadores EpCAM (CD326) e/ou NCAM (CD 56).

Vestenoft et al. (2011) mostraram que no fígado fetal humano com idade gestacional de 15 semanas houve marcação positiva para Nestina na área porta em células mesenquimais hepáticas, nas células epiteliais das vias biliares e células endoteliais arteriais.

Gridelli et al. (2012) provaram por citometria de fluxo que logo após o isolamento das células hepáticas em humanos há uma expressiva marcação associada a células mesenquimais sendo que 1,5%-2% destas são positivas para Thy -1 (CD90).

A literatura tem como enfoque as células-tronco progenitora hepática em camundongo, rato e homem, porém, pouca publicação em canino e menos ainda em felinos (Yoshioka et al., 2004 ; Warren, et al., 2011). Pelo fato do cão doméstico, apresentar homologia de 75% do DNA com o ser humano (Klug, 2010), é considerado bom modelo para o estudo de afecções humanas .

O objetivo deste trabalho foi cultivar, expandir e criopreservar células hepáticas de fetos caninos e por imunofenotipagem constatar a presença de células progenitoras hepáticas.

## **2. Materiais e métodos:**

### *2.1 Meios e reagentes*

Todos os meios de cultivo utilizados e reagentes são da *Thermo Fisher Scientific*. Todo material descartável foi de alta qualidade e estéril, das marcas *Corning* e *Nunc*, exceto quando indicado.

O estudo foi conduzido de acordo com as recomendações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) institucional, sob o protocolo número 009131/14.

## 2.2 Obtenção dos fetos

Foram utilizados 7 fetos de três doadoras caninas, sem raça definida para a obtenção do cultivo celular, criopreservação celular, imunofenotipagem e curva de crescimento. Os fetos foram retirados da placenta, lavados com álcool 70% e secos com compressa estéril. No fluxo laminar os animais foram medidos com paquímetro entre a base do occipital até a primeira vértebra sacral a fim de estimar a idade gestacional (*crow rump*)(Evans e Sock, 1973).

## 2.3 Cultura primária de células hepática

O meio de cultivo utilizado foi composto por 50% de meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) alta glicose e 50 % F12 Nutrient Mixture (Ham) , suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 5 µg/mL de insulina transferrina selenito de sódio (ITS) (Sigma-Aldrich N° Cat.I-1884), 0,2% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrichi Cat.A8806-5G), 1% de amicacina e 10% de soro fetal bovino (SFB).

Após a mensuração e lavagem os fetos foram depositados em placas de vidro estéril e o fígado foi exposto por uma incisão na linha média. O órgão foi então seccionado, retirando-se um fragmento na região da entrada da veia porta e dos grandes vasos. A amostra foi fracionada mecanicamente com o auxílio de um bisturi, até a obtenção de um homogeneizado, o qual foi lavado em solução de tampão fosfato salina (PBS) inicialmente e posteriormente em solução de PBS livre de cálcio e magnésio, até a obtenção de um sobrenadante visivelmente límpido.

Posteriormente, o material foi colocado em solução de colagenase tipo IV para digestão enzimática por 35 minutos. Na sequência o material foi passado em tamis e o filtrado foi centrifugado a 170 x g por 7 minutos. O sedimento foi ressuspensionado no meio de cultivo

anteriormente descrito e depositado em garrafas com ventilador de 25cm<sup>2</sup> cada garrafa foi do fígado de um único feto.

A primeira troca de meio foi realizada 24 horas após as células terem sido colocadas em cultivo. As demais trocas foram feitas a cada 48 horas, sendo que o meio de cultivo era renovado totalmente. Quando as células do cultivo atingiam confluência de 80% em média, estas eram repassadas e ou criopreservadas.

#### *2.4 Passagem celular*

Os cultivos celulares com 80% de confluência foram lavados três vezes com PBS livre de cálcio e magnésio. Em seguida, acrescentou-se tripsina a 0,25% e incubou-se em estufa, sempre observando no microscópio invertido a soltura das células do fundo da garrafa de cultivo. Quando as células estavam suspensas, a tripsina foi neutralizada com meio de cultivo. O conteúdo foi transferido para um tubo Falcon de 15mL e centrifugado a 170 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi removido e as células sedimentadas ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultivo. Então, fez-se a contagem para a criopreservação e /ou manutenção do cultivo.

#### *2.5 Contagem celular*

A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. Foram contados os quatro quadrantes laterais e calculada a média destes. A média foi multiplicada pelo fator de diluição e por 10.000; o resultado foi dado em células por mL.

## 2.6 Curva de crescimento celular

Essa análise foi realizada em triplicata nas células de terceira passagem, que foram cultivadas em placas de 35mm na densidade de  $57 \times 10^3$  células por placa, totalizando 15 placas. Após 48 horas, três placas aleatórias foram repicadas e as células foram contadas na câmara de Neubauer, procedimento que foi realizado também após 72, 96, 120 e 144 horas. Para a contagem das células, o meio foi retirado e 1 mL de TrypLE™ Express foi adicionado e as células incubadas por 40 minutos a 37°C. As suspensões celulares foram centrifugadas por 7 minutos a 700 x g e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo. O número de células em cada placa foi somado e dividido por três, obtendo-se uma média aritmética para cada período de tempo, foi utilizado o cultivo de um feto e, os valores obtidos foram anotados e demonstrados graficamente.

Com o propósito de saber o tempo de dobramento do número de células no cultivo celular, utilizando os dados obtidos na curva de crescimento, aplicou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Grupo de dobramento} = \text{período} * \log(2) / \log(C_f) - \log(C_i)$$

$C_f$  é dado pela concentração final das células e  $C_i$  pela concentração inicial de células (Roth, 2006). Para a população do cultivo em questão foi utilizado o período de 48 a 96 horas devido a inclinação da curva, sendo possível calcular o tempo de dobramento populacional no período em que as células se encontravam em crescimento exponencial (fase log).

## 2.7 Criopreservação celular

Para a criopreservação as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio de congelação, composto por 45% de meio contendo 50% DMEM alta glicose, 50% de HAM F12 suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de amicacina, 45% de SFB e 10% de dimetil sulfoxido (DMSO) (SIGMA- ALDRICHI N° Cat. D2650). Após a contagem,

as células foram alicotadas em criotubos de capacidade de 1,5 mL para congelação. O número de células acondicionadas em cada criotubo variou conforme a quantidade que se encontrava no cultivo, sempre colocando no mínimo 250.000 células.

A congelação foi realizada pelo método lento, no qual as células permaneceram por 2h a 4°C, 2h a -18°C, 10min em nuvem de nitrogênio e em seguida mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos a -196°C por tempo indeterminado.

A descongelação realizada era em banho-Maria a 36°C com observação da amostra até se tornar líquida. Então, o conteúdo do criotubo foi acrescido de meio de cultivo e centrifugado a 170 x g, durante sete minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em meio de cultivo. O conteúdo foi depositado em garrafa de cultivo celular e incubado em estufa.

## 2.8 *Imunocitoquímica*

Células de terceira passagem foram colocadas em cultivo em placas de 4 poços de 1,9 cm<sup>2</sup>. O cultivo foi mantido até que a quantidade de células não fosse muito elevada, uma confluência de, aproximadamente, 70%. Então, foi colocado paraformaldeído a 4% para fixar as células por 10 minutos, foi retirado e adicionou-se PBS até iniciar o protocolo com os anticorpos.

Para a marcação com os anticorpos foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada com PBS e 0,1% tween 20, seguida de permeabilização com Triton X a 1% por vinte minutos. Realizou-se novamente a lavagem com PBS, 0,1% tween 20 e 0,1% de BSA, por três vezes de 5 minutos cada, seguida de bloqueio com 1% de BSA por 1 hora, afim de evitar reações inespecíficas. E nova lavagem com PBS, 0,1% tween 20 e 0,1% de BSA. Então, acrescentou-se o anticorpo primário e manteve-se a 4°C *overnight*. Os anticorpos primários utilizados foram EpCAM (Santa Cruz 23788) e NCAM (Santa Cruz 10735) ambos na diluição 1:50, e o

anticorpo Thy-1 (Santa Cruz, Cat.SC 6071) e Nestina (SIGMA- ALDRICHI Cat. N 5413). Todos foram utilizados na diluição 1:100 sendo a solução de lavagem, PBS, 0,1% tween 20 e 0,1% de BSA, o diluente.

Foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS, 0,1% tween 20 e 0,1% de BSA , acondicionou-se o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (ThermoFischer Scientific A11034) nos poços dos anticorpos NCAM e Nestina . E nos poços do EpCAM e do Thy-1 empregou o anticorpo secundário anti-caprino (ThermoFischer Scientific A11078). Foi realizado um poço controle para cada anticorpo secundário citado acima, estes foram utilizados na diluição de 1:300, sendo a solução de lavagem o diluente, a incubação deles foi de 2 horas.

Após este período, foi realizada 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS, 0,1% tween 20 e 0,1% de BSA acrescentou-se ProLong® (ThermoFischer Scientific Cat. P36962) na placa (contém o marcador de núcleo Dapi) e foi mantido por 3 minutos. Foi realizado o mesmo procedimento de lavagem citado acima com a mesma solução e adicionou-se PBS para visualização em microscópio invertido de fluorescência.

### *2.9 Citometria de Fluxo*

Foram descongelados três criotubos correspondente a três fetos diferentes e as células foram cultivadas em três garrafas distintas até atingirem confluência próxima de 100%. Uma passagem celular foi realizada com 0,2% de Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt dihydrate (EDTA), para a soltura das células, (Sigma-Aldrich Cat. E6511) em PBS livre de cálcio e magnésio. Nas células em suspensão foi executado o protocolo de dupla marcação celular com EpCAM e NCAM para passagem no citômetro de fluxo BD FACSCanto II<sup>TM</sup> com Software FACSDiva Version 6.1.3.

Para primeira marcação centrifugou o EDTA com o PBS a 170 x g por 7 minutos e ressuspendeu-se as células em 0,1% de Tween 20 em PBS livre de cálcio e magnésio fez-se uma nova centrifugação nos moldes da anterior. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas em 1% de BSA em PBS livre de cálcio e magnésio, por uma hora. Após nova centrifugação, a 170 x g por 7 minutos, e descarte do sobrenadante, fez-se a incubação do primeiro anticorpo primário, NCAM (Santa Cruz 10735), na diluição 1:50, sendo o diluente 0,1% de Tween 20 em PBS livre de cálcio e magnésio, por uma hora a temperatura ambiente.

Decorrido o tempo adicionou-se solução de lavagem, PBS livre de cálcio e Magnésio acrescido de 0,1% de Tween 20 e 0,1% de BSA. Centrifugou-se, descartou o sobrenadante e incubou o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-coelho na diluição de 1:300, sendo o anticorpo diluído na solução de lavagem, por uma hora. Adicionou-se solução de lavagem, centrifugou, e em seguida, incubou o segundo anticorpo primário, EpCAM (Santa Cruz 23788), na diluição 1:50, por uma hora. Novamente adicionou-se solução de lavagem e centrifugou então, incubou-se o anticorpo secundário Alexa Fluor 680 anti-caprino, por uma hora. Fez-se a ultima adição de solução de lavagem e centrifugou, fixou as células com formaldeído 4% por 10 minutos, fez-se uma centrifugação para retirar o mesmo e colocou as células em PBS livre de cálcio e magnésio para a leitura no citômetro de fluxo.

Os dados da dupla marcação EpCam e NCAM obtidos pela citometria de fluxo foram demonstrados por estatística descritiva básica obtendo os valores médios e desvio padrão das variáveis.



### 3. Resultados

Os 7 fetos obtidos das três gestações tinham em média 63, 66 e 109 mm de comprimento. De acordo com a mensuração os comprimentos de 63 e 66 mm correspondem à idade gestacional entre 42 e 45 dias e o de 109 de aproximadamente 51 dias (Fig. 1).



Fig. 1 - Fetos oriundos das três gestações caninas durante a mensuração com paquímetro para calculo da idade gestacional pelo método Crow Rump em A- 42 dias de gestação; B- 45 dias de gestação e C- 51 dias de gestação (fonte arquivo pessoal)

Foi possível realizar o cultivo celular de células hepáticas fetais, contudo após o isolamento, o cultivo apresentou-se com muito sangue não sendo possível a visualização do tapete celular. Após a troca de meio com 24 horas de isolamento, as células podiam ser visualizadas.

Com 24 horas de cultivo, as células se apresentaram com formato mais arredondado e foram se alongando com o decorrer do cultivo. Foram observados 2 tipos de população de célula, células alongadas e células arredondadas (Fig.2).

Aproximadamente 80% de confluência celular foi observada aos 6 dias de cultivo. O cultivo foi mantido até a 7ª passagem posteriormente não foi observada confluência.

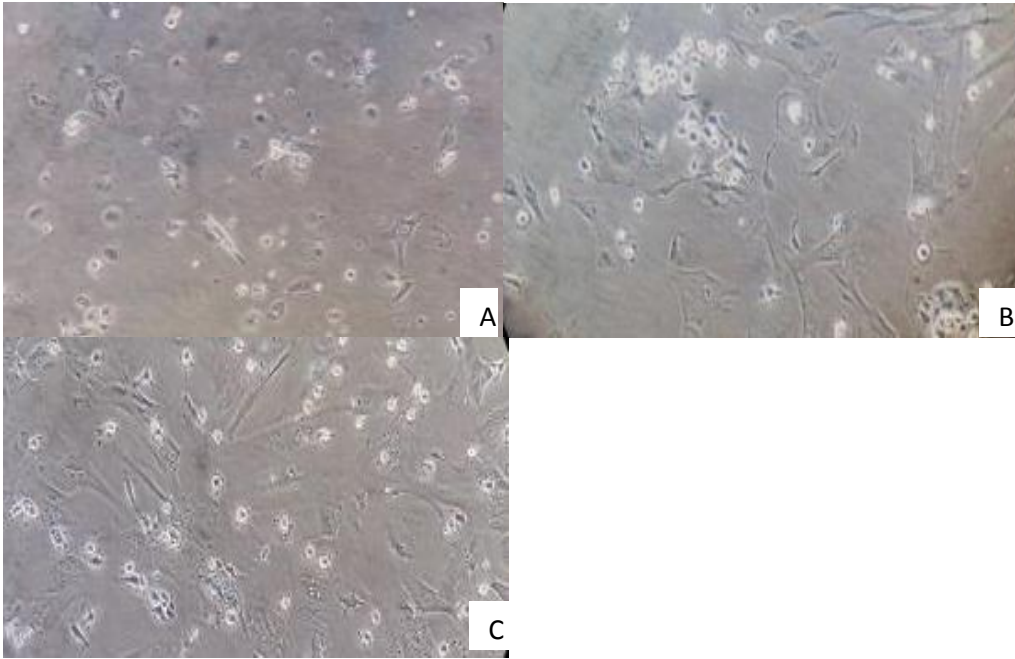


Fig. 2 – Fotomicrografia em microscópio invertido Nikon TMS do cultivo celular. A- cultivo com 24 horas; B - cultivo com 72 horas e C - cultivo com 120 horas (Aumento de 200x).

Curva de crescimento:

As células apresentaram um crescimento exponencial com fase log nas primeiras 96 horas de cultivo. Entre 96 e 120 horas houve uma queda de crescimento e de 120 para 144 horas houve um crescimento maior que entre 96 e 120 horas, porém menor que nas primeiras 96 horas (Fig.3).

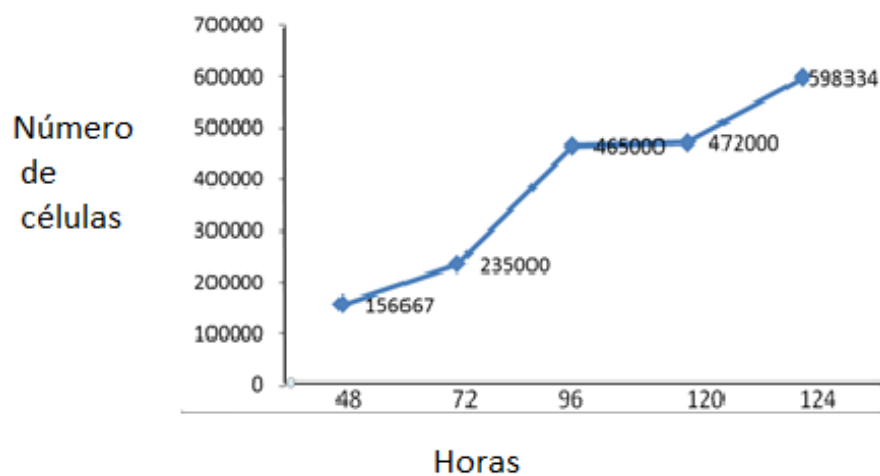


Fig. 3- Curva de crescimento celular realizada com a média das triplicatas do cultivo celular de um feto.

### Tempo de dobramento populacional

O tempo de dobramento do cultivo celular utilizando o período de 96 horas, por se tratar da fase log, maior crescimento foi de 31,7 horas.

### Criopreservação

Foi praticável a criopreservação, as células do cultivo de fígado de fetos caninos cresciam normalmente após a descongelação. As células que foram realizadas a imunocitoquímica e a citometria de fluxo haviam sido criopreservadas anteriormente aos procedimentos.

### Imunocitoquímica

Na imunocitoquímica as células cultivadas foram marcadas positivamente para os anticorpos EpCAM, NCAM, Thy-1 e Nestina. Foi feito um poço de célula para cada um dos anticorpos secundários utilizados como controle (Fig. 4 e 5).

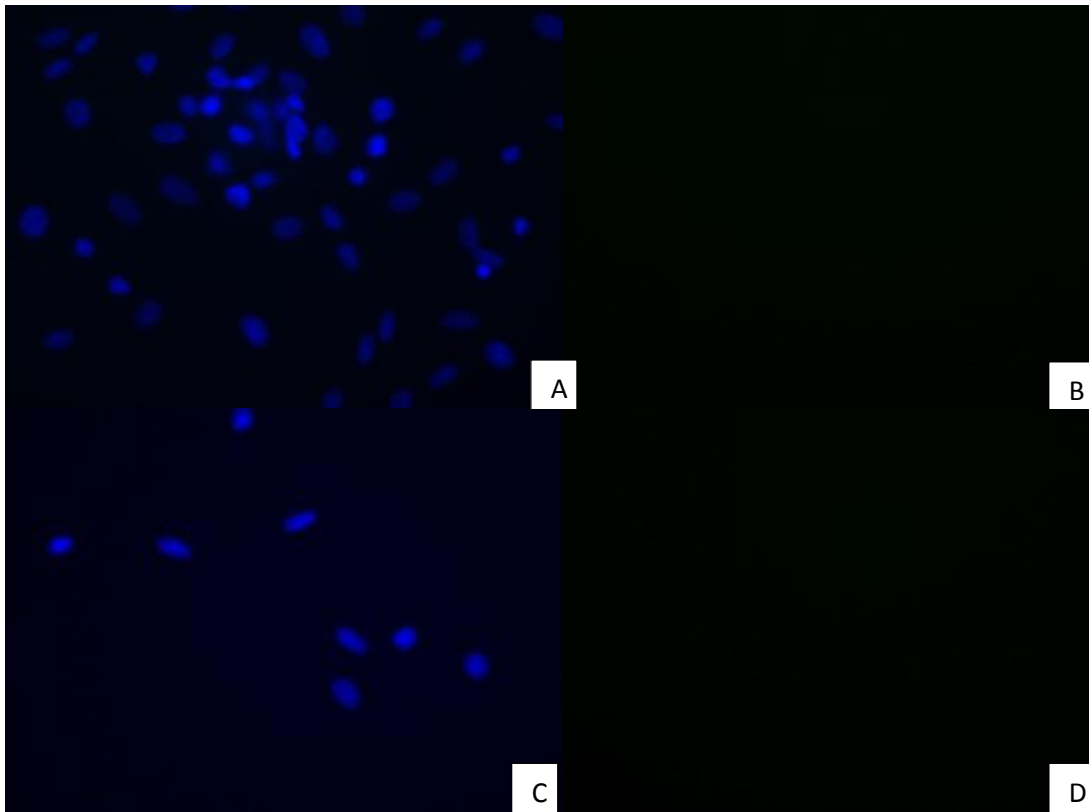


Fig. 4- Fotomicrografia de cultivo de células do fígado de fetos caninos obtidas em microscópio invertido de fluorescência Olympus IX70. Controle de anticorpos secundários. A- células marcadas pelo Dapi; B- anticorpo anti-caprino; C- Células marcadas pelo Dapi e D- Anticorpo anti-coelho, (Aumento de 200x).

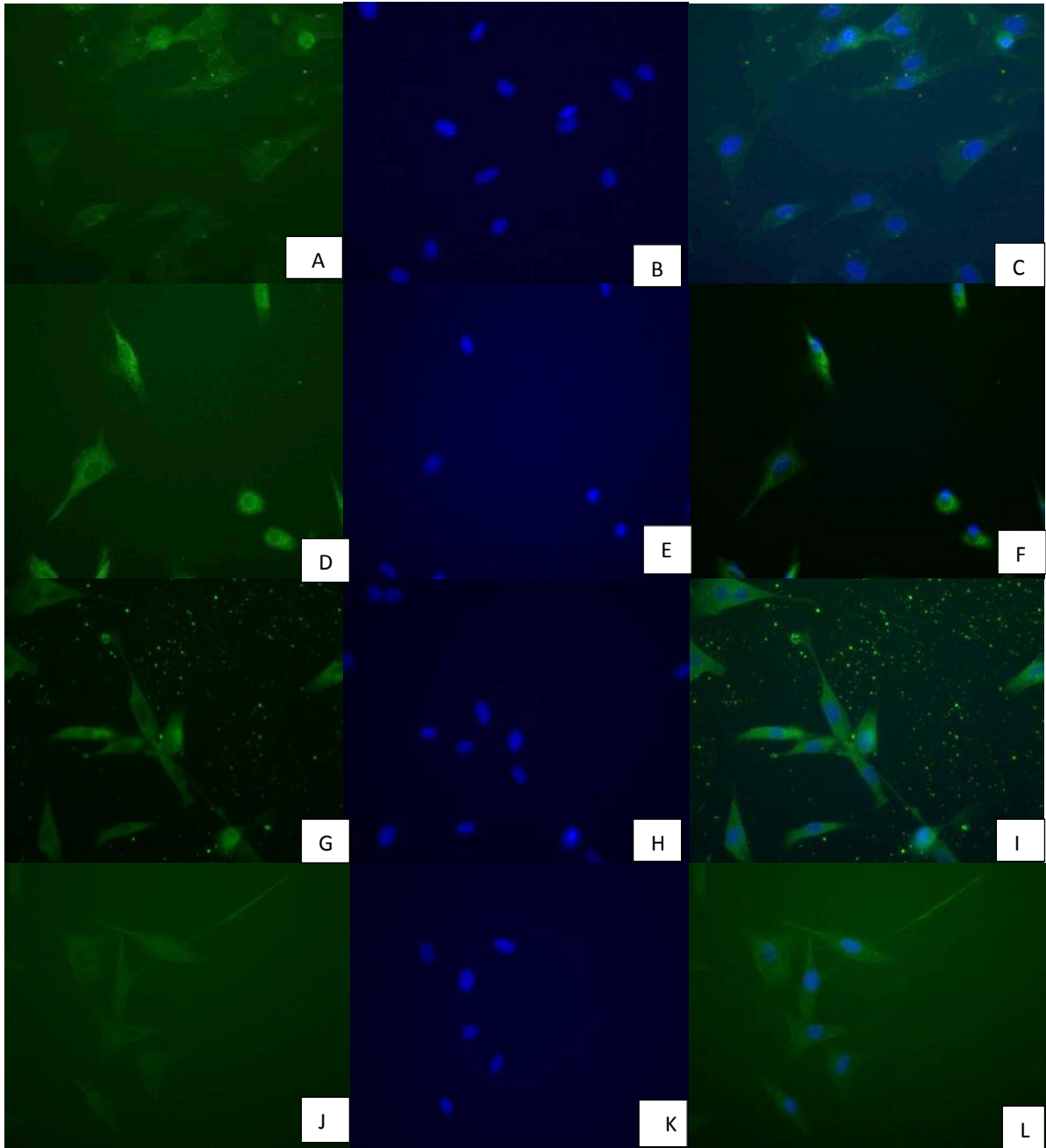


Fig.5 – Fotomicrografia de cultivo celular do fígado de fetos caninos após imunocitoquímica obtidas em microscópio invertido de fluorescência Olympus IX70 A- Marcação EpCAM, B- Dapi e C- Sobreposição Dapi e EpCAM (Merge); D - Marcação NCAM, E - Dapi, F- Sobreposição Dapi e NCAM (Merge); G- Marcação Thy-1, H- Dapi, I- Sobreposição Thy-1 e Dapi (Merge); J- Marcação Nestina, K - Dapi e L Sobreposição Nestina e Dapi (Merge), (aumento de 200x).

## Citometria de Fluxo

As análises dos marcadores de superfície celular do cultivo de fígado de feto canino, por citômetro de fluxo, indicaram as seguintes médias e desvios padrão, para dupla marcação com EpCAM e NCAM,  $3117,03 \pm 368,612$  células de interesse, destas  $0,5\% \pm 0,173$  tem dupla marcação (Fig. 6)

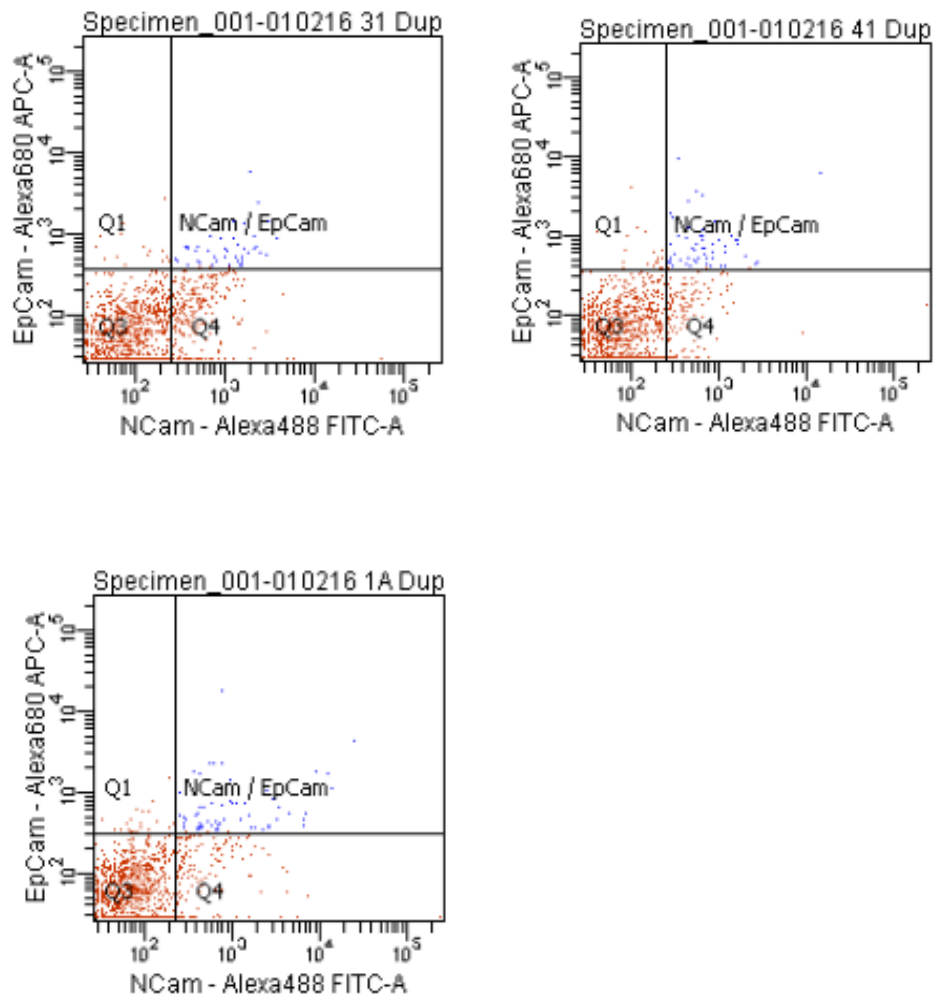


Fig. 6 - Representação gráfica da quantificação das células com dupla marcação (EpCAM / NCAM) do cultivo celular de células hepáticas de três fetos caninos.

#### 4. Discussão

No presente experimento foi possível a realização do cultivo celular de células hepáticas de fetos caninos com idades gestacionais entre 40/45 e 51 dias. E foi conseguido 7 passagens celulares com um meio de cultivo menos elaborado que o Kubota. Este quando utilizado em suspensões de células de rato otimiza a expansão das células progenitoras hepáticas em cultura, sendo o Kubota um meio livre de soro, composto por RPMI 1160 com baixo cobre e cálcio suplementado com zinco, selênio, insulina, transferrina e fatores de crescimento, (Kubota e Reid, 2000).

Foi conseguido um tempo de dobramento populacional de 31,7 horas o que corroborou com Shemelzer et al.(2007) que conseguiram um tempo de dobramento populacional de 36 - 48 horas.

A criopreservação celular foi eficiente, pois, as células cresciam normalmente pós-descongelamento e mantiveram as características das células progenitoras hepáticas já que ocorreu a marcação do EpCAM e NCAM tanto na imunocitoquímica quanto na citometria de fluxo sendo que para ambos os testes foi-se utilizadas células criopreservadas.

Por marcador celular na imucitoquímica foi possível a marcação positiva para EpCAM, NCAM, Nestina e Thy-1. Por não se tratar de um cultivo puro, com apenas um tipo celular, esperava-se marcações diferentes de EpCAM e NCAM que são marcadores específicos para imunoseleção de células progenitoras hepáticas fetais (Semeraro et al., 2013).

Verificou-se a marcação positiva para nestina devido à presença de células dos ductos biliares e endoteliais dos vasos sanguíneos que compõem o fígado (Vestentoft, 2011), por conseguinte, como o cultivo foi realizado de uma fração do órgão ocorre o crescimento de

tipos celulares de todos os tecidos que o formam. E Wesceslau, (2010) mostrou em seu trabalho marcação positiva para nestina em cultura celular de fígado de feto de cão.

O marcador celular Thy-1/CD 90 apresentou resultado positivo na imunocitoquímica sua marcação era esperada pelo cultivo celular não ter passado por imunoseleção com separação celular previamente, purificando a cultura. . Gridelli et al., (2012), mostraram por citometria de fluxo que logo após o isolamento das células hepáticas em humanos há uma expressiva marcação associada a células mesenquimais sendo que 1,5% a 2% são positivamente marcadas para Thy -1. Entretanto, os mesmos autores comprovaram que  $1\% \pm 1,3\%$  são duplo positivas para CD90 e albumina. Células progenitoras hepáticas humanas são positivas para albumina (Shemelzer et al., 2007; Wauthier, et al., 2008).

Como na imunocitoquímica foi possível identificar a presença de células positivas para EpCAM e NCAM fez-se a dupla marcação no citometro de fluxo. Esta foi necessária, pois, Tanaka et al. (2009) mostraram que a marcação de EpCAM em fígado murino é transitória para os hepatoblastos durante a hepatogênese, sendo o hepatócito negativo. Assim, pelo estudo se tratar de feto ocorre a marcação positiva para EpCAM nos hepatoblasto e o mesmo não é o alvo de interesse e sim as células progenitoras hepáticas que imunoselecionadas pela dupla marcação com EpCAM e NCAM.

No fígado fetal humano a marcação de células EpCAM logo após o isolamento é cerca de 12% (Schemelzer et al, 2007; Schemelzer et al., 2006; Wauthier et al., 2008) porém estas são classificadas em duas populações uma composta de 10.8% de hepatoblasto, marcadas positivamente com  $\alpha$ -fetoproteína, albumina, CK-19 e ICAM e a outra de 1.2 % de células progenitoras hepáticas positivas para CK-19, CD133, NCAM e claudina (Wauthier, et al., 2008). A marcação de células positivas duplo marcadas EpCAM , NCAM na citometria foi em média de  $0,5\% \pm 0,173$ , menor que 1.2% referido por Wauthier et al. (2008). Isto pode



ter ocorrido devido o cultivo celular analisado no citômetro ser de terceira passagem e não imediatamente ao isolamento.

Assim, pelos resultados alcançados conclui-se que no cultivo celular de células hepáticas de fetos caninos há a presença de células progenitoras hepáticas EpCAM/NCAM positivas realizando o cultivo nos métodos descritos acima. Novos ensaios terão que ser realizados a fim de avaliar a viabilidade das células progenitoras hepáticas caninas como possíveis fontes para implantes celulares colaborando para a cura de alterações comumente observadas na rotina de medicina canina e humana.

#### Agradecimentos

Agradecemos a todos os envolvidos por sua ajuda com este projeto.

#### Conflito de interesse

Nenhum dos autores tem qualquer conflito de interesse a declarar.

#### 5. Referências:

Abdulrazzak H. et al. 2010: Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *J. Royal Soc.* 7, 689-706.

Bruder S.P. et al. 1997: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell Biochem.* 64, 278-294.

Chen F. M., Sun H. H., Lu H., Yu Q. 2012: Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33, 6320-6344.

Coradeghini R., Guida C., Scanarotti C., Sanguineti R., Bassi A.M., Parodi A., Santi P.L., et al. 2010: A comparative study of proliferation and hepatic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs*, 191, 466-477.

Dominici, et al., 2006: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4, 315-317.

- Evans, H. E.; Sock, W. O. 1973: Prenatal development of domestic and laboratory mammals: Growth curves, external features and selected references. *Zentralbl Veterinarmed C.*, v.2, n.1, 11-45.
- Fausto, N., Liver stem cells.1994:*The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, In: Arias, I.M. (Ed.), New York, p. 1501-1518.
- Fausto N., Campbell J.S., Riehle K.J. 2012: Liver regeneration. *J. Hepatology* 57, 692-694.
- Gridelli B., Vizzini G., Pietrosi G., et al. 2012: Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation. *Liver Transpl.* 18, 226-237.
- Haridass, D.; Narain, N.; OTT, M. 2008 : Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. *Current opinion in organ transplantation*, v. 13, n. 6, p. 627-632.
- Hytel, P.; Sinowatz, F.; Vejlsted, M. 2010: *Essentials of Domestic Animal Embryology*. Betteridg, Toronto, pp.336.
- Jesus, R. P., Waitzenberg, D. L., et al. 2000: Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass Méd Brasil.*, v.46, n.3, 242-254.
- Klug, W. S. 2010: *Conceitos de genética*, 9. Ed., Artmed Porto Alegre, p.548.
- Konig H.E. ; Liebich H.G. 2004: *Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido*. Artmed, Porto Alegre, pp. 400.
- Kubota , H., and L.M. Reid . 2000. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 12132 –12137.
- Mc Culloch, E. A.,Till,J. E.1960:The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice.*Radiat. Res.*13,115–125. (doi:10.2307/3570877)
- O'Donoghue K.; Fisk N.M. 2004: Fetal stem cells. *Brit. J. Obstetr. Gynaecol* 18, 853-875.
- Rai S., Kaur M., Kaur S. 2014: Applications of Stem Cells in Interdisciplinary. *Dentistry and Beyond: An Overview. Annals of Medical and Health Sciences Research*, 3, 2.
- Rao, M. S.; Khan, A. A.; Parveen, N.; Habeeb, M. A.; Habibullah, C. M.; Pande, G. 2008 : Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. *World J. Gastroenterol.*, 14, 5730-5737.
- Roth V. 2006: Doubling Time Computing, Available from: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
- Russo F.P., Parola M. 2011: Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair. *Cytotherapy*. 13, 135-44.
- Schmelzer, E., Wauthier, E., & Reid, L. M. 2006: The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells*, 24, 8, 1852-1858.

Schmelzer et al., 2007: Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donor, *J Exp Med*, 204, 1973–1987.

Semeraro, R., Cardinale, V., Carpino, G., Gentile, R., Napoli, C., Venere, R., Alvaro, D. (2013). The fetal liver as cell source for the regenerative medicine of liver and pancreas. *Annals of Translational Medicine*, 1, 2, 13. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2012.10.02>

Silva Junior, F. C. et al. 2009: Células-tronco hematopoiéticas: utilidades e perspectivas. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 31, 53-58.

Starzl, et al., 1961: Studies on the rejection of the transplanted homologous dog liver. *Surg Gynecol Obstet.*; 112, 135-44.

Tanaka M., Okabe M., Suzuki K., Kamiya Y., Tsukahara Y., Saito S., Miyajima A. 2009: Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech Dev* 126, 665–676.

Till, J. E., McCulloch, E. A. 1961: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* 14, 213–222. ([doi:10.2307/3570892](https://doi.org/10.2307/3570892))

Tolosa, L., Pareja-Ibars, E., Donato, M. T., Cortes, M., Lopez, S., Jimenez, N., Mir, J., Castell, J. V. and Gomez-Lechon, M. J. 2014: Neonatal livers: a source of good performing hepatocytes for cell transplantation. *Cell Transplant*, 23, 10, 1229-1242. DOI: 10.3727/096368913X669743

Valentini, L.; Uranio, M. F.; Consiglio, A. L.; Guaricci, A. C.; Caira, M.; Ventura, M.; L'Abbate, M.; Cremonesi, F.; Dell'aquila, M. E. 2010: Isolation, proliferation, and characterization of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix in the dog. *Reproduction, fertility and Development*, 23(1), 252-253.

Vestentoft P.S., Jelnes P., Hopkinson B.M., et al. 2011: Three-dimensional reconstructions of intrahepatic bile duct tubulogenesis in human liver. *BMC Dev Biol.*; 11:56.

Zhang, Y., Bai X. F., Huang C.X. 2003: Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol*; 9, 201-204.

Yoshioka K. et al., 2004: Morphological characterization of ductal reactions in canine liver disease. *J Comp Pathol*, 130, 2-3, 92-98.

Wang J., Clark J. B., Rhee G. S., Fair J. H., Reid L. M., Gerber D. A. 2003: Proliferation and hepatic differentiation of adult-derived progenitor cells. *Cells Tissues Organs*; 173, 193-203.

Warren A. et al., 2011: Histopathologic features, immunophenotyping, clonality, and eubacterial fluorescence in situ hybridization in cats with lymphocytic cholangitis/cholangiohepatitis. *Vet Pathol*, 48, 3, 627-641.

Wauthier, E., Schmelzer, E., Turner, W., Zhang, L., LeCluyse, E., Ruiz, J., ... & Barbier, C. 2008: Hepatic stem cells and hepatoblasts: identification, isolation, and ex vivo maintenance. *Methods in cell biology*, 86, 137-225.

Wenceslau, C.V. 2010: Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 30-01-2016, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-05072010-155225/>

## *Author Guidelines*

### **1. General**

*Reproduction in Domestic Animals* is an international journal publishing original, significant articles on reproduction in domestic animals, laboratory animals, and wildlife, with particular attention to basic, applied and clinical research. Reproduction is considered in a broad context, with its strong disciplinary, comparative core. The journal therefore covers obstetrics, neonatology and udder health, and welcomes contributions in these areas. The scope of the journal applies to veterinarians, breeders, and biologists while also being of interest to practitioners of human medicine. Reproduction in Domestic Animals is the official organ of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), the European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), and the Spanish Society of Animal Reproduction (AERA).

We encourage the submission of topical results for publication as original papers, reviews (mini-reviews or critical feature articles), or short communications (including case reports and technical notes). Note that *Reproduction in Domestic Animals* only publishes well-written papers of high scientific quality and significance for the advancement of the field of reproduction, despite they being scientifically sound or properly executed or written. Feature articles or reviews should overview known information or tackle controversial issues in a particular area of the above-mentioned fields that comprise the scope of the journal, with the aim of founding future innovative research. Letters to the Editor, viewpoint articles and comments on published papers are also welcomed. Comments should be confined to the substance of the paper and the authors of the paper referred to will be offered the opportunity to respond. The journal publishes ONLINE-only preliminary communications of results that are of current and extreme interest. Authors interested in preparing a review, a feature article, or a viewpoint article, are invited to discuss the matter with the Editor-in-Chief. Such preliminary contact with the Editor-in-Chief is also advisable when Patent-related matters are included in any manuscript. All papers are subjected to a thorough peer-review by at least two ad-hoc peer referees. Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. The publication language is English.

Short communications will be subject to accelerated, but very strict refereeing. Short Communications are available online only under its respective volume and issue at [www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://www.wileyonlinelibrary.com/journal/rda). The quality of articles and the standards for publication remain the same whether papers are published both print and online, or online-only.

The publication language is English.

**English Language Editing Service:** Ensure your paper is clearly written in standard, scientific English language appropriate to your discipline. [Visit our site](#) to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

## 2. Manuscript submission

*The submission and review process of *Reproduction in Domestic Animals* is solely handled online at <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>. To submit an article to *Reproduction in Domestic Animals*, please go to <http://mc.manuscriptcentral.com/rda>, create an account and submit your article. Complete instructions on how to submit a paper are available online at the Journal website [wileyonlinelibrary.com/journal/rda](http://wileyonlinelibrary.com/journal/rda). Please note that it is compulsory to include all authors with their affiliation and valid email addresses.*

***Please see that the corresponding author's complete address and a valid email are also present in the manuscript.***

### 2.1. Licence to publish

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### **For authors signing the copyright transfer agreement**

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below

CTA Terms and Conditions [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreement (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html) and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Australian Science Fund (FWF) ] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

## 2.2. *Authorship* and *Acknowledgements*

**Authorship:** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

*Reproduction in Domestic Animals* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE, authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Upon submission of the manuscript, it is required that all authors be accredited as appropriate. During the online submission process, the corresponding author will be asked to submit a short description of each individual's contribution to the research and its publication. **Upon submission of a manuscript all co-authors must also be registered with correct e-mail addresses. If any of the e-mail addresses supplied are missing or incorrect, the manuscript shall not be processed pending contact with the corresponding author.**

**Acknowledgements:** Authors **must** acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research presented. Authors **must** acknowledge any assistance that they have received (e.g. provision of writing assistance, literature searching, data analysis, administrative support, supply of materials), describing if and how this assistance was funded and included with other funding information. The acknowledgements should be brief and not include thanks to anonymous referees and editors. Where scientists are acknowledged, a covering letter demonstrating their consent must be provided.

**Conflict of interest:** A subheading "Conflict of interest statement" **must** be placed at the end of the manuscript text (following acknowledgements), where all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately bias or influence their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, or direct or indirect funding.

**Funding sources:** All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should state this clearly.

**Use of non-commercially available instrumentation, substances, antibodies or assays:** When these had been kindly provided by any research group or company, an appropriate letter from them **MUST** be provided alongside the manuscript at submission (upload it as a well identified supplementary file).

### 3. Manuscript Requirements

#### 3.1. Format

The manuscript must be typed (Times, font 12) with double spacing *throughout* and with a margin of at least 3 cm on the left-hand side. Lines must be numbered in a consecutive manner starting on the first page, in the left-hand margin. All pages of the manuscript must also be numbered consecutively, including those containing references, tables, and captions to illustrations, all of which are to be placed after the text. Illustrations, both line drawings and photographs, are to be numbered as figures in a common sequence. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word),.doc; do not use automated or manual hyphenation.

On page one of the manuscript the official name of the institution, the place where the work was carried out, the title of the article, and the names of authors must be stated as follows: Town, Country (no mailing address); Title of Article; Name A, Name B, and Name C. The title should be concise and appropriately informative and should contain all keywords necessary to facilitate retrieval by modern search techniques. Additional keywords not already contained in the title or contents (abstract, summary) may be listed beneath the contents. An abridged title suitable for use as a running head at the top of the printed page and not exceeding 50 letters and spaces should also be supplied. Each original paper, review or short communication shall contain a short contents (abstract, summary), preferably less than 250 words. The contents should not just recapitulate the results but should state concisely the scope of the work and give the principal findings, avoiding acronyms and references. The contents shall be complete enough for direct use by abstracting services.

Original articles should be structured in the following order: Title, Contents, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgment and References. Placement of figures and tables should be indicated in the text. The experimental design should be described in sufficient detail (methods, analyses, statistics, breeds, origin, and management of animals etc.) to allow for repetition of the experiments.

If the paper is one of a numbered series, a reference to the previous part should be given as a footnote on the first page. If a part not yet published needs to be consulted for a proper understanding of the paper, an electronic copy of that manuscript should be supplied to assist the referees. The corresponding author postal and a functional e-mail address must appear at the end of the paper. Sets of identical data should not be given in tables and figures. Figures and tables should be accompanied by a legend.

The manuscript comprises a printout of the text, figures, tables, and a list of all figures and tables with their captions and titles on a separate piece of paper. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all



figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Please do not import the figures into the text file.

### *3.2. Length*

Original papers and review articles, including figures, tables and references, should not exceed 5,000 words. Short Communications (case reports and technical notes), should not exceed 1,800 words, including figures, tables and references. The number of figures and tables should be kept to a minimum. Extended data sets can be published online as supplementary material and should be identified as such.

### *3.3. Units, abbreviations and nomenclature*

All specifications must be stated according to the S.I. System. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). All products implemented are to be mentioned with the manufacturer's name and delivery address which should appear in a footnote on the same page.

Any abbreviations of chemical, biological, medical, or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical, or other terms should be used according to the most recent recommendations of respective international nomenclature. Enzymes should be given according to the Enzyme Nomenclature (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote, when they are first mentioned in the text. Products (preparations etc.) with a **registered** trademark should be marked with ®. When **non-commercially available** substances or reagents are used, the following text must be provided: “[kindly provided by (name of the person plus the research group address or company name and location) and the corresponding date]”

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

### *3.4. Illustrations and tables*

Original Photographs or drawings must be sharp and of high contrast. Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS, and a printout should always be included. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for good quality reproduction. Please do not use any pixel-oriented programmes. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-

width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible. Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast). Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures our figures in colour in the printed version of the journal, *Reproduction in Domestic Animals* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Colour print charges are explained on the [Colour Work Agreement Form](#). Once completed, please return the form to:

Customer Services (OPI)  
John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre  
New Era Estate  
Oldlands Way  
Bognor Regis  
West Sussex  
PO22 9NQ

Scanned or faxed copies will not be accepted. Please direct queries to the Production Editor at [trda@wiley.com](mailto:trda@wiley.com).

Tables should be created using the table function.

### 3.5. References

In the text, citations are listed chronologically by the author and date and are not numbered. All citations in the text must be listed at the end of the paper, according to the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors established in 1979. References should be listed in alphabetical order of the first author's name and all the authors should be listed.

The following are examples of the styles required for citing a book chapter, a journal article, and an entire book. For conference proceedings, be sure to include the name(s) of the editor(s) of the proceedings, the publisher and the place of publication.

Ewald C, Apel G, von Mickwitz G, 1988: Erfahrungen mit der Vakzination gegen die Haemophilus-Pleuropneumanie der Stewing. Berl Münch Tierärztl Wschr **102**, 6-11.

Mair A, Diebschlag W, Distl O, Kräußlich W, 1988: Analysis of pressure distribution on the foot soles of cattle. J Vet Med A **35**, 696-704.

Niemann H, Elsaesser F, 1983: Steroid hormones in early pig embryo development. In: Bavister BD (ed), The Mammalian preimplantation Embryo. Plenum Press New York, pp. 117-132.

Citations in the text should be given by placing in parenthesis the name(s) of author(s) and the year of publication, e.g. (Thein and Härtl 1986), (Ewald et al. 1988), (Mair et al. 1988; Nieman and Elsaesser 1983).

All entries in the reference list must correspond to citations in the text. No editorial responsibility can be taken for the accuracy of the references, and authors are requested to check these with special care. Papers that have not been accepted for publication are not to be included in the list of references and must be cited either as 'unpublished data' or as 'personal communication'. The use of such citations is discouraged. It is the author's responsibility to ensure that they have permission to cite material as a personal communication.

### 3.6. Laboratory animals

Papers reporting work with animals should include a reference to the code of practice adopted for the experimentation. Editors will take account of ethical and animal welfare issues and reserve the right not to publish.

## 4. Proof correction and offprints

When you receive proofs of your article, please check, correct, and return them **electronically** to the Editor-in-Chief without delay (within 3 days of receipt), as **e-annotated proofs**. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors.

*Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. To view, print and annotate the proofs of your article you will need Adobe Reader version 7 (or higher). This software can be downloaded (free of charge) for a whole series of platforms that include PC, Mac, and UNIX and can be downloaded from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. Further instructions will be sent with the proof. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.*

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

## 5. Book reviews

Book reviews appear irregularly at the end of the journals. Books submitted for review are sent by the editors to a scientist involved in the special research area. No fee is paid for reviews, but the review copy of the book (either as hard copy or electronic copy) remains the property of the reviewer. Each review should begin with exact bibliographical data on the publication, according to the following pattern:

Author(s) and/or editor(s), publication title, subtitle, edition, title of the publication series (and possibly its editors) in which the book has appeared, publisher, place of publication, year of publication, number of pages, number of illustrations, tables, and diagrams, cover material (e.g. paperback, quarter cloth binding etc.), retail price. Example:

Immelmann, F.: Introduction to Animal Behaviour. Revised and extended 3rd edition. Pareys Studentexte No. 13. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. 1983. 223 pp., 106 figs., Balacron paperback, Euro 28.0.

## 6. Supplements

As the official organ of the ESDAR, the EVSSAR and AERA, the journal publishes the proceedings (fully refereed main papers and abstracts) of the societies' Annual Meetings. Other Proceedings, as hard copy and/or online, can be published as Supplements following agreement with the Editor-in-Chief (for contents and scope) and the publisher (for terms and cost).

**Wiley Blackwell's Author Services** enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

*Reproduction in Domestic Animals* is covered by Wiley Online Library's **Early View** online service. **Early View** articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. **Early View** articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made

after online publication. The nature of **Early View** articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so **Early View** articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. Last update: May 2013