# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/02/2018.

**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: ANNELISE 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. MARICY APPARÍCIO 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**
**CAPÍTULO 1 .....1**
**1. Introdução.....1**
**2. Revisão de Literatura.....2**
**2.1 Cultivo celular.....9**
**2.2 Imunofenotipagem.....10**
**3. Bibliografia.....11**
**CAPÍTULO2.....20**
**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 mantença *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, imnocitoquímica 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 maracadores EpCam e NCAM que resultaram em 0,5% ±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 % ± 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

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 transplantion, 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)

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 goodperforming 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, aminion, 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/