



Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Paula Castanheira**

**ESTUDO COMPARATIVO DA MIGRAÇÃO,  
INTEGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS,  
PROVENIENTES DE DIFERENTES FONTES,  
EM TECIDO RETINIANO LESADO**

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda Góes

Belo Horizonte, Outubro de 2009

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**ESTUDO COMPARATIVO DA MIGRAÇÃO,  
INTEGRAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE  
DIFERENTES FONTES EM TECIDO  
RETINIANO LESADO**

**Paula Castanheira**

Versão final da tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Alfredo de Miranda Goes  
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, Outubro de 2009

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Alfredo, que não se limitou a somente orientar brilhantemente uma tese, mas também em formar um pesquisador completo. Agradeço também pela amizade e ensinamentos imensuráveis.

Ao Dr. Márcio Bittar Nehemy, pela importante participação na concepção, realização e direcionamento desta tese.

Ao Dr. Leonardo Torqueti, por sua enorme participação tanto na realização desta tese como também por sua dedicação e disponibilidade para discutir cada novo obstáculo.

À Dra. Rafaela Chitarra Hell, amiga de coração e pessoa indispensável para realização deste trabalho.

À Débora Soares Magalhães, minha “filhinha” cientista que por sua inteligência, dedicação sem fim e alegria fizeram todos os meus dias mais felizes.

À Betinha, pessoa meiga imprescindível para a realização de todos os experimentos deste trabalho.

À todas os amigos do LICM, Mário, Lulu, Cris, Carol, Bê, Cynthia, Nath, Caryninha, Luiza, Tércio, Adriana, Alessandra, Pat, Marina, Vivi, Jú, Jú Lott, Vivi, Daniela, Silviene e Naira, por todas as discussões científicas, amizade e companheirismo.

À Mirinha e Léo pela disponibilidade, amizade e ajuda nos experimentos de Real Time PCR.

A todos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pois foram indispensáveis na minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha família pelo apoio e amor em todos os momentos da vida! Sem vocês nada disso teria sentido. Amo todos vocês!

Ao meu Marido, que com muito amor, bom humor e paciência me ensina ser uma pessoa melhor a cada dia. Te amo muito!

## RESUMO

Nosso objetivo foi avaliar a migração, integração e diferenciação retiniana de células-tronco mesenquimais (CTM) injetadas na cavidade vítrea de ratos portadores de lesões retinianas.. Estudos morfológicos foram feitos em ratos Wistar adultos submetidos a múltiplas lesões retinianas por meio do YAG laser foram submetidos à injeção intravítrea de células-tronco mesenquimais marcadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) e Quantum Dot. Em duas, quatro e oito semanas o tecido retiniano lesado/tratado foi estudado com a finalidade de se avaliar a migração, integração e diferenciação retiniana. Para quantificação relativa de sobrevivência e efeito parácrino celular foram realizados ensaios de real time PCR em ratos Lewis submetidos a lesão com laser e injeção de CTMs EGFP. As células injetadas na cavidade vítrea sobreviveram na retina por pelo menos 8 semanas e de acordo com ensaios morfológicos por imunohistoquímica, quase todas CTM migraram para a retina neural e após 8 semanas a maioria das células marcadas com DAPI expressou rodopsina (marcador para fotorreceptores), parvalbumina (marcador para células bipolares e amácrinas) e GFAP (marcador de células gliais). Esse resultado, paralelamente a resultados obtidos com o marcador quantum dot sugere, que ocorreu difusão do DAPI para células de camadas adjacentes da retina. Resultados da quantificação relativa mostraram que as CTMs sobrevivem até 6 semanas, ocorrendo aumento de níveis gênicos de fatores neuroprotetores como BDNF e VEGF. Células-tronco injetadas na cavidade vítrea sofrem trofismo para o sítio de lesão. Não é possível afirmar se ocorrem diferenciação e incorporação de células-tronco mesenquimais na retina de ratos após injeção intravítrea destas células, pois a difusão do DAPI dificulta a interpretação dos resultados.

## ABSTRACT

To evaluate DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) as a nuclear tracer of stem cells migration and incorporation it was observed the pattern of retinal integration and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) injected into the vitreous cavity of rat eyes with retinal injury. For this purpose adult rat retinas were submitted to laser damage followed by transplantation of DAPI-labeled BM-MSCs grafts and double labeled DAPI and Quantum dot labeled BM-MSCs. To assess a possible DAPI diffusion as well as the integration and differentiation of DAPI labeled BM-MSCs in laser-injured retina, host retinas were evaluated 8 weeks after injury/transplantation. It was demonstrated that, 8 weeks after the transplant, most of the retinal cells in all neural retinal presented nuclear DAPI labeling, specifically in the outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL). Meanwhile, at this point, most of the double labeled BM-MSCs (DAPI and Quantum dot) remained in the vitreous cavity and no retinal cells presented the quantum dot marker. Based on these evidences we concluded that DAPI diffused to adjacent retinal cells while the nano crystals remained labeling only the transplanted BM-MSCs. Therefore, DAPI is not a useful marker for stem cells *in vivo* tracing experiments since, the DAPI released from dying cells in moment of the transplant are taken up by host cells in the tissue. Quantitative PCR results shows that MSCs survive for at least e weeks,. Also is was possible to observe higher levels of neuroproctetive factors such as BDNF e VEGF.

# SUMÁRIO

<b>1- REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>14</b>
1.1- Anatomia da Retina e Patologias Associadas	14
1.2- Aspectos fisiológicos da regeneração/reparo retiniano após lesão induzida	15
1.3- Células-Tronco: Aplicações clínicas visando reparo retiniano	17
1.4- Células-Tronco: A escolha da fonte mais adequada	18
1.5- As células-tronco na regeneração de tecidos lesados	21
<b>2- OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
<i>A- FASE 1</i>	
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1- Animais e Grupos experimentais	27
3.2- Obtenção e cultivo de células	27
3.3- Teste de Viabilidade Celular	29
3.4- Detecção da atividade da fosfatase alcalina	30
3.5- Análise fenotípica das CTMs por Citometria de Fluxo (CF)	31
3.5.1- Marcação celular com anticorpos primários e secundário	31
3.5.2- Leitura no citômetro de fluxo FACScan	32
3.6- Análise fenotípica das CTMs por Imunocitoquímica (ICC)	32
3.7- Marcação celular para traceamento	34
3.8- Estabelecimento de uma modelo de lesão	34
3.9- Transplante intravítreo das CTMs	35
3.10- Processamento dos espécimes	35
3.10.1- Para análise morfológica através de imunohistoquímica	35
<b>4- RESULTADOS</b>	<b>37</b>
4.1- Morfologia das CTMs isoladas de mo e ta de ratos Wistar	37
4.2- Análise morfológica das atividades enzimáticas das CTMs isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de ratos Wistar	37
4.3- Análise fenotípica das CTMs por Citometria de fluxo (CF)	38
4.4- Marcação das células para traceamento	41
4.5- Padrão de migração das MO-CTMs após transplante	41
4.6- Análise imunohistoquímica da retina	43
<b>5- DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<i>B- FASE 2</i>	
<b>3B- MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>51</b>
3.1B- Animais e Grupos experimentais	51
3.2B- Obtenção e cultivo de células de ratos Lewis EGFP	52

3.3B- Viabilidade Celular e Caracterização celular de CTMs ratos Lewis EGFP	-52
3.4B- Transplante intravítreo das CTMs EGFP	-----52
3.5B- Processamento dos espécimes	-----52
3.5.1b- Para quantificação relativa de transcritos gênicos	-----52
3.5.1.1b – Extração do RNA total	-----53
3.5.1.2b – Quantificação do RNA	-----54
3.5.1.3b – Síntese do DNA complementar	-----54
3.5.1.4b– Escolha dos primers	-----54
3.5.1.5b – Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real	-----55
3.5.1.6b – Padronizações	-----56
3.5.1.6.1b – Concentração do primer	----- 56
3.5.1.6.2b – Especificidade de amplificação	-----56
3.5.1.7b – Reações	----- 57
3.5.1.8b – Análise dos dados	-----57
<b>4B- RESULTADOS</b>	<b>-----58</b>
4.1B- Morfologia das CTMs isoladas de medula óssea e tecido adiposo de ratos Lewis EGFP	----- 59
4.2B- Análise morfológica das atividades enzimáticas das CTMs isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de ratos Lewis EGFP	----- 59
4.3B- Análise fenotípica das CTMs por imunocitoquímica (ICC)	----- 61
4.4B- Análise fenotípica das CTMs por citometria de fluxo (CF)	-----63
4.5B- Quantificação relativa dos transcritos gênicos	-----65
<b>5B- DISCUSSÃO</b>	<b>-----74</b>
<b>6- CONCLUSÕES</b>	<b>-----79</b>
<b>7- PERSPECTIVAS</b>	<b>-----80</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>-----81</b>
<b>9- ANEXOS</b>	<b>-----90</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Anatomia do tecido retiniano-----	15
<b>Figura 2-</b> População de CTMs em análise de FACS-----	31
<b>Figura 3-</b> Cultura celular de CTMs isoladas de MO e TA de ratos Wistar-----	37
<b>Figura 4-</b> Ensaio da metabolizacao do MTT e Atividade da fosfatase alcalina -----	38
<b>Figura 5-</b> Análise fenotípica por citometria de fluxo das MO-CTMs de Wistar-----	39
<b>Figura 6-</b> Análise fenotípica por citometria de fluxo das TA-CTMs de Wistar-----	40
<b>Figura 7-</b> Análise morfológica das MO-CTMs e marcação com DAPI-----	41
<b>Figura 8-</b> Microscopia de fluorescência mostrando a migração das MO-CTMs marcadas com DAPI <i>in vivo</i> -----	42
<b>Figura 9-</b> Análise imunohistoquímica das MO-CTMs marcadas com DAPI em cortes de retinas lesadas 8 semanas após transplante intravítreo-----	44
<b>Figura 10-</b> Migração das MO-CTMs marcadas com DAPI e Qdot, 2 semanas após transplante-----	49
<b>Figura 11-</b> Genotipagem dos ratos Lewis transgênicos EGFP-----	58
<b>Figura 12-</b> Cultura celular de células-tronco isoladas de ratos Lewis GFP-----	59
<b>Figura 13-</b> Análise da atividade enzimática do MTT de MO-CTMs e AT-CTMs de ratos lewis EGFP-----	60
<b>Figura 14-</b> Análise da atividade enzimática da fosfatase alcalina de MO-CTMs e AT-CTMs de ratos lewis EGFP-----	61
<b>Figura 15-</b> Caracterização das TA-CTMs EGFP por imunocitoquímica-----	62
<b>Figura 16-</b> Caracterização das MO-CTMs EGFP por imunocitoquímica-----	63
<b>Figura 17-</b> Análise fenotípica por citometria de fluxo das MO-CTMs EGFP -----	64
<b>Figura 18-</b> Análise fenotípica por citometria de fluxo das TA-CTMs EGFP-----	64
<b>Figura 19-</b> Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para relina, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----	66
<b>Figura 20-</b> Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGF, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----	67
<b>Figura 21-</b> Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGF-A, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----	68
<b>Figura 22-</b> Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGFR-2, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----	69

**Figura 23-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGFR-1, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----70

**Figura 24-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para EGFP, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----71

**Figura 25-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para BDNF, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH-----73

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b> Anticorpos primários para Imunocitoquímica (ICC) e Citometria de Fluxo (CF)-33	
<b>Tabela 2-</b> Anticorpos primários para Imunohistoquímica-----36	
<b>Tabela 3-</b> Primers utilizados para RT-qPCR-----55	

## LISTA DE ABREVEATURAS

<b>ApoER-2</b>	<i>Apolipoprotein E Receptor 2</i>
<b>BCIP</b>	Bromo-Cloro-Indol Fosfato
<b>BDNF</b>	<i>Brain Derived Growth Factor</i>
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-desoxiuridina
<b>EPR</b>	Epitélio Pigmentar da Retina
<b>CC2-TA</b>	Com lesão e Com TA-CTMs 2 semanas após transplante
<b>CC2-MO</b>	Com lesão e Com MO-CTMs 2 semanas após transplante
<b>CCG</b>	Camada de Células Ganglionares
<b>CD</b>	Cluster of Differentiation (grupamento de diferenciação)
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
<b>CF</b>	Citometria de Fluxo
<b>CNE</b>	Camada Nuclear Externa
<b>CNI</b>	Camada Nuclear Interna
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>CS2</b>	Com lesão e Sem Células 2 semanas após transplante de CTMs nos grupos com células (grupo)
<b>CTE</b>	Células-Tronco Embrionárias
<b>CTMs</b>	Células-Tronco Mesenquimais
<b>CXCR4</b>	<i>Chemokine Receptor</i>
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindol
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Médium
<b>DMRI</b>	Degeneração Macular Relacionada a Idade
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>EGFP</b>	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
<b>FA</b>	Fosfatase Alcalina
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
<b>FITC</b>	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
<b>GFAP</b>	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>GFP</b>	<i>Green Fluorescent Protein</i>
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>ICC</b>	Imunocitoquímica

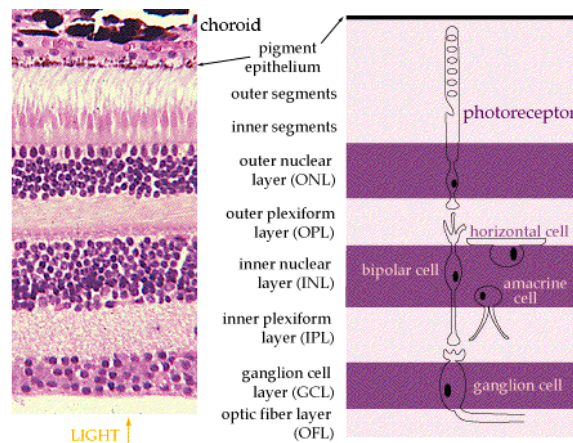
<b>µg.</b>	Micrograma
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mJ</b>	Milijoule
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimol
<b>MO-CTMs</b>	Células-Tronco Mesenquimais provenientes da Medula Óssea
<b>mRNA</b>	Ácido Ribonucléico Mensageiro
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
<b>NBT</b>	Nitrobluetetrazol
<b>Nd-YAG</b>	Neodimium-Yatrium-Garnet
<b>NGF</b>	<i>Nerve Growth Factor</i>
<b>NT</b>	Não Tratado (Grupo controle)
<b>OCT</b>	<i>Optimal Cutting Temperature Compound</i>
<b>Oct-4</b>	<i>Octamer-4</i>
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salino
<b>Qdot</b>	<i>Quantum Dot</i> (pontos quânticos)
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real Time- Polimerase Chain Reactio</i>
<b>SDF-1</b>	<i>Stromal cell-Derived Factor-1</i>
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SHR</b>	<i>Spontaneously Hypertensive Rats</i>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SSEA-1</b>	<i>Stage-Specific Embryonic Antigen-</i>
<b>TA-CTMs</b>	Células-Tronco Mesenquimais provenientes do Tecido Adiposo
<b>U</b>	Unidades
<b>VEGF</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
<b>VEGF-A</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor-A</i>
<b>VEGFR-1</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1</i>
<b>VEGFR-2</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2</i>
<b>Vldlr</b>	<i>Very low-density lipoprotein receptor</i>
<b>ZCM</b>	Zona Ciliar Marginal
<b>WT</b>	Wild Type

# 1- Revisão da Literatura

## 1.1- Anatomia da Retina e Patologias Associadas

A retina humana é parte do sistema nervoso central (SNC) e, como em todos os mamíferos tem 2 divisões estruturais básicas: a retina pigmentar (mais externa) e a retina sensorial ou neural (mais interna) (Fig 1). A retina pigmentar contém uma camada única de células epiteliais em contato com a coróide e é conhecida como epitélio pigmentar da retina (EPR). A retina sensorial é organizada em três camadas de células nucleares diferentes que são habitadas por seis tipos diferentes de neurônios e cerca de 60 subtipos neurais. A camada nuclear externa, do inglês, outer nuclear layer-ONL contém os fotorreceptores (neurônios sensíveis a luz); a camada do meio conhecida como camada nuclear interna (CNI) abriga as células bipolares, amacrinas e horizontais, e na camada mais interna conhecida como a camada de células ganglionares (CCG), contém predominantemente células ganglionares e células amácrinas desorganizadas.

Entre essas camadas nucleares, existem as camadas plexiformes (interna e externa) que são zonas sinápticas. Com o estímulo visual, todos os neurônios retinianos iniciam uma complexa cascata de interações neuronais através da ativação de vias sinápticas as quais levam finalmente à conversão de sinais, pelas células ganglionares, em mensagens visuais via nervo óptico, até o cérebro (Kolb *et al.*, 2003). Esse processo complexo requer conexões axonais intactas, que são perdidas durante a degeneração retiniana, e a restauração em potencial da função visual depende fundamentalmente da ocorrência de um re-estabelecimento da rede dinâmica neuronal da retina.



**Figura 1- Anatomia do tecido retiniano** em corte corado por hematoxilina-eosina(HE) (esquerda) e esquema (direita) mostrando suas camadas e os tipos celulares que as compõe. <http://colourblind.freesevers.com/howeye.htm>

A morte de células neurais é a maior causa de cegueira como um resultado de doenças degenerativas retinianas como degeneração macular relacionada a idade (DMRI), retinopatia diabética proliferativa, glaucoma, retinose pigmentar, vitroretinopatia proliferativa e doenças retinianas adquiridas. Pelo fato destas doenças degenerativas, assim como traumas mecânicos e induzidos por laser, resultarem em uma resposta ocular de hipóxia e inflamação, a angiogênese torna-se um componente crítico no processo de tentativa de melhora da lesão e a consequente neovascularização está associada com permeabilidade vascular alterada, edema, hemorragia, tração fibrovascular e gliose.

## **1.2- Aspectos fisiológicos da regeneração ou reparo retiniano após lesão induzida**

Para o melhor entendimento das formas pelas quais podem ocorrer a regeneração ou reparo retiniano após lesão induzida, torna-se necessário seu estudo em diversas espécies. De acordo com Tsonis (2002) a regeneração de um tecido ocorre quando suas células lesadas são substituídas por células morfologicamente e fisiologicamente idênticas. Já no reparo tecidual, as células do tecido lesado são substituídas, após quadro de inflamação aguda e crônica, por tecido cicatricial.

Em peixes e anfíbios a neurogênese não é interrompida após o estágio embrionário; ela ocorre durante toda a vida do animal. A retina continua a “crescer” e

novas células são adicionadas continuamente na região que contém as células-tronco, a zona ciliar marginal (ZCM), uma área circunferencial neurogênica localizada na extrema periferia da retina (Fischer & Reh, 2000, Spence, *et al.*, 2004). Observou-se que a maioria das células da retina destes animais é originada após o período embrionário (Jonhs, 1977).

Em anfíbios, a ZCM contribui para a regeneração retiniana, entretanto o EPR representa a fonte mais importante de regeneração. Após lesão retiniana, as células do EPR perdem a sua pigmentação, des-diferenciam e geram neurônios através de um processo chamado transdiferenciação (Fischer & Reh, 2000).

Em mamíferos, uma vez completa a histogênese retiniana, não há produção continuada de neurônios retinianos e não havia evidência, até recentemente, da existência de uma região de crescimento similar à ZCM das galinhas. Portanto, a regeneração retiniana em mamíferos, mesmo em embriões, não é observada (Moshiri, *et al.*, 2004).

Sabe-se contudo que, em mamíferos, o reparo retiniano decorrente de uma lesão local, apresenta várias etapas que consistem em uma série de mudanças características no local da lesão e que resultam ao seu final em mudanças degenerativas progressivas e a formação de tecido cicatricial-gliose. Essas etapas são conhecidas como aguda, subaguda e crônica (Pozdnyakov *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2003).

A fase aguda, que ocorre nas primeiras horas após lesão, é caracterizada por hemorragia, alterações no sistema glutamatérgico e no balanço iônico e pelo início de cascatas de morte celular. Nesta fase, estudos morfológicos mostram que a espessura da lesão retiniana aumenta para 300 $\mu$ m, ocorrendo também uma completa desorganização estrutural e funcional de todas as camadas da retina.

No dias que se seguem, ocorre a fase subaguda, caracterizada por uma reação inflamatória generalizada na qual células lesadas liberam citocinas pró-inflamatórias (ex. interleucinas 1, 6 e fator de necrose tumoral) que além de serem neurotóxicas, recrutam componentes do sangue periférico. Muitas células retinianas se comportam então, de maneira específica, ou seja, algumas se desdiferenciam, outras podem se degenerar somente, migrar, hipertrofiar ou até proliferar. As células de Muller, por exemplo, assim como as células do epitélio pigmentar (EPR) entram em um estado no qual mudam seu perfil de expressão protéica, proliferam e então migram para o local



da lesão e espaço vítreo. Neste ponto a espessura da lesão retiniana aumenta para 450µm e ainda há desorganização estrutural total da retina. Com 6 a 7 dias, após a lesão, a inflamação e a proliferação celular cessam e se inicia neste momento a fase crônica (Bringmann & Reichenbach, 2001)

Durante essa fase tardia, as células de Muller e as células do epitélio pigmentar permanecem reativas e participam do remodelamento estrutural retiniano. As células que migraram para o local da lesão e substituem parte da hemorragia por membranas fibrovasculares, a lesão retiniana começa diminuir de espessura (400µm) e com o tempo, as membranas fibrovasculares formadas podem se retrair, causando problemas severos como descolamento retiniano (Ryan *et al.*,1994).

No sentido de prevenir o processo degenerativo relacionado em grande parte à complicações da angiogênese, tratamentos como terapias de fotocoagulação (TFC) focal com laser, o uso de drogas antiangiogênicas e até mesmo mesmo intervenções cirúrgicas são utilizadas como paliativos. No entanto, estes tratamentos são capazes de somente adiar a perda visual destes pacientes, mas a longo prazo é impossível evitar que a cegueira finalmente ocorra. O desafio se encontra na forma de administração do fármaco (como o agente antiangiogênico) no local apropriado de uma forma segura, efetiva e com distribuição contínua. Nesse sentido, alternativas de tratamento tem surgido a partir de recentes descobertas no campo de células-tronco que ampliaram os projectos da aplicação de terapias celulares para regenerar tecidos oculares lesados irreversivelmente por alguma doença ou injúria.

### **1.3- Células-Tronco: Aplicações Clínicas visando Reparo Retiniano**

De acordo com os processos citados acima, sabe-se que na regeneração retiniana em humanos, dois eventos principais podem ocorrer. No primeiro a própria lesão na retina produz fatores solúveis que ativam células-tronco endógenas (chamadas de células progenitoras retinianas) da retina e faz com que elas migrem para o local da lesão, onde elas podem re-estabelecer a rede dinâmica neuronal da retina (Haynes & Del Rio-Tsonis.,2004; Mitsuda *et al.*,2005). A outra estratégia seria o desenvolvimento de terapias baseadas em células-tronco, onde o transplante autólogo destas células poderia promover uma regeneração mais intensa e efetiva seja através do reparo das células lesadas ou através da substituição destas células (Pellegrini et

al., 2007; Gaillard & Sauvé 2007; Kan *et al.*, 2007).

De acordo com Djojotubro *et al.* (2008) o sucesso das terapias baseadas em células-tronco pode, portanto, depender do potencial de diferenciação dessas células em diferentes tipos de neurônios retinianos, e se esses neurônios irão conseguir re-estabelecer as vias sinápticas fisiológicas junto à retina hospedeira. No entanto, novas pesquisas sugerem que a habilidade das células-tronco de alterar o microambiente tecidual via secreção de fatores solúveis podem contribuir de forma mais significativa do que sua capacidade de diferenciação na regeneração do tecido lesado (Pisati *et al.*, 2007; Caplan & Dennis 2006)

Células-tronco de diversas fontes vêm sendo estudadas e diferenças entre elas, como a variação no padrão de migração, tendo sido apontadas. Portanto torna-se necessário um estudo comparativo entre diferentes fontes de obtenção destas células para o desenvolvimento de um protocolo adequado visando a regeneração retiniana.

#### **1.4- Células-Tronco: A escolha da fonte mais adequada**

O corpo humano abriga diferentes tipos de células-tronco, que são capazes de se dividir muitas vezes enquanto originam subsequentemente células filhas, com potencial de desenvolvimento mais restritos. Eventualmente essas células se diferenciam e adquirem características fenotípicas específicas, que contribuem para sua função altamente especializada (Grimaldi *et al.*, 2008). Exemplos de tais células-tronco incluem: células-tronco totipotentes, embrionárias e adultas.

Células-tronco embrionárias (CTE), obtidas através da massa celular interna de blastocistos, são ditas pluripotentes pois tem a capacidade, em meios de cultura adequados, de se diferenciarem em células derivadas dos 3 folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma (Donovan & Gearhart. 2001). As CTE expressam um antígeno de superfície embrionário conhecido como SSEA-1, cuja função está associada a adesão, migração e diferenciação celular (Reubinoff *et al.*, 2000). Essas células também expressam o fator de transcrição Oct-4, o qual as mantém no estado indiferenciado e em constante proliferação. No entanto, quando estas células são removidas de sua origem, elas começam a se diferenciar em células de outros tecidos desordenadamente, sem qualquer estímulo. Como resultado da perda do fator Oct-4, *in vivo*, essas células podem se diferenciar de forma adequada ou

inadequada formando tumores após transplante (Arnhold *et al.*, 2004) Com isso, é importante um estudo mais aprofundado no sentido de controlar a diferenciação das células-tronco embrionárias, para que elas possam ser consideradas em estudos clínicos *in vivo* (Pera *et al.*, 2000; Murry & Keller, 2008, Deb & Sarda, 2008).

A maioria das células-tronco adultas, tem capacidade multipotente, ou seja, se diferenciam somente em células do folheto embrionário pelo qual foram originadas. Elas são facilmente isoladas e amplamente distribuídas podendo ser encontradas em diversos tecidos como: medula óssea, tecido adiposo, retina, cérebro, membrana sinovial, músculo esquelético, derme, cordão umbilical, polpa dentária, fluido amniótico e vasos sanguíneos e muitas outras fontes (Baksh *et al.*, 2004; Da Silva Meirelles *et al.*, 2006).

Células tronco progenitoras, são células indiferenciadas caracterizadas como multi ou unipotentes, pois já estão comprometidas a se diferenciarem nos tipos celulares dos tecidos nos quais estas células estão presentes. São encontradas em diversos tecidos e as diferenças mais importantes entre as células-tronco progenitoras e células-tronco mesenquimais é que estas podem se replicar indefinidamente, enquanto que as progenitoras só podem se dividir um número limitado de vezes. Tem sido relatado o uso experimental de células-tronco progenitoras neurais, como fonte potencial de diversas células no sistema nervoso central, como astrócitos e oligodendrócitos. Estas células foram isoladas *in vitro* na zona ciliar marginal de retinas de ratos e humanos. Elas podem se diferenciar em neurônios, como fotorreceptores, células bipolares e células gliais, *in vitro*. (Tsonis, *et al.*, 2004; Tropepe, *et al.*, 2000, Ahmad *et al.*, 1999; Canola *et al.*, 2007). No entanto, essa abordagem, pela complicação da extração dessas células que envolve procedimentos microcirúrgicos, não é uma opção no tratamento de doenças oculares, além de não ser clinicamente adequado, considerando o número limitado destas células encontradas *in vivo*. (Kicic, *et al.*, 2003).

Apesar da enorme variedade de tipos de células tronco adultas, as células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas são os tipos melhores caracterizados e utilizados na literatura.

As células-tronco hematopoiéticas são responsáveis pela constante renovação do sangue. Estas células são classicamente isoladas na medula óssea ou sangue, embora sejam também encontradas no cordão umbilical (sistema hematopoiético fetal). Elas são capazes de auto-renovação e diferenciação em células sanguíneas e

células do sistema imunológico (Reubinoff, *et al.*, 2000). O marcador característico destas células é o CD34 (D'Costa, *et al.*, 1999).

Células-tronco mesenquimais (CTMs), encontradas em abundância em inúmeros tecidos mesenquimais, são caracterizadas como adultas e a maioria de suas características são semelhantes quando comparadas à fonte em que elas foram isoladas (Chen *et al.*, 2008). No entanto, alguns estudos que comparam as CTMs derivadas de diversos tecidos mesenquimais mostram que existem algumas diferenças fenotípicas, de capacidade de proliferação e diferenciação (Peng *et al.*, 2008). A medula óssea é, de acordo com a literatura, a fonte mais estudada e confiável de CTM, mas o fácil acesso ao tecido subcutâneo adiposo e os simples procedimentos de isolamento tornam essa fonte muito atraente para terapias clínicas baseadas em células-tronco (Miyazaki *et al.*, 2008; He *et al.*, 2007).

Recentemente, o comitê da sociedade internacional para terapia celular utilizando células-tronco mesenquimais, propuseram critérios para a definição apropriada de células-tronco mesenquimais. São elas:

- CTMs têm que ser aderentes ao plástico e fenotipicamente semelhantes a fibroblastos, quando mantidas em condições de cultura padronizada.
- CTMs devem ter a capacidade de se diferenciar, quando estimuladas em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro*.
- CTMs devem expressar os antígenos de superfície CD73, CD90 e CD 105 e não devem expressar marcadores de linhagens hematopoiéticas tais como: c-kit, CD34, CD45 e CD19.

Além disso, as CTMs possuem uma característica importante denominada plasticidade, que nada mais é do que a habilidade de uma célula-tronco adulta proveniente de um tecido de uma certa origem embrionária de diferenciar-se em células especializadas de um tecido derivado de origem embrionária diferente (Jiang *et al.*, 2002). Tal característica deve-se a um processo conhecido como transdiferenciação, que envolve uma reprogramação genética, onde ocorre o desligamento de conjuntos de genes e a ativação de outros. Este fenômeno é, no entanto, pouco entendido (Slack and Tosh, 2001).

## **1.5- As células-tronco na regeneração de tecidos lesados**

Muitos pesquisadores indicam que as CTMs podem se integrar ao osso, músculo, cérebro, coração e pulmão quando transplantadas (Anjos-Afonso *et al.*, 2004). No entanto, o mecanismo específico responsável pelo fenômeno de integração, plasticidade e diferenciação das CTMs transplantadas não é claro, podendo ser explicado tanto pela transdiferenciação destas, quanto pela fusão das células transplantadas com as células residentes; ou até pela combinação destes fatores (Kallis *et al.*, 2007).

As CTMs mostram uma forte propensão a melhorar o dano tecidual em resposta à injúrias ou doenças. Estudos recentes sugerem que a capacidade das CTMs de secretar fatores solúveis que alteram o microambiente tecidual supera funcionalmente sua capacidade de transdiferenciação no reparo do tecido afetado já que a baixa ocorrência deste fenômeno não condiz com os níveis de reparo observados (Baddoo *et al.*, 2003; Caplan & Dennis 2006; Pisati *et al.*, 2007).

Com isso, o potencial de regeneração anatômico e funcional de tecidos lesados, pelas células-tronco adultas, pode ser atribuído a dois fenômenos distintos já demonstrados pela literatura. Um seria a própria capacidade das células-tronco de se diferenciarem em células do tecido lesado, através da transdiferenciação, e de se integrarem neste tecido exercendo suas funções fisiológicas, previamente prejudicadas. Como exemplo deste fenômeno, estudos recentes demonstraram que as CTMs cultivadas podem ser induzidas *in vitro* e *in vivo* a se diferenciarem em derivados não-mesenquimais como as células neurais (Mezey *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000). Em 2008, Gong *et al.* demonstraram que CTMs administradas no espaço sub-retiniano de ratos cujas retinas foram lesadas com iodato de sódio, foram capazes de migrar e se diferenciar em fotorreceptores, células do epitélio pigmentar e células da glia após 5 semanas. Tomita *et al.* (2002) também injetaram CTMs em ratos portadores de lesões retinianas e observaram que as células se diferenciaram em células retinianas *in vivo*. Kicic *et al.* (2003) demonstraram que as CTM podem ser induzidas se diferenciar em fotorreceptores *in vitro* e *in vivo*. Apesar da integração e diferenciação das células-tronco na retina lesada, a recuperação da funcionalidade deste tecido permanece questionável (Tsonis *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 1998).

Outro fenômeno responsável pela regeneração de tecidos lesados, já demonstrado pela literatura, seria a produção de fatores solúveis e citocinas, por CTEs (Gregory-Evans *et al.*, 2009) e CTMs, capazes de promover regeneração deste tecido. Tal evento foi relatado em estudos onde houve regeneração de áreas neurais lesadas através de fatores neurais autênticos produzidos e liberados pelas CTMs (Rodrigues Hell *et al.*, 2009; Zwart *et al.*, 2009). Esses fatores solúveis especiais secretados pelas CTMs são ativos na neuroproteção e incluem: fator de crescimento de hepatócito, GDNF (*Glial cell line Derived Neurothrophic Factor*), BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) e VEGF. Além destes fatores, estas células também expressam receptores de neurotrofinas de alta (trk) e baixa (NGFR) afinidades.

Também foi demonstrado que as CTMs estimulam células gliais a produzir fatores neurotróficos como BDNF e NGF (*Nerve Growth Factor*) e que células neurais expressam diferentes tipos de neurotrofinas e receptores trk de alta afinidade (Mahmood *et al.*, 2002). Tais fatores podem aumentar a habilidade de regeneração de tecidos neurais lesados (pois promovem melhoras em neurônios que sofreram lesão), estimular a proliferação e diferenciação de células-tronco progenitoras encontradas na maioria dos tecidos, além de diminuir reações inflamatória e imunológicas (Baddoo *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Pisati *et al.*, 2007).

A partir destas descobertas no campo de células-tronco e sua atividade secretora, tem-se estudado a possibilidade de que estas células poderiam servir como células secretoras de substâncias neuroprotetoras e até mesmo de fármacos e com isso que ampliam os prospectos da aplicação de terapias celulares para regenerar tecidos oculares lesados irreversivelmente por alguma doença ou injúria.

As CTMs são geralmente consideradas células pouco imunogênicas e suprimem as funções das células T, B e células NK, afetando também a atividade das células dendríticas (Puissant *et al.*, 2005; Chamberlain *et al.*, 2007). Além disso, as CTMs produzem uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e proteases que tem papel tanto na imunomodulação quanto na função migratória. Neste sentido, CTMs expressam um padrão restrito de receptores de quimiocinas permitindo com que estas células migrem para tecidos após sinais quimiotáticos específicos (Ponte *et al.*, 2007; Chamberlain *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as CTMs migram para várias localidades *in vivo*, tais como sítios de lesão, inflamação e tumores (Uccelli *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2006). No entanto, os eventos moleculares relacionados à essa migração ainda não está bem definido. Estudos recentes relatam que o eixo SDF-

1/CXCR4 parece ter um papel importante na migração e endereçamento das CTMs para sítios de lesão, inflamação e tumores. (Wojakowski *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2006). Wohl *et al.* (2009) demonstraram, em um estudo *in vivo* em ratos, que uma lesão no nervo óptico induz células progenitoras da retina à migração em direção ao local lesado e à proliferação.

Outro mecanismo bastante estudado, no que se diz respeito ao SNC, é o padrão de produção de uma proteína de matriz extracelular, chamada relina, por células da retina. Essa proteína largamente expressa durante a retinogênese é apontada como um dos principais fatores que influenciam na migração/endereçamento de células-tronco para a retina, quando esta se encontra lesada (Pulido *et al.*, 2007; Panteri *et al.*, 2006). Isso se deve ao aumento de expressão de relina em retinas de camundongos, depois de lesionadas, em comparação com a produção basal desta proteína, quando o tecido não se encontra lesado. Contudo, o mecanismo que coordena esse processo de migração das CTMs induzido pela relina ainda não foi bem elucidado.

A angiogênese, decorrente de uma lesão, é atribuída ao fato de que alguns tipos celulares retinianos, quando lesados, liberam substâncias chamadas de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que é um dos mais importantes mediadores das fases iniciais da angiogênese. Este processo é caracterizado pelo surgimento de brotos de novos vasos a partir dos vasos pré-existentes, ou pela divisão longitudinal destes e ocorre em resposta a estímulos como a hipóxia, a isquemia, a inflamação, mecanismos de estiramento e estresse de cisalhamento. A angiogênese pode ser um processo fisiológico normal como acontece nos casos de cicatrização de feridas, na recuperação uterina pós-menstruação e no pós-parto, ou um processo patológico. Sabe-se que essa neovascularização patológica ocorre, na retina, como uma tentativa de reparação de danos teciduais através da formação local de neovasos, por isso o estudo da alteração na produção VEGF, assim como de seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2) torna-se importante no estudo da evolução de lesões retinianas. Mais do que uma única substância, o VEGF representa uma família de proteínas. Existem cinco tipos conhecidos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E. (Ferrara, 2004). O VEGF-A é o principal fator encontrado na corrente sanguínea e promove a formação de novos vasos por ações distintas e sinérgicas. Sua

isoforma VEGF<sub>165</sub> é a principal encontrada no olho humano, e é considerada a maior responsável pela angiogênese em processos patológicos oculares (Ishida *et al.*, 2003; Tolentino *et al.*, 1996).

As propriedades distintas das CTMs evidenciam sua aplicação promissora em estudos clínicos incluindo a medicina regenerativa, terapias baseadas em células e engenharia de tecidos. Além da capacidade de diferenciação multipotente, o uso das CTMs autólogas para terapias é vantajoso, já que é livre de riscos como imunorejeição e carcinogênese e também pode evitar constrangimentos éticos causados pelo uso de células-tronco embrionárias.



## **2- A hipótese a ser testada**

O propósito do nosso trabalho é, portanto, avaliar a possibilidade do desenvolvimento de uma terapia celular baseada em células-tronco mesenquimais visando a recuperação das células retinianas lesadas ou doentes, através de um modelo animal experimental.

Para isso, serão avaliados 3 possíveis caminhos que podem evoluir na melhora do quadro de lesão. São eles:

- 1) A capacidade da retina lesada de se auto-recuperar através da ativação, por fatores solúveis de células-tronco endógenas (também conhecidas como células progenitoras)
- 2) A capacidade das células-tronco mesenquimais transplantadas de migrar, integrar e de se diferenciarem em células retinianas quando mortas ou lesadas.
- 3) A capacidade das células-tronco transplantadas de proteger as células retinianas lesadas e impedir a progressão da lesão através da produção de fatores neuroprotetores solúveis.

### **Objetivos Específicos**

- Criar um modelo experimental apropriado, utilizando ratos, para a viabilização da realização de um estudo de transplante, de forma adequada.
- Caracterizar fenotipicamente, por citometria de fluxo e por imunocitoquímica as células-tronco mesenquimais a serem transplantadas utilizando marcadores específicos para esse tipo de célula (CD45, CD54, CD90, CD73).
- Avaliar a migração das células-tronco mesenquimais provenientes do tecido adiposo e medula óssea para retina lesionada, após diferentes tempos do transplante.
- Avaliar, através de experimentos morfológicos, se ocorre algum tipo de diferenciação das células-tronco transplantadas após integração dessas células no tecido retiniano lesado.

- Avaliar diferenças relacionadas ao padrão de migração, sobrevivência e reparo tecidual, através da quantificação, por PCR em tempo real (RT-qPCR) de transcritos gênicos para fatores relacionados a estes eventos, entre as diferentes fonte de células-tronco mesenquimais testadas (medula óssea ou tecido adiposo).

Esta tese, por motivos didáticos, será escrita de acordo com as fases cronológicas do projeto, já que os materiais e métodos, resultados e discussão apresentados serão específicos para cada fase. As fases serão descritas como:

- FASE 1** – Essa fase priorizou avaliar a ocorrência da diferenciação das CTMs como possível evento responsável pela regeneração retiniana. Este estudo foi baseado em ENSAIOS MORFOLÓGICOS onde as CTMs, marcadas com DAPI e Qdot, foram transplantadas e avaliadas *in vivo*, de forma tempo dependente quanto seu padrão de migração e diferenciação. A partir desta fase houve a viabilização do estudo baseado em terapia celular, para regenerar retinas lesadas através da criação de um modelo experimental animal adequado.
- FASE 2** – Esta fase teve como foco a realização de ENSAIOS QUANTITATIVOS a fim de avaliar, de forma tempo dependente, a produção de fatores solúveis pelas CTMs, assim como seu padrão de migração e sobrevivência *in vivo*, após serem transplantadas em retina lesada. Nesta fase, em que também foi feito um estudo comparativo, foram utilizadas CTMs marcadas endogenamente com EGFP provenientes de medula óssea e de tecido adiposo.

## ***A- FASE 1***

### **3- Materiais e Métodos**

#### **3.1- Animais e Grupos experimentais**

Para estudo com células marcadas de forma exógena, foram utilizados, como ratos doadores (que doaram células para transplante) e receptores (que receberam células transplantadas), ratos *-rattus novergicus-* fêmeas ou machos *inbred* da linhagem WISTAR- SHR com 4 a 10 semanas de idade.

De acordo com a presença ou ausência de lesão retiniana, de células transplantadas e com o tipo de marcação celular para traceamento, os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

A- Ratos sem lesão retiniana e sem nenhum tipo de administração de fármacos, células ou substâncias (n=27) -Grupo Controle-

B- Ratos com lesão retiniana transplantados com CTMs marcadas com:

B1- DAPI- marcação exógena- (n=27)

B2- DAPI e Quantum Dots simultaneamente - marcação exógena- (n=27)

C- Ratos com lesão retiniana e com injeção de PBS (n=27)

Todos os grupos foram avaliados em 3 tempos: 2 (n=9) , 4 (n=9) e 8 (n=9) semanas após a realização do transplante de CTMs.

#### **3.2- Obtenção e cultivo de células**

- **Meio de cultura basal**

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5mM de bicarbonato de sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades de

penicilina G/mL, 100 unidades de streptomomicina/mL e 0,25µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco).

- **Extração das células -tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MO-CTMs)**

As células tronco mesenquimais obtidas a partir de medula óssea foram extraídas de ratos doadores com 4 a 6 semanas de idade. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas tíbias e fêmures extraídos. Em meio estéril, as epífises dos ossos coletados foram seccionadas expondo a medula. Esta foi retirada através do influxo de meio DMEM previamente preparado, com auxílio de uma seringa de 15 mL. As células foram coletadas em tubo de 50 mL (Falcon) e centrifugadas a 1400 rpm, por 5 minutos, a 10°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado (pellet) contendo a fração celular foi ressuspenso em meio controle (Maniopoulos & Melcher, 1998).

- **Extração das células –tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (TA-CTMs)**

A obtenção das células tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo se deu de acordo com protocolo descrito por Ogawa e colaboradores (2003), com modificações.

Ratos doadores, com 4 a 6 semanas de idade foram sacrificados por deslocamento cervical, e banhados com álcool 70% para evitar contaminação. Posteriormente, o peritônio dos animais foi aberto e a gordura inguinal retirada e colocada em tubo de 50mL contendo meio DMEM.

Na câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o tecido foi banhado com tampão fosfato salino (PBS) 0,15M pH 7,2 até eliminação do conteúdo sanguíneo visível. Após isto o tecido obtido foi lavado com DMEM por 3 vezes. Com estas lavagens procurou-se eliminar microrganismos, através dos antibióticos e antimicótico presentes na solução. A gordura foi extensivamente cortada, macerada e submetida à digestão enzimática em solução contendo PBS com 0,15% de colagenase tipo D (Gibco), por 2 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A cada

15 minutos esta preparação foi vigorosamente agitada. Decorrido o período de duas horas, a digestão foi interrompida pela adição de DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino em volume igual ao contido na preparação.

A suspensão de células foi centrifugada a 1400 rpm, por 5 minutos, a 10°C. Ao final da centrifugação o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado, e o precipitado contendo a fração estromal vascular foi ressuspensão em meio controle.

- **Cultura celular primária**

As células obtidas dos tecidos medular e adiposo foram plaqueadas em frasco de cultura celular T-75 (75 cm<sup>3</sup>) contendo 10 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e cultivadas em uma estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por três passagens.

Nos dois dias subsequentes à extração, cada frasco foi cuidadosamente lavado, várias vezes, com PBS para remoção de hemácias e outras células não aderentes. O meio foi trocado a cada 3 dias.

Após duas semanas e sucessivas trocas periódicas do meio, as células não aderentes foram totalmente removidas e as aderentes expandidas, obtendo-se portanto uma cultura homogênea em monocamada.

### **3.3 - Teste de Viabilidade Celular**

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade e estado de ativação das células (Mosmann, *et al.*, 1983). Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato dimetiltiazol, solúvel em água, em cristal de formazan, produto insolúvel na água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As linhagens celulares foram cultivadas, em sua terceira passagem, em meio de cultura basal em uma placa de 24 poços (NUNC) numa densidade de  $5 \times 10^5$  células/ mL/ poço e incubadas por 18 horas a 37°C em estufa com 5%CO<sub>2</sub>. Após este

período, o meio de cultura foi retirado e 210µL de meio de cultura basal foi adicionado. Foi acrescentado às células, 170µL da solução de MTT (SIGMA) 5 mg/mL. A placa foi novamente incubada em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 2 horas e, em seguida, as células foram observadas em microscópio óptico para a visualização dos cristais de formazan. Foi acrescentado a cada poço 210µL de SDS10%-HCl para a solubilização dos cristais. Após 18 horas, foram recolhidos 100µL de cada poço e a leitura dos valores de absorbância da solução resultante foi realizada a 595 nm em um leitor automático de micro placas (Elx800, Bio-Tek, Instruments Inc.) e os resultados foram plotados em forma de gráfico de barras.

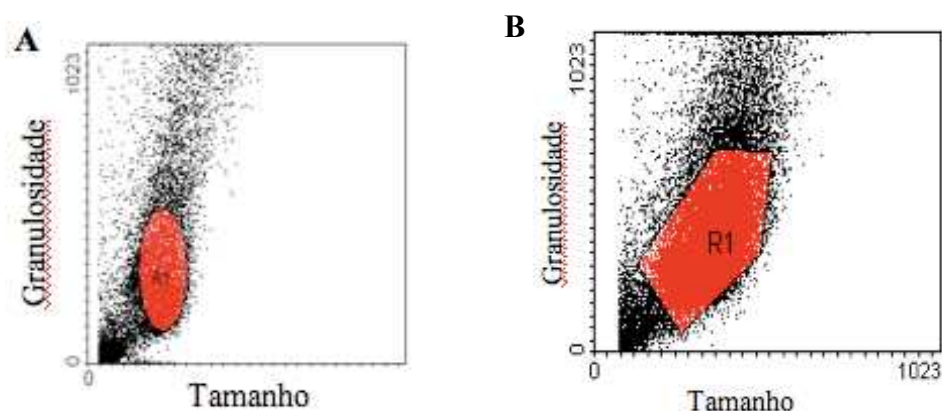
### **3.4- Detecção da atividade da fosfatase alcalina**

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada através do ensaio de NBT-BCIP (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromatogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP (bromo-cloro-indol fosfato) pela fosfatase alcalina presente nas células. A reação produz um próton que reduz o NBT (nitro *blue* tetrazol) a um precipitado insolúvel de cor púrpura. Através da atividade da fosfatase alcalina, é possível avaliar o nível de diferenciação celular, visto que esta é um marcador celular precoce tanto de células tronco quanto de osteoblastos. Além disso, a atividade desta enzima nos permite distinguir células-tronco mesenquimais de outras células do mesenquima tais como fibroblastos, já que a produção da fosfatase alcalina é elevada nas CTMs quando comparada aos fibroblastos.

Para a detecção de fosfatase alcalina nas células em terceira passagem, na concentração de  $5 \times 10^5$  por poço, todo o “sobrenadante” de cultura celular foi retirado. As células foram lavadas com PBS e 200µL de solução de BCIP-NBT, preparada de acordo com as instruções do fabricante (Gibco), foi adicionada a cada poço. Após 2 horas de incubação, cada poço recebeu 210µL de SDS 10% HCl para a solubilização dos precipitados púrpura. As placas foram incubadas à 37°C por 12 horas. Após a solubilização, 100µL de cada poço foi colocado numa placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida a 595 nm num leitor automático de micro placas.

### **3.5 - Análise fenotípica das CTMs por Citometria de Fluxo (CF)**

As CTM de medula óssea e de tecido adiposo foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise da presença de cinco moléculas de superfície celular CD29,CD44, CD90, CD54 e CD73 que são consideradas como marcadores positivos de células tronco mesenquimais (Pittenger, *et al*, 1999). Para verificar a existência de contaminações da cultura de células-tronco mesenquimais com células tronco hematopoiéticas, também foi analisado a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45, que são considerados marcadores positivos de células-tronco hematopoiéticas. – Primeiramente, foi delimitada a população de células a ser estudada através de regiões que são criadas em gráficos de tamanho x granulosidade. Os resultados foram plotados em forma de histograma.



**Figura 2-** População de células-tronco provenientes de medula-óssea (A) e tecido adiposo (B) selecionadas para análise de acordo com padrões de tamanho e granulosidade celular.

#### **3.5.1- Marcação celular com anticorpos primários e secundário**

CTMs, em terceira passagem, de medula óssea e tecido adiposo na densidade de  $1 \times 10^6$  foram incubadas com uma concentração de  $1 \mu\text{g}$  dos anticorpos primários (tabela 1) em diferentes poços em uma placa de 96 poços (placa fundo em U) por 30

minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 1µg do anticorpo secundário monoclonal de coelho anti IgG de camundongo marcado com FITC isotiocianato de fluoresceína (calbiochem) ou Alexa fluor (invitrogen) – 568nm ou 488nm (invitrogen) por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS e depois fixadas em formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer a população a ser analisada.

### **3.5.2 - Leitura no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA)**

Um mínimo de 15.000 eventos foram adquiridos, utilizando o programa CELLQuest. Os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através de regiões que são definidas em gráficos de tamanho versus granulosidade gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizamos um gráfico de histograma para delimitarmos a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo monoclonal de coelho anti IgG de camundongo marcado com FITC e com Alexa fluor. A partir da definição destes parâmetros, iniciamos a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

### **3.6- Análise fenotípica das CTMs por Imunocitoquímica (ICC)**

CTMs de medula óssea e de tecido adiposo em cultura na terceira passagem, foram fixadas por 10 min com uma solução de 4% de paraformaldeído em PBS, lavadas com PBS e permeabilizadas através da incubação com 0.25% de TritonX-100 (Roche, Alemanha) em PBS por 10 minutos. Após a permeabilização as células foram lavadas 3X em PBS, 5 minutos cada lavagem e bloqueadas, à temperatura ambiente, com 3% de BSA em PBS-Tween 0.05% por 2 horas. Mais uma vez as células foram lavadas 2X em PBS, 5 minutos cada e, posteriormente, incubadas com anticorpos



primários por 1 hora a temperatura ambiente (tabela 1). Após o período de incubação, as células foram lavadas 3X com PBS, 5 minutos cada, e incubadas com os anticorpos secundários. Os anticorpos secundários foram diluídos na mesma solução dos primários. Os anticorpos secundários usados, na diluição de 1:500, foram: anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) e cabra anti IgG de Coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes). Novamente as células foram incubadas por 1 hora, temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas, 3X em PBS, 5 minutos cada, ao abrigo da luz. As células foram incubadas em DAPI, na diluição de 1:200, por 1 minuto e lavadas 1X em PBS por 5 minutos. Para prevenir a perda da fluorescência e o ressecamento do material, as lamínulas receberam Hidramount e foram montadas sobre uma lâmina. As lâminas foram analisadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus®, Optical sectioning microscope attached to an Axioplan imaging Apotome® apparatus, Zeiss®, Germany). Colocalização das imagens com dupla marcação foi feita pela sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo.

× ○	Antígeno	Teste	Espécie	Fornecedor	Diluição
-----	----------	-------	---------	------------	----------

**Tabela 1- Anticorpos primários para Imunocitoquímica (ICC) e Citometria de Fluxo (CF)**

	CD29	CF	Camundongo	Abcam	1:50
	CD34	CF	Camundongo	Abcam	1:50
	CD44	CF	Camundongo	Abcam	1:50
	CD45	ICC e CF	Camundongo	Abcam	1:50
	CD54	ICC e CF	Camundongo	BD Biosciences	1:500 e 1:50
	CD73	ICC e CF	Camundongo	BD Biosciences	1:500 e 1:50
	CD90	ICC e CF	Camundongo	BD Biosciences	1:500 e 1:50
	GFP	ICC e CF	Coelho	BD Biosciences	1:500 e 1:50

### **3.7- Marcação celular para traceamento**

- **DAPI**

Após a terceira passagem as MO-CTMs foram incubadas, em cultura, com 50 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 2h. MO-CTMs foram tratadas com tripsina (Gibco) por 3 minutos para gerar uma suspensão celular homogênea, lavadas 3 vezes com DMEM, ressuspensas em DMEM sem soro, contadas, e mantidas em gelo até a realização do transplante.

- **Quantum Trackers**

Quantum trackers (Invitrogen) são microcapsulas que liberam nanocristais fluorescentes chamados quantum dots (Qdots) no citoplasma de células vivas, usando um peptídeo ligante específico. Um vez dentro das células vivas, estes nanocristais emitem uma fluorescência intensa e estável que pode ser traceada (rastreada) durante várias gerações mas não são transferidas para populações de células adjacentes. Para marcação das CTMs com os Qdots foi realizado a seguinte procedimento:

Foi preparada uma solução de marcação de 10nM misturando 1µl do reagente A e B do Qdot em um eppendorf de 1,5 mL. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos foi adicionado DMEM ao tubo juntamente com uma suspensão de 1x10<sup>6</sup>

CTMs. Essa solução de células com nanocristais foi homogeneizada, incubada a 37°C por 60 minutos e lavada com DMEM 3 vezes. As células marcadas são então mantidas células no gelo até a realização do transplante.

### **3.8- Estabelecimento de uma modelo de lesão**

Ratos receptores, de 10 a 12 semanas de idade foram anestesiados com uma diluição de quetamina (5mg/por 100g de peso) e xilazina (2mg/por 100g de peso), administradas de forma intramuscular. Midríase (dilatação da pupila) foi induzida pela anestesia. A lesão retiniana, feita em ambos os olhos dos ratos, foi induzida por vários tiros de laser neodýmium-doped yttrium aluminium garnet (Nd-YAG) usando uma media de 0.5 mJ de energia. Uma lente tipo Goldman contendo três espelhos foi usada para produzir aproximadamente 15 a 20 tiros de YAG laser ao redor do disco óptico. As lesões perfuraram a retina em toda sua espessura, como observado por pontos de hemorragia subretiniana. Os animais cujo laser causou hemorragia massiva não foram usados neste estudo.

Este tipo de lesão traumática pode mimetizar os danos celulares causados na retina por doenças degenerativas, já que a lesão por laser também causa danos na membrana de *Bruch* (formada por colágeno e localizada entre a membrana coróide e o epitélio pigmentado da retina) que levam à hipóxia e resultam na formação de neovasos que penetram no espaço sub-retiniano dessa provocando exsudação e hemorragia. (Damico 2007; Zhang *et al.*, 2004).

### **3.9- Transplante intravítreo das CTMs**

Ratos receptores foram anestesiados através de uma injeção intramuscular de uma diluição de cetamina (5mg/por 100g de peso) e xilazina (2 mg/por 100mg de peso). Uma suspensão celular (20 µl) contendo aproximadamente  $2 \times 10^5$  MO-CTMs marcadas com os grupos distintos de marcadores, foi injetada lentamente na cavidade vítrea via *pars plana*, usando uma agulha de 30 gauge, 24 horas após a lesão ser induzida por laser.

### **3.10- Processamento dos espécimes**

Os animais foram sacrificados 2, 4, e 8 semanas após a realização do transplante. O bulbo ocular foi enucleado através de uma peritomia limbal de 360° , isolando os músculos extra oculares, e dissecando o nervo óptico no apêndice da órbita.

#### **3.10.1- Para análise morfológica através de imunohistoquímica**

Ambos os olhos dos ratos dos grupos experimentais foram processados de duas formas: ainda frescos (embebidos em OCT e congelados) ou fixados em Omnifix (FR Chemical Inc, Mount Vernon, NY). Os olhos processados ainda frescos foram cortados (10 µm) no criostato e analisados imediatamente em microscópio de fluorescência. Os olhos fixados ficaram na solução de Omnifix por 24h, foram desidratados através de diferentes concentrações de etanol, xilol, embebidos em Paraplast-Plus (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), e cortados (7 µm) usando um micrótomo. Para ambos os processos, as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina, e visualizadas em um microscópio óptico para avaliar a preservação da morfologia retiniana.

Todos os blocos embebidos em *paraplast* foram cortados, o *paraplast* foi removido, os cortes foram re-hidratados e submetidos a marcação imunológica usando vários anticorpos específicos para células retinianas (tabela 2). Após bloquear por 1 hora ,em temperatura ambiente, com 2% de soro fetal bovino diluído em PBS os cortes foram incubados com os anticorpos primários, durante a noite a 4°C em câmara úmida. Os cortes foram posteriormente lavados três vezes por 5 minutos em PBS e então incubados por 1 hora (temperatura ambiente) em uma diluição de 1:500 com os seguintes anticorpos secundários: anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) e cabra anti IgG de coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes). Os cortes foram então lavados três vezes por 5 minutos com PBS, as lâminas foram montadas utilizando hidramount e analisadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus®, Optical sectioning microscope attached to an Axioplan imaging Apotome® apparatus,

Zeiss®, Germany). Colocalização das imagens com dupla marcação foi feita pela sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo.

**Tabela 2- Anticorpos primários para Imunohistoquímica**

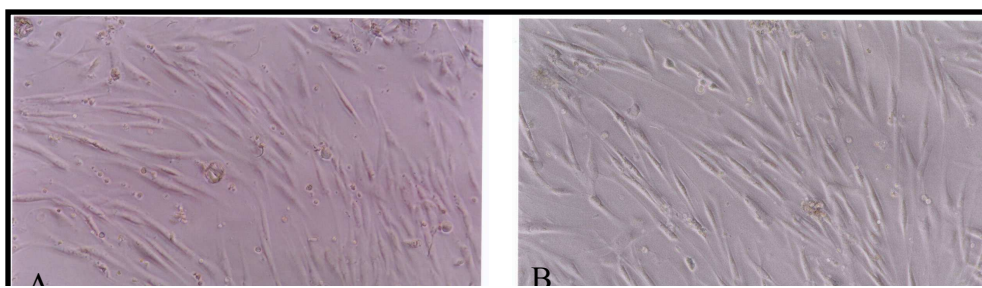
	<b>Antígeno</b>	<b>Clone</b>	<b>Espécie</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
<b>Imunohistoquímica</b>	Rodopsina	[RET-P1]	Camundongo	Abcam	1:16
	GFAP (Glial fibrillary acidic protein)		Coelho	Abcam	1:1000
	Parvalbumina		Coelho	Abcam	1:1000
	Pan-Citoqueratina	[C-11]	Camundongo	Abcam	1:250

## 4- Resultados

Serão mostrados, neste momento, os resultados experimentais da FASE 1 da tese, onde foram caracterizadas as células-tronco isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de ratos Wistar SHR. Essas células foram testadas quanto sua viabilidade, quanto sua produção de fosfatase alcalina e quanto a presença de marcadores específicos de membrana para células-tronco mesenquimais.

### 4.1- Morfologia das MO-CTMs e TA-CTMs de ratos wistar

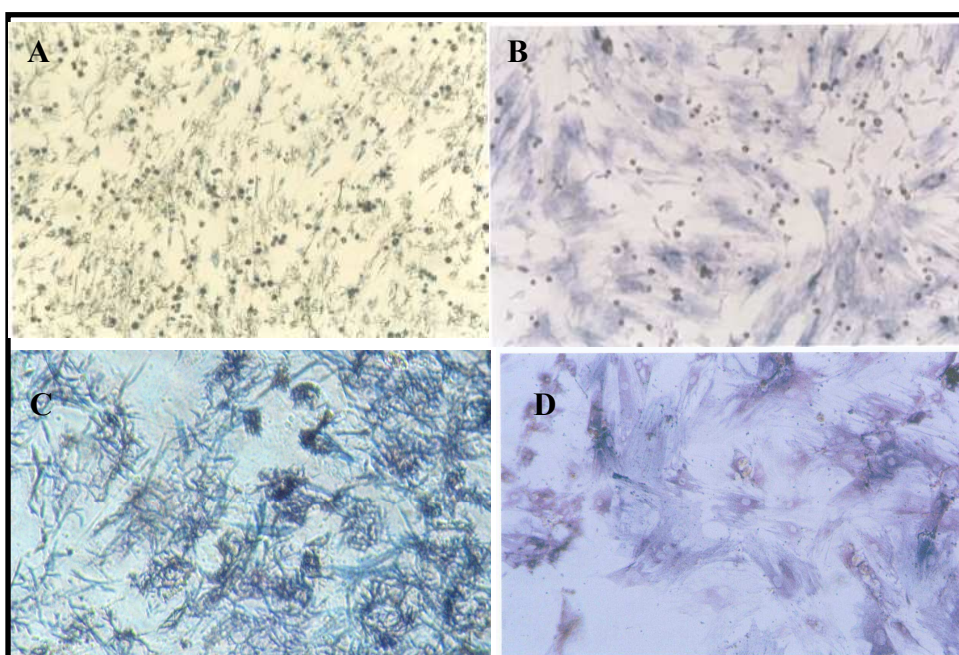
A morfologia das células-tronco isoladas de medula óssea e tecido adiposo de ratos Wistar SHR, em cultura com meio de cultivo celular DMEM - 10% SFB, assumiram a forma fusiforme alongada com núcleo central e alguns prolongamentos. Essas células apresentam altas taxas replicativas e são aderentes às garrafas de cultivo celular.



**Figura 3. Cultura celular de células-tronco isoladas de medula óssea (A) e tecido adiposo (B) de ratos wistar.** Documentação fotográfica das células-tronco após 3ª passagem ao microscópio óptico no aumento de 100x.

#### **4.2- Análise morfológica das atividades enzimáticas das MO-CTMs e TA-CTMs de ratos wistar**

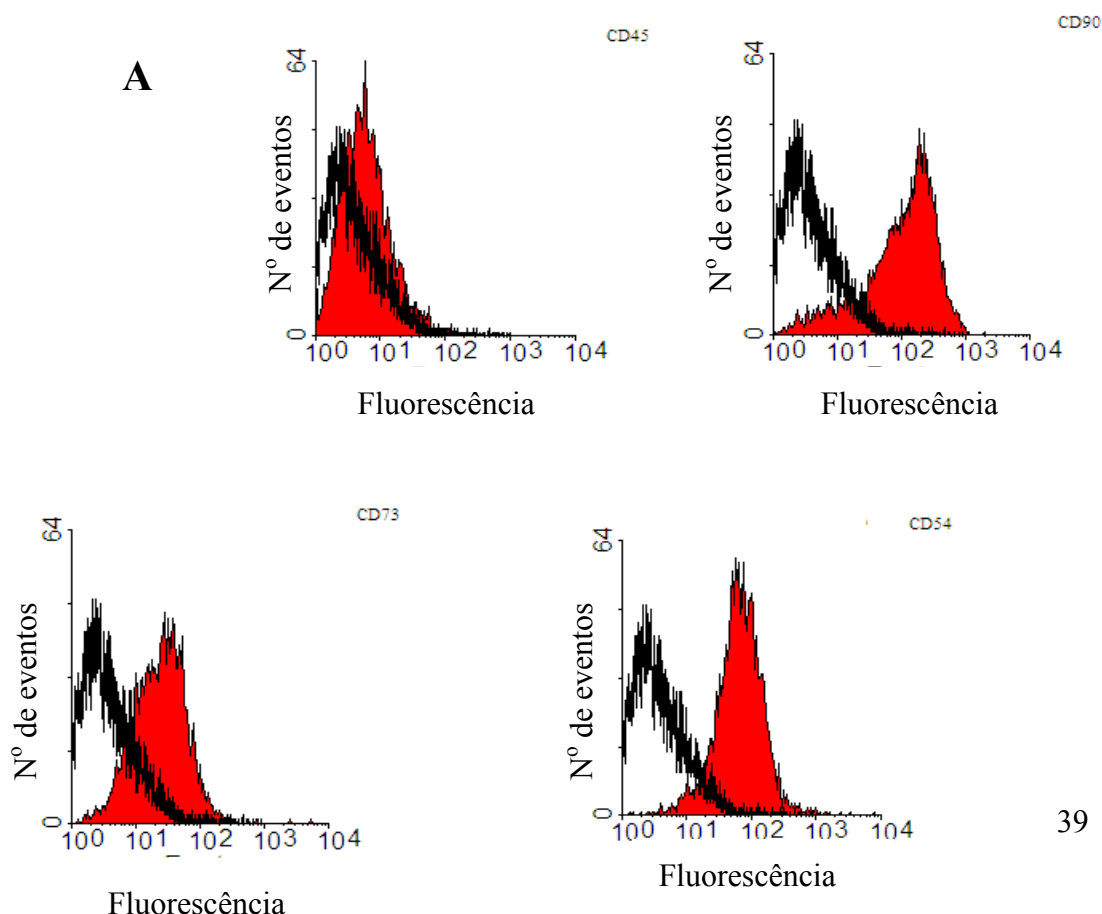
As análises morfológicas documentadas nos ensaios de viabilidade celular (MTT) tanto das MO-CTMs (Fig 4A) quanto das TA-CTMs (Fig 4C) de ratos wistar mostram a presença de cristais de formazam, comprovando a viabilidade celular através da atividade enzimática. Já nos ensaios da atividade fosfatase alcalina (AP) são observados pontos escuros, nas figuras, que representam a formação do produto e sua sedimentação. Isso comprova a atividade enzimática tanto das MO-CTMs (Fig 4B) quanto das TA-CTMs (Fig 4D).



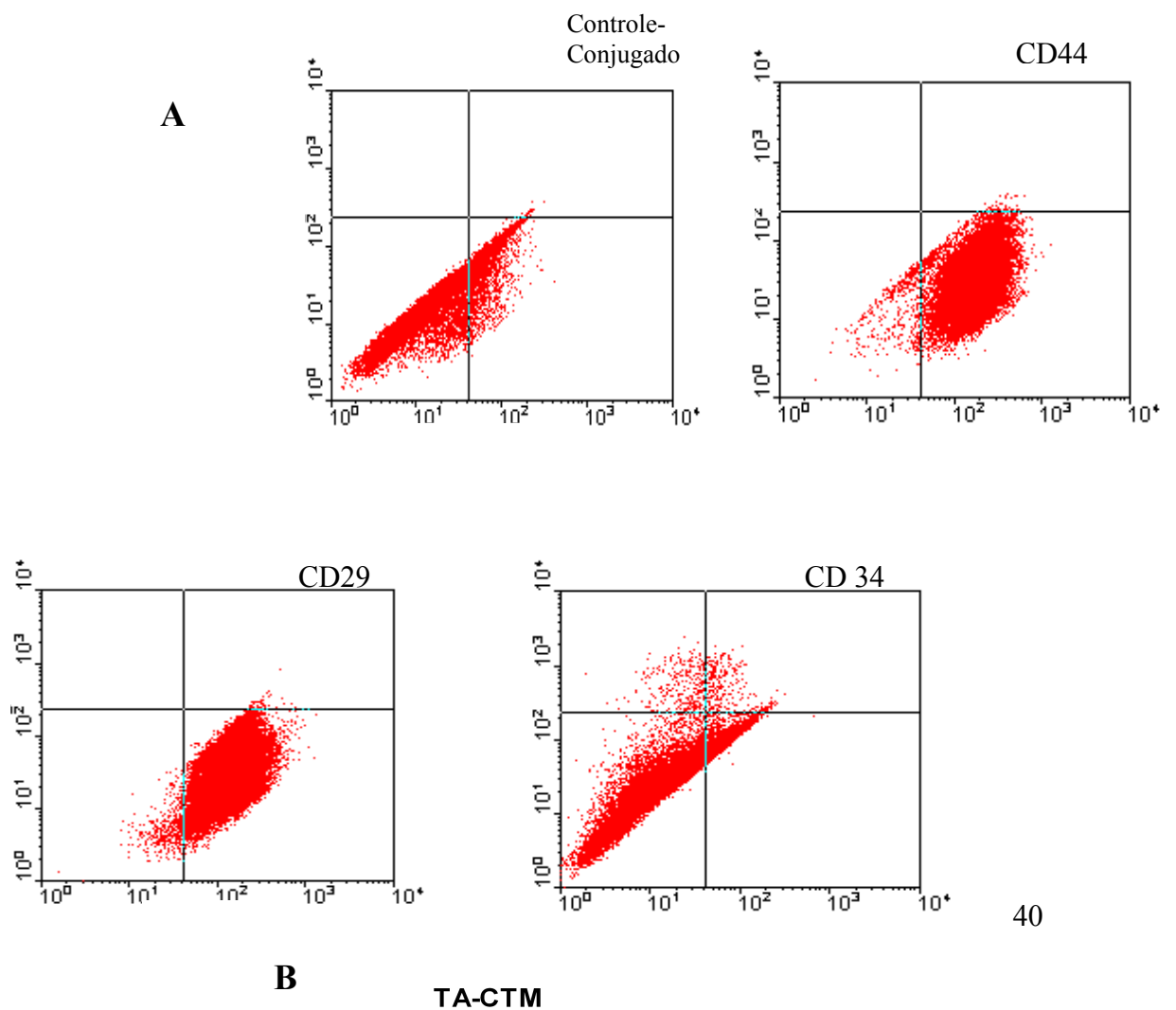
Figuras 4A e C. **Ensaio da metabolização do MTT.** Formação dos cristais de formazam documentados no aumento de 100X ao microscópio óptico. As figuras 4B e D mostram o **ensaio da atividade de fosfatase alcalina.** Análise morfológica documentado no aumento de 100X ao microscópio óptico.

### 4.3 – Análise fenotípica das CTMs por Citometria de fluxo (CF)

A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios de citometria de fluxo objetivou comprovar o fenótipo das células-tronco obtidas de medula óssea e tecido adiposo. Portanto, para a caracterização da cultura de TA-CTMs foram selecionados os *cluster of differentiation* (grupos de diferenciação) CD29, CD44, e CD34. Para o estabelecimento da cultura de MO-CTMs foram selecionados os *cluster of differentiation*: CD45, CD54, CD73, e CD90. Os CD29, CD44, CD54, CD73 e CD90 são, de acordo com a literatura marcadores específicos para CTMs. Os CD34 e CD45 são característicos das células-tronco hematopoiéticas. Na análise, primeiramente delimitamos a população de células a ser estudada através de regiões que são criadas em gráficos de tamanho x granulosidade. Posteriormente, utilizamos um gráfico de histograma para delimitarmos o marcador da região de controle negativo, referente às células marcadas com IgG Alexa ou um gráfico de células que não foram submetidas à marcação. Com isso, iniciamos a análise fenotípica das CTMs.



**Figura 5- Análises individuais plotadas a partir das análises fenótípicas para marcadores moleculares obtidas por citometria de fluxo das MO-CTMs de ratos Wistar. Na fig 5A, os histogramas mostram a intensidade de fluorescência de cada marcador analisado. Na fig 5B, a análise quantitativa dos controles (só células e controle de conjugado) e de cada marcador está representada em forma de gráfico.**

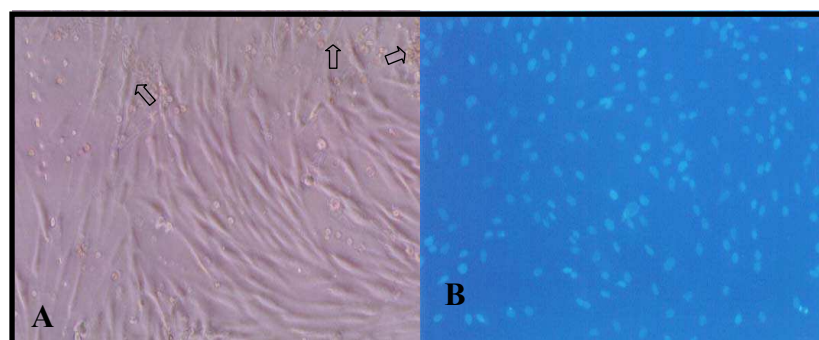




**Figura 6- Análises individuais plotadas a partir das análises fenotípicas para marcadores moleculares obtidas por citometria de fluxo das TA-CTMs de ratos Wistar. Na fig 6A os dot plots mostram a intensidade de fluorescência de cada marcador analisado. Na fig 6B, a análise quantitativa dos controles (só células e controle de conjugado) e de cada marcador está representada em forma de gráfico.**

#### **4.4- Marcação das células para rastreio**

Para verificar o destino das MO-CTMs transplantadas em retinas lesionadas com tiros do laser Nd-YAG, as células foram pré-marcadas em cultura com DAPI antes da realização do transplante.

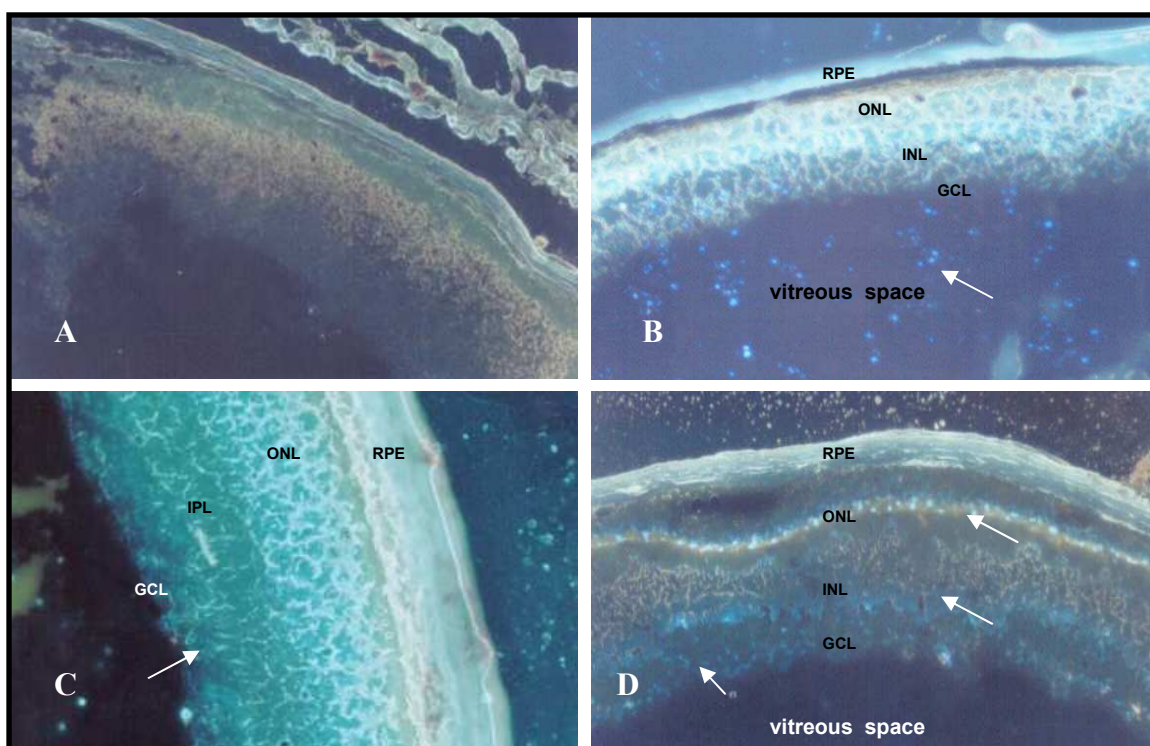


**Figura 7- Análise morfológica das MO-CTMs em cultivo e marcadas com DAPI. A figura 7A mostra uma microscopia de contraste de fase das MO-CTMs de rato Wistar em garrafas de cultura, na segunda passagem. As setas mostram a presença de células não aderentes de forma arredondada. Depois de expandir essas células até a 3ª passagem,**

obtivemos uma cultura homogênea em monocamada (MO-CTMs) a qual foi marcada com DAPI, como é mostrado na fig. 7B

#### **4.5- Padrão de migração das MO-CTMs após transplante**

Para verificar a incorporação e distribuição das células transplantadas na retina lesionada, o tecido recentemente obtido foi congelado, cortado no criostato e examinado após 2, 4 e 8 semanas após o transplante (Fig. 8). Foi observado que as células transplantadas incorporaram no tecido retiniano de forma tempo-dependente. A sobrevivência destas células foi substancial em todos os olhos transplantados e em todos os tempos avaliados. Na segunda semana (Fig. 8B), a maioria das MO-CTMs se mantiveram no espaço vítreo, na quarta semana (Fig 8C) algumas células já puderam ser encontradas na retina e na oitava semana (Fig 8D) pode-se observar uma alta taxa de incorporação de células na retina neural. Com isso, podemos inferir que as MO-CTMs transplantadas possuem capacidade de migração em direção ao tecido lesado (trofismo) e que elas são capazes de incorporar neste tecido. Esse trofismo poderia ser explicado por uma série de fatores solúveis, como retina e SDF-1 produzidos por células neurais lesionadas, e que fazem com que as células-tronco transplantadas aumentem a expressão de receptores para esses fatores e migrem para o local de lesão. No entanto, neste experimento não foi demonstrado nenhum tipo de diferenciação destas células em células retinianas, já que não foram usados anticorpos específicos para células retinianas.

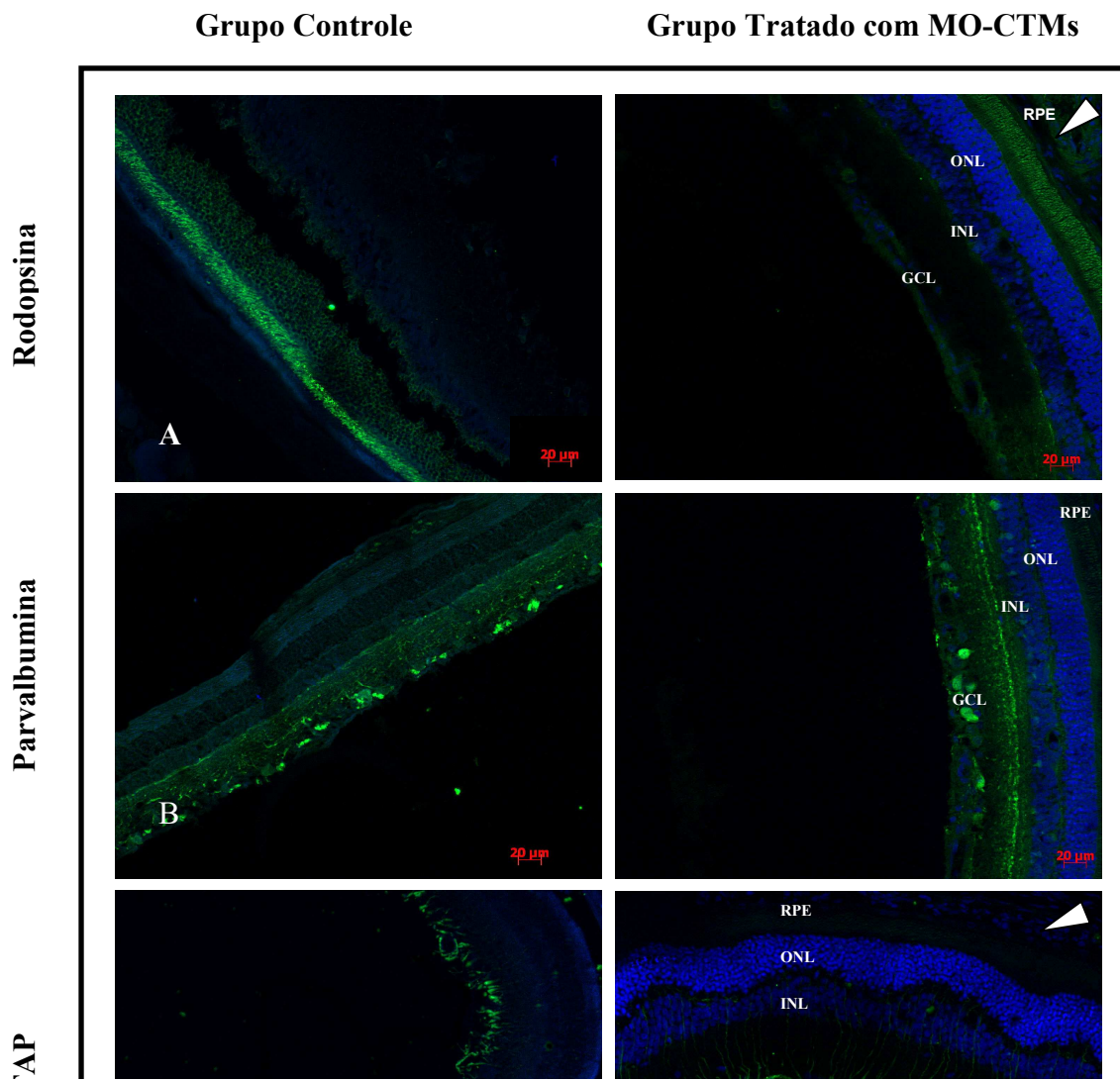


**Figura 8- Microscopia de fluorescência mostrando a migração das MO-CTMs marcadas com DAPI após transplante intravítreo em ratos cujas retinas foram lesadas por laser.** Distribuição das células transplantadas, (Fig 8B) 2 semanas após o transplante, mostrando que a maioria das células ainda se encontram no espaço vítreo, (Fig 8C) 4 semanas após o transplante, mostrando que poucas células transplantadas já se incorporaram na retina, (Fig 8D) 8 semanas após o transplante, mostrando que a maioria das células transplantadas já se encontram nas camadas ONL, INL, e GCL da retina. A figura 8A mostra um corte de retina do grupo controle, cuja retina foi lesada mas não houve administração de células-tronco. As setas mostram a localização das MO-CTMs após transplante. Aumento de 150x. Abreviações: RPE, *retinal pigment epithelium*; ONL, *outer nuclear layer*; INL, *inner nuclear layer*; GCL, *ganglion cell layer*

#### **4.6- Análise imunohistoquímica da retina**

Com o objetivo de averiguar se as MO-CTMs transplantadas e já distribuídas pelo tecido retiniano (na oitava semana) expressam marcadores específicos de células retinianas, foi realizado um ensaio de imunohistoquímica, em que o tecido retiniano foi fixado e embebido em *paraplast*. Optamos pela fixação do tecido ao invés da avaliação deste tecido fresco, pelo fato de que a fixação do tecido e sua inclusão no *paraplast* promovem uma melhor preservação de sua morfologia fazendo com que ocorra uma melhor identificação das estruturas e conseqüentemente uma análise mais adequada. A co-localização do DAPI com um dos marcadores específicos para células retinianas foi usada para avaliar a capacidade de diferenciação neural das células transplantadas. Os marcadores específicos para células retinianas usados foram a rodopsina, para bastonetes, a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para células de Muller e astrócitos, parvalbumina para células bipolares e amácrinas, e pancitoqueratina para o epitélio pigmentar da retina (EPR) (tabela 2). A maioria das

células marcadas com DAPI, as quais presumimos que sejam as MO-CTMs, incorporaram na camada nuclear externa (ONL ou CNE) e expressaram rodopsina (Fig. 9A-painel direito), e parvalbumina (Fig. 9B- painel direito), sugerindo um possível potencial para se diferenciarem em bastonetes e células amácrinas ou bipolares respectivamente. Um pequena quantidade destas células também se mostraram positivas para GFAP (Fig. 9C-painel direito), sugerindo que estas células podem possuir habilidade para se diferenciarem em astrócitos ou células de muller. Também foram observadas células marcadas com DAPI no espaço retiniano, mas estas células não expressaram marcadores retinianos específicos em nenhum momento. (Fig. 9A e D painel direito). Nos cortes de tecido retiniano do grupo controle (onde a retina lesionada recebeu somente PBS), os marcadores retinianos específicos ficaram evidentes e nenhuma fluorescência inespecífica foi observada, excluindo a possibilidade de auto fluorescência das próprias células retinianas (Fig. 9- painel esquerdo). Não houve co-localização de células marcadas com DAPI e marcadores específicos para EPR (Fig.9D-painel direito).



**Figura 9- Análise imunohistoquímica das MO-CTMs marcadas com DAPI em cortes de retinas lesionadas 8 semanas após transplante intravítreo.** As imagens localizadas no **painel esquerdo** da figura 9 mostram imunoreatividade por um marcador retiniano específico em cortes de retinas lesionadas **tratadas somente com PBS** (controle). As imagens no **painel direito** da figura mostram imunoreatividade por um marcador retiniano específico (verde), em cortes de retinas lesionadas e **tratadas com MO-CTMs**. Oito semanas após o transplante, as células transplantadas marcadas com DAPI (azul) co-expressaram rodopsina (verde-9A) , parvalbumina (verde-9B) e GFAP (verde- 9C) . Nenhuma célula transplantada co-expressou o marcador para RPE (verde-9D) ou pan-citoqueratina. As cabeças de setas no painel direito (A e D) indicam a presença de células transplantadas (azul)no espaço sub-retiniano. A imagens do grupo controle (painel esquerdo) não mostraram marcações inespecíficas. Barras de escala, 20 µm. Abreviações: RPE, *retinal pigment epithelium*; ONL, *outer nuclear layer*; INL, *inner nuclear layer*; GCL, *ganglion cell layer*.

## 4- Discussão

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura, relatam que células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea tem a capacidade de se diferenciar em células neurais retinianas *in vivo* e *in vitro*, e quando transplantadas em locais de lesão, em modelos experimentais animais, essas células tem a habilidade migrar para o local da lesão, iniciar reparo tecidual, diferenciar em células neurais e restaurar função tecidual fisiológica.

Corroborando com esses estudos, nossos resultados obtidos através de imunohistoquímica, sugerem que, se as células transplantadas (MO-CTMs) estão co-expressando marcadores específicos de células retinianas: células bipolares, amácrinas, células de muller e especialmente bastonetes; então essas células se diferenciaram, oito semanas após transplantadas no humor vítreo de olhos de ratos cujas retinas foram lesionadas, em células neurais retinianas.

No entanto, os mecanismos relativos a eventos relacionados com a diferenciação de MO-CTMs, incluindo recuperação tecidual funcional já

documentada, ainda estão sob considerável debate científico, podendo ser explicados por várias hipóteses. Plasticidade ou transdiferenciação é uma das propriedades das células-tronco mesenquimais, que poderia explicar tais eventos, no entanto, o fenômeno de fusão entre as células transplantadas e células hospedeiras tem sido proposto como uma explicação para a aparente plasticidade das CTMs (Atsma *et al.*, 2007). Um dos estudos mais importantes que evidenciou este tipo de fusão foi feito por Alvarez-Dolado *et al.* (2003); nele foi demonstrado que MO-CTM foram capazes de fundir com células de purkinge, cardiomiócitos e hepatócitos. Esse evento também foi demonstrado por Terada *et al.* (2002) que observaram que CTMs de camundongo se fundem espontaneamente com células hospedeiras, *in vivo*, adotando seu fenótipo. Estes dados devem ser considerados como uma possível explicação para a diferenciação, *in vivo*, de CTMs em tipos celulares inesperados, já que a presença de marcadores de tipos celulares específicos que caracterizariam a diferenciação podem ser resultantes de uma fusão com células hospedeiras adjacentes. Além disso, o fato de que em vários estudos as CTMs mostram uma forte propensão a melhorar uma lesão tecidual em resposta a lesões ou doenças, pode também ser explicado pela fusão destas células com células hospedeiras, já que "células fusionadas" podem se tornar uma população dominante. Isso ocorre pelo fato destas células fundidas" terem uma vantagem no crescimento e sobrevivência em relação à população de células hospedeiras (Enzmann *et al.*, 2009). Já foi também demonstrado, que as células transplantadas podem recuperar a funcionalidade de células hospedeiras lesadas através da produção de fatores solúveis, já que servem como um sistema celular local de liberação destes fatores.

Outro aspecto a ser considerado para a geração de fenótipos inesperados após transplante de MO-CTMs em tecidos lesados ou doentes é o uso indiscriminado e generalizado de corantes como DAPI, tintas orgânicas, BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina), iodeto de propídeo ou outros análogos de timidina como marcador/traceador único destas células *in vivo*. Esses marcadores são frequentemente usados exclusivamente como uma abordagem para traçar células-tronco *in vivo*, distinguí-las de células hospedeiras adjacentes e avaliar seu potencial de migração, integração e diferenciação em tecidos lesados. Este é o caso de uma grande quantidade de estudos nos quais células-tronco são transplantadas em tecidos neurais lesados, e sua posterior diferenciação em células de linhagens neurais é evidenciada pela presença destes tipos de marcadores (Klassen *et al.*, 2007; Kim *et*

*al.*, 2007; Kopen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001; Monoz-Elias *et al.*, 2004). Estas observações sugerem que MO-CTMs pode possuir uma plasticidade significativamente maior do que já foi previamente demonstrado, com potencial para diferenciação em células de diferentes folhetos embrionários. Esse é um procedimento comum não só para processos de diferenciação em linhagens ectodérmicas; vários estudos também usam o DAPI para traçar células-tronco *in vivo* ou para verificar diferenciação em linhagens mesodérmicas ou endodérmicas (Hu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Muller-Ehmsen *et al.*, 2006; Tange *et al.*, 2006; Zao *et al.*, 2008).

Estudos recentes mostram, no entanto, evidências de que no momento do transplante, muitas células transplantadas morrem (por diferenças no micro-ambiente ou por agressões físicas), e que neste momento liberam a substância química que estava sendo usada para sua marcação (como DAPI, timidina, BrDU, iodeto de propídeo, e muitos outros marcadores que usam o mesmo princípio de marcação, ou seja, captação ativa da substância pela célula em cultivo). Essa substância, no caso o DAPI, livre no micro-ambiente hospedeiro é ativamente captado pela células residentes neste local. Este evento, que ocorre *in vivo*, coloca em risco a confiabilidade e a veracidade de experimentos que utilizam tais corantes como marcadores, já que células normalmente residentes no tecido podem se tornar marcadas e confundidas com células transplantadas, o que caracterizaria um falso positivo (Burns *et al.*, 2006; Coyne *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2009)

Tendo conhecimento de tais eventos, foi feita uma análise mais criteriosa dos resultados obtidos neste trabalho através de ensaios de imunohistoquímica. Foi notado portanto, que toda a camada da retina contendo os fotorreceptores, se encontrava duplamente marcada, ou seja, seus núcleos estavam marcados com DAPI e suas membranas estavam marcadas com anticorpo anti-rodopsina, sugerindo que todas essas células eram células transplantadas (MO-CTMS) que já haviam atingido máximo grau de diferenciação em bastonetes (células retinianas altamente especializadas) e já até haviam começado a produzir rodopsina, um pigmento fotorreceptor; sugerindo recuperação da funcionalidade.

Na avaliação dos resultados obtidos, algumas considerações foram feitas e inúmeras dúvidas foram levantadas. Questões como, a probabilidade de toda a camada de fotorreceptores ter sido destruída pela lesão com laser e de ter sido totalmente repovoada por células-tronco transplantadas e a probabilidade de uma alta taxa das MO-CTMs transplantadas de migrarem e integrarem à retina surgiram. Além

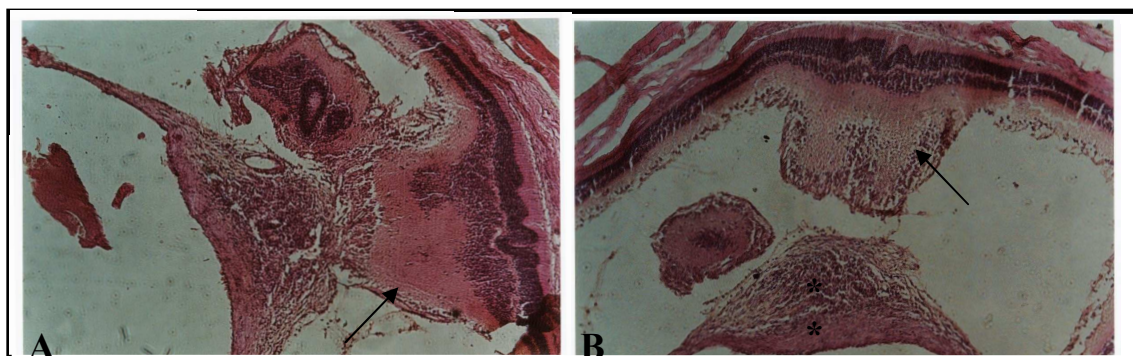


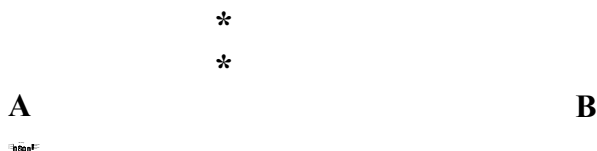
disso, a probabilidade das MO-CTMs transplantadas que integraram à retina, se diferenciarem em células retinianas altamente especializadas (como fotorreceptores) e de já exercerem suas funções fisiológicas em apenas 8 semanas é extremamente remota.

De acordo com Kicic *et al.* (2003) MO-CTMs são capazes de se diferenciar em fotorreceptores *in vivo* e *in vitro*. Sob condições especiais de cultivo, MO-CTMs se diferenciaram em fotorreceptores em 8 a 10 dias *in vitro*. No entanto a diferenciação destas células *in vivo*, após transplante em ratos com retinas distróficas, foi observada em 12 semanas.

Com isso, foi considerado inesperado, não só o fato da maioria das células se diferenciarem em fotorreceptores funcionais, mas desta diferenciação ter ocorrido, de forma completa em apenas 8 semanas. Também é improvável o fato de que as células transplantadas tenham repovoado quase toda retina neural, já que é sabido que parte das células administradas, morrem no momento do transplante e que o restante de células dificilmente teriam a capacidade de repovoar toda a retina neural em 8 semanas.

No sentido de verificar todas as questões levantadas, foi feito um experimento adicional. Neste, fizemos uma dupla marcação das MO-CTMs. O núcleo foi marcado com DAPI e o citoplasma foi marcado com Qdot, um nano cristal que emite fluorescência e precisa de um peptídeo alvo para entrar na célula. Por isso, se ocorrer morte celular durante o processo de transplante, as células marcadas com DAPI e Qdots podem liberar ambos no tecido hospedeiro, mas para o Qdot marcar células hospedeiras é preciso que existam peptídeos alvos neste meio, o que não ocorre. Duas semanas após o transplante com MO-CTMs duplamente marcadas, o tecido retiniano, também lesado por Nd-YAG laser, foi processado da mesma forma que anteriormente. Neste tempo é esperado que a maioria das células ainda se encontrem no espaço vítreo, com pouca integração. Foi feita, então, uma coloração por HE em alguns cortes (fig 10A e B) para avaliar a morfologia, e outros foram simplesmente processados a fresco para localização das células transplantadas no tecido através de sua fluorescência (fig 10C e D).





**Figura 10- Migração das MO-CTMs marcadas com DAPI e Qdot, 2 semanas após o transplante.** Nas figuras 10A e B, coradas por HE pode ser observada uma desorganização no tecido retiniano-Lesão, (setas) causadas por disparos de laser. Podemos observar também um grupo de células migrando em direção a essa lesão (asteriscos), caracterizado possivelmente pelas MO-CTMs sofrendo trofismo. Nas figuras 10 C e D é verificado também que neste grupo de células existem células duplamente marcadas com DAPI e Qdot (azul e vermelho, respectivamente) confirmando a hipótese de que estas são mesmo as células transplantadas. No entanto, as células do tecido retiniano já se encontram marcadas com DAPI (azul) figs. 10 C e D, mas não com Qdot (vermelho).

O fato de que com apenas 2 semanas após o transplante, a retina já encontrou-se totalmente marcada com DAPI e que as células duplamente marcadas (DAPI e Qdot) ainda se encontravam no espaço vítreo indica que realmente está havendo transferência do corante DAPI de células mortas transplantadas para células residentes do tecido, caracterizando um falso-positivo. Estes resultados sugerem, portanto que a difusão do DAPI é responsável pela fluorescência exibida pela células hospedeiras na retina neural e que nenhum tipo de diferenciação celular pode ser provada pelo uso desse marcador unicamente.

Atualmente, apesar do DAPI ser muito usado para tracear células transplantadas *in vivo*, a falsa marcação de tecidos hospedeiros adjacentes torna esse marcador inadequado. Diversos marcadores como análogos de timidina e corantes orgânicos também parecem ter limitações. Estudos recentes indicam que o uso de marcadores

endógenos como proteínas fluorescentes geneticamente codificados (como GFP) para, de forma adequada, traçar, avaliar migração, integração e diferenciação de células-tronco *in vivo* (Wu *et al.*, 2007).

## ***B- FASE 2***

### **3B- Materiais e Métodos**

#### **3.1B- Animais e Grupos experimentais**

Para o estudo com células marcadas **endogenamente**, foram utilizados como ratos doadores ratos LEWIS transgênicos para a proteína verde fluorescente-EGFP (LEW-Tg EGFP F455/Rrrc) de 4 a 6 semanas, adquiridos na Universidade de Missouri nos Estados Unidos e suas alterações genéticas são caracterizadas pela presença do vetor lentivírus, contendo o gene EGFP sob controle do promotor da Ubiquitina C.

Para o estudo com células marcadas **endogenamente**, foram utilizados como ratos receptores ratos tipo selvagem, *inbred* da linhagem LEWIS/H, com 10 semanas, obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas. Os experimentos foram realizados de acordo

com os princípios de Comitê de Ética em Experimentação animal (CETEA/UFMG) e aprovado de acordo com o certificado número 3/2006.

De acordo a presença e ausência de lesão retiniana e células transplantadas, os seguintes grupos experimentais foram constituídos:

**AA-** Ratos sem lesão retiniana e sem nenhum tipo de administração de fármaco ou substância (n=27) -Grupo Controle-

**BB-** Ratos com lesão retiniana transplantados com diferentes fontes de CTMs:

**BB1-** TA-CTMs EGFP - marcação **endógena**- (n=27)

**BB2-** MO-CTMs EGFP - marcação **endógena**- (n=27)

**CC-** Ratos com lesão retiniana e com injeção de PBS (n=27)

Todos os grupos foram avaliados em 3 tempos : 2 (n=9) , 4 (n=9) e 6 (n=9) semanas após a realização do transplante.

### **3.2B- Obtenção e Cultivo de células de ratos Lewis EGFP**

Para este estudo, foram utilizadas células-tronco mesenquimais provenientes de medula óssea e de tecido adiposo de ratos Lewis EGFP. A manutenção e extração de células -tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e tecido adiposo foi feita da mesma forma citada no item 3.2 da fase 1.

### **3.3B- Viabilidade e Caracterização celular de CTMs de ratos Lewis GFP**

Os testes de viabilidade celular por MTT e fosfatase alcalina foram feitos como descritos no item 3.3 e 3.4 respectivamente na fase 1.

A caracterização fenotípica das MO-CTMs e TA-CTMs EGFP foram realizadas através de citometria de fluxo e imunocitoquímica como descrito nos itens 3.5 e 3.6 da fase 1, respectivamente.

### **3.4B- Transplante intravítreo das CTMs EGFP**

Após realização da lesão com laser Nd-YAG, o transplante das MO-CTMs e TA-CTMs EGFP transcorreu da mesma forma descrita no item 3.9, no entanto o transplante celular ocorreu 7 dias após a realização das lesões induzidas por laser.

### **3.5B- Processamento dos espécimes**

Os animais foram sacrificados 2, 4, e 6 semanas após a realização do transplante. O bulbo ocular foi enucleado através de uma peritomia limbal de 360° , isolando os músculos extra oculares, e dissecando o nervo óptico no apêndice da órbita.

#### **3.5.1b- Para quantificação relativa de transcritos gênicos**

Ambos os olhos dos animais foram enucleados e congelados imediatamente a fresco em freezer -80°C para melhor preservação das estruturas. Os olhos não sofreram nenhum tipo de secção antes de serem encaminhados para extração do RNA total.

##### **3.5.1.1b – Extração do RNA total**

O RNA total foi extraído do bulbo ocular completo usando-se o reagente TRIzol (GIBCO). Todos os grupos foram avaliados, comparativamente entre o grupo experimental, e controle de forma tempo dependente quanto à:

- Sobrevivência de CTMs transplantadas, no tecido hospedeiro, através da quantificação de EGFP.
- Evolução da melhora da lesão através da quantificação de relina e do fator angiogênico VEGF e VEGF-A assim como dos receptores de VEGF como VEGFR-1 e VEGFR-2.
- Produção dos fator neurotrófico BDNF.

Para realização da extração de RNA, adicionou-se 1mL do reagente de TRIzol a cada bulbo ocular previamente congelado, sendo necessária posterior maceração completa do órgão.

A seguir, a solução foi incubada por 5 min, à temperatura ambiente . Adicionaram-se 200µl de clorofórmio, seguindo-se agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 5 min, à temperatura ambiente, seguida por centrifugação (13500 rpm, 15min, 4°C). A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 500µl de álcool isopropílico gelado. A amostra foi novamente incubada por 10min, à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugada (13500 rpm, 10min, 4°C). O sobrenadante foi retirado por inversão cuidadosa do tubo e o RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%. Após centrifugação (11500 rpm, 5min, 4°C) e descarte do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em 20µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

#### **3.5.1.2b – Quantificação do RNA**

A quantificação do RNA foi efetuada em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm.

#### **3.5.1.3b – Síntese do DNA complementar**

As amostras de RNA foram submetidas à síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o Kit Superscript III RT<sup>TM</sup> (Invitrogen, Life Technologies). O cDNA foi sintetizado a partir de 1,5µg de RNA total. A cada amostra foram adicionados os seguintes componentes: 1,0µL de 50µM oligodT e 1,0µL de 10mM dNTP's. As amostras foram incubadas por 5 min, a 65°C, seguidos por 1min, a 4°C. A cada amostra, adicionaram-se 10µL dos seguintes reagentes: 1X RT buffer, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 8mM DTT, 40U de RNaseOUT e 200U de superscript III RT<sup>TM</sup> , em volume final de 10µL. A reação ocorreu por 50min, a 50°C, seguindo-se 5min, a 85°C. A seguir, as amostras foram tratadas com 2U RNase H de *E.coli* por 20min, a 37°C.

### 3.5.1.4b– Escolha dos primers

Os desenhos dos primers utilizados foram obtidos a partir de trabalhos científicos que estavam de acordo com as especificações necessárias para o método utilizado (tabela 3).

**Tabela 3- Primers utilizados para RT-qPCR**

<b>GFP</b>	(F) 5' ACGACGGCAACTACAAGACC 3'	<b>Thews et al., 2005</b>
	(R) 5' GTCCTCCTTGAAGTCGATGC 3'	
<b>Relina</b>	(F) 5' AA ACTACAGCGGGTGG AACC 3'	<b>Haas et al., 2002</b>
	(R) 5' ATTTGAGGCATGACGGACCTATAT 3'	
<b>BDNF</b>	(F) 5' CCACAATGTTCCACCAGGTG 3'	<b>Rodrigues Hell et al., 2009</b>
	(R) 5' TGGGCGCAGCCTTCAT 3'	
<b>VEGF</b>	(F) 5' ACGAAGCGCAAGAAATCCC 3'	<b>Wiley et al., 2005</b>

	(R) 5' TTAAGTCAAGCTGCCTCGCC	
	3'	
	(F) 5' CCCTGGCTTTACTGCTGTAC	Hong <i>et</i>
VEGF-A	3'	<i>al.</i> , 2005
	(R) 5'	
	TCTGAACAAGGCTCACAGTG 3'	
	(F) 5'	Zaedi <i>et</i>
VEGFR-1	TCGGCTGTCCATGAAAGTGAAGT	<i>al.</i> , 2006
	3'	
	(R) 5'	
	GCGGGTACGCCATCTTTAAC 3'	
	(F) 5'	Wiley <i>et</i>
VEGFR-2	TAGCACGACAGAGACTGTGAGG 3'	<i>al.</i> , 2006
	(R) 5'	
	TGAGGTGAGAGAGATGGGTAGG	
	3'	
	(F) 5' TGCACCACCAACTGCTTA 3'	Hong <i>et</i>
GAPDH	(R) 5' GGATGCAGGGATGATGTTC	<i>al.</i> , 2005
	3'	

### 3.5.1.5b – Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real

O cDNA produzido com descrito no item 3.10.2.3 foi utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real. Esta técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou de um corante fluorescente, na fita recém sintetizada.

As reações, feitas sempre em quadruplicata, foram realizadas utilizando-se os cDNA produzidos, primers específicos para cada gene analisado e o reagente SyberGreen PCR Master Mix ® (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl<sub>2</sub>, tampão, Taq Ampli-Gold), continha o corante SYBRGreen, componente intercalante de dupla fita. Em todos os casos foram feitos controles negativos, contendo água estéril em substituição a amostra. Todo procedimento para a PCR em tempo real foi feito na plataforma de



instrumentação *ABI Prism 7900* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando-se 45 ciclos de 15 seg a 95°C para desnaturação, 1 min a 60°C para anelamento e 1min a 75°C para extensão, seguido de mais 10 min a 75°C para o término da reação. Os resultados foram apresentados pelo programa *GeneAmp® 5700 SDS* (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou *Ct*. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e conseqüentemente, menor é o *Ct*.

### **3.5.1.6b – Padronizações**

#### **3.5.1.6.1b – Concentração do primer**

A concentração ótima do primer a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias dos genes presentes na amostra. Utilizando-se a mesma quantidade de amostra foram feitas reações contendo cada um dos primers (*forward* e *reverse*) na concentração final de 150nM, 300nM,600nM. Se o aumento da concentração do primer ocasionou diminuição de *Ct*, a quantidade deste reagente na reação ainda era insuficiente. Assim, a concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor *Ct*.

#### **3.5.1.6.2b – Especificidade de amplificação**

A especificidade pôde ser verificada pela temperatura de desnaturação do produto amplificado, que depende de seu tamanho e constituição de nucleotídeos. A temperatura teórica foi predita pelo programa “*Primer Express*” (Applied Biosciences), e experimentalmente, foi determinada ao final do programa de amplificação , em protocolo de dissociação, que constituiu em aumento gradativo de temperatura de 60°C a 95°C. A temperatura de denaturação é aquela em que se observou queda brusca de fluorescência, ocasionada pela separação das duas fitas e liberação do intercalante. Assim, a especificidade da amplificação foi verificada a partir de uma única temperatura de dissociação para cada segmento gênico

amplificado em todas as amostras testadas. Em todos os resultados obtidos foi observado somente um pico na curva de dissociação, sugerindo a presença de somente um amplicon.

### **3.5.1.7b – Reações**

Tendo sido feitas todas as padronizações, as reações realizadas continham 10µL do reagente SyberGreen PCR Master Mix ® (Applied Biosystems), 25ng de amostra de cDNA e a concentração ótima de primer determinada, perfazendo um volume final de 20µL.

### **3.5.1.8b – Análise dos dados**

A expressão dos genes de interesse foi determinada de forma relativa, sendo normalizada com relação a genes chamados calibradores. Estes são genes cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Os níveis relativos do mRNA alvo foram normalizados de acordo com o controle endógeno GAPDH. A expressão foi avaliada com base no constitutivo (GAPDH) e no calibrado (grupo A- controle), a partir do Ct destes grupos para cada gene testado.

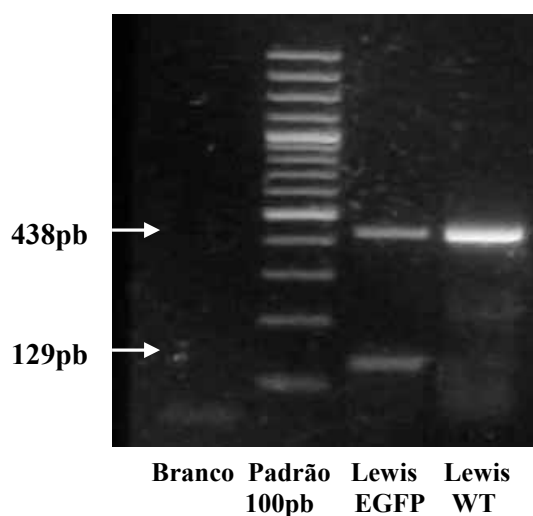
A análise foi feita a partir da média aritmética do Ct de cada quadruplicata, utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001), onde  $\Delta\Delta Ct = [Ct(\text{gene}) - Ct(\text{GAPDH})] - [Ct(\text{calibrador}) - Ct(\text{GAPDH})]$ .

Os dados foram analisados através do teste *t de student* (dados não paramétricos), assumindo-se  $p < 0,05$ (\*).

## 4B- Resultados

Visando um resultado sem falsos positivos e mais consistente, optamos pelo uso de células-tronco mesenquimais marcadas endogenamente com EGFP (*Enhanced green fluorescent protein*). Esse marcador é considerado, por inúmeros autores, um marcador de longa viga confiável para validar terapias celulares no que se diz respeito a rastreio, migração, sobrevivência e diferenciação celular.

As CTMs-EGFP foram extraídas de ratos transgênicos isogênicos da linhagem Lewis que expressam EGFP em todos os seus tecidos. Esses ratos possuem alterações genéticas caracterizadas pela presença do vetor lentivirus, contendo o gene EGFP sob controle do promotor da ubiquitina C. A GFP tem sido amplamente adotada para rastreamento de linhagens celulares em diversos tipos de experimentos *in vivo*. É facilmente detectada em células ou tecidos vivos, congelados ou fixados e é detectada com alta sensibilidade e especificidade, em suspensão de células, por citometria de fluxo.

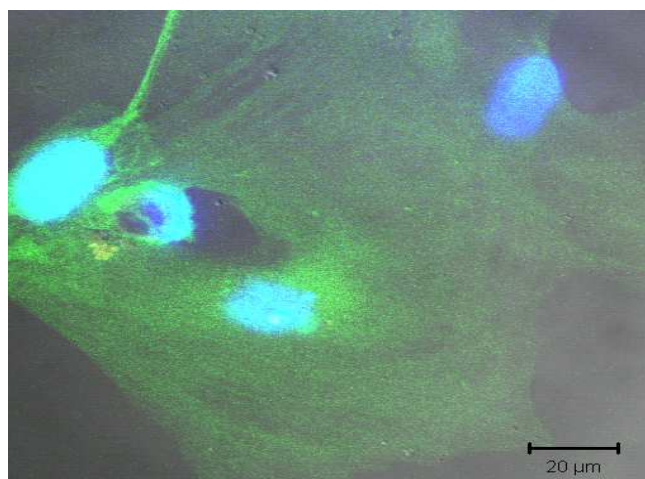


**Figura 11 – Genotipagem dos ratos Lewis transgênicos EGFP.** A partir da imagem obtida através de um gel de agarose de um ensaio de PCR para identificar ratos homocigotos e heterocigotos EGFP, a canaleta contendo DNA de ratos lewis EGFP mostra a presença de duas bandas distintas, sendo a banda com 438 pb relativa ao alelo selvagem (WT) e a banda de 129 pb diz respeito ao alelo transgênico EGFP; indicando que este rato é EGFP heterocigoto. Já a canaleta contendo DNA de ratos Lewis selvagens apresenta somente uma banda de 438 pb , indicando que este rato é selvagem homocigoto. Desta forma foi

padronizado o ensaio para diferenciação dos ratos transgênicos EGFP dos ratos selvagens (WT)

#### **4.1B- Morfologia das Células-Tronco Mesenquimais isoladas de medula óssea e tecido adiposo de ratos Lewis EGFP**

A morfologia das células-tronco isoladas de medula óssea e tecido adiposo de ratos Lewis transgênicos em cultura com meio de cultivo celular DMEM - 10% SFB, assumiram a forma fusiforme alongada com núcleo central e alguns prolongamentos, assim como as CTMs de ratos normais (que não expressam EGFP). Essas células também apresentam altas taxas replicativas e são aderentes as garrafas de cultivo celular (Figura 12).

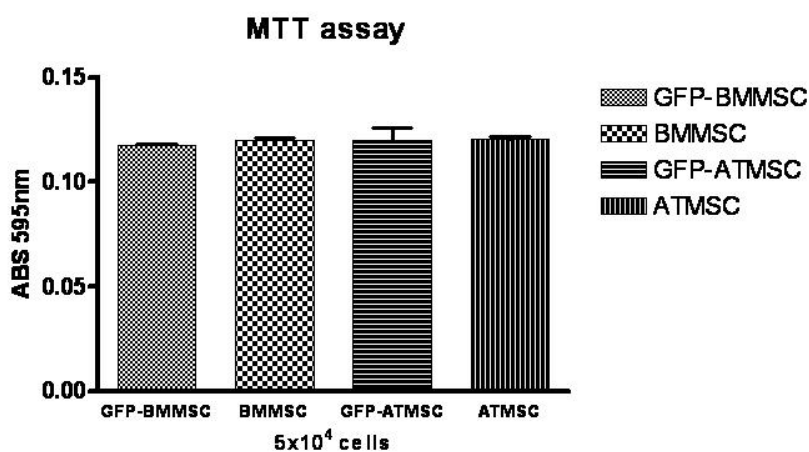


**Figura 12- Cultura celular de células-tronco isoladas de ratos Lewis EGFP.** Documentação fotográfica das células-tronco EGFP, cujos núcleos foram marcados com DAPI, após 3ª passagem, ao microscópio de fluorescência.

#### **4.2B- Análise das atividades enzimáticas das células-tronco mesenquimais isoladas de medula óssea e de tecido adiposo de ratos Lewis EGFP.**

Com o intuito de verificar a viabilidade das MO-CTMs e das TA-CTMs, provenientes de ratos EGFPs, durante o cultivo, foram analisados, em ensaio de metabolização do MTT a condição replicativa dessas células, na 3ª passagem. Os resultados plotados no gráfico (ver fig 13) apontam para uma capacidade replicativa semelhantes entre as células de medula óssea e de tecido adiposo. Para a detecção da

atividade enzimática das células-tronco EGFP também foi realizado o ensaio da atividade da Fosfatase alcalina. Esse ensaio foi feito de forma comparativa entre as células-tronco EGFP e as células-tronco sem marcação, após a 3<sup>o</sup> passagem. A degradação do substrato, catalizado pela fosfatase alcalina (AP), enzima característica e presente em grande quantidade nas células-tronco foi quantificado e plotada em gráfico de barras, onde verifica-se um padrão semelhante da atividade desta enzima nas células que expressam EGFP e que não a expressam. (ver fig 14).

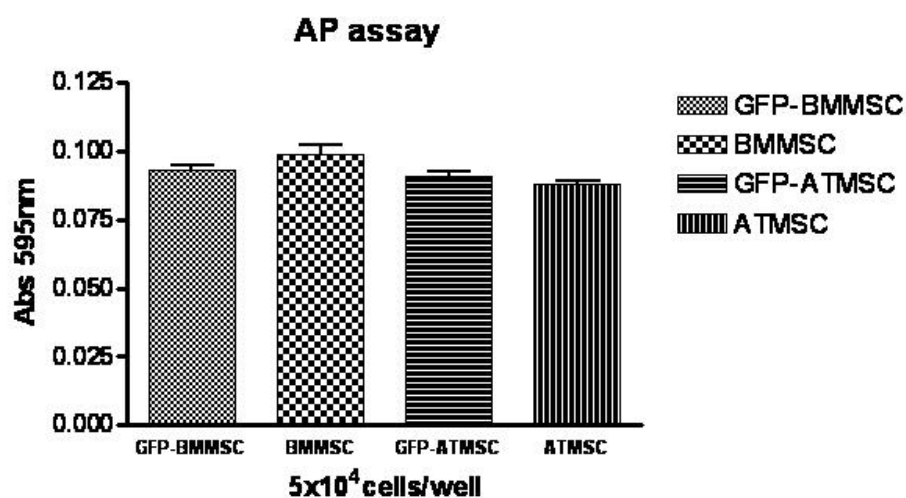


**Figura 13- Análise da atividade enzimática do MTT em CTMs de ratos lewis EGFP.**

Ensaio de MTT realizado inicialmente com  $5 \times 10^5$  células/poço. Podemos observar um padrão semelhante na atividade do MTT (estado de ativação das células e viabilidade) nas MO-CTMs e TA-CTMs que não expressam e que expressam EGFP.

**Legenda: BMMSC: MO-CTMs**

**ATMSC: TA-CTMs**



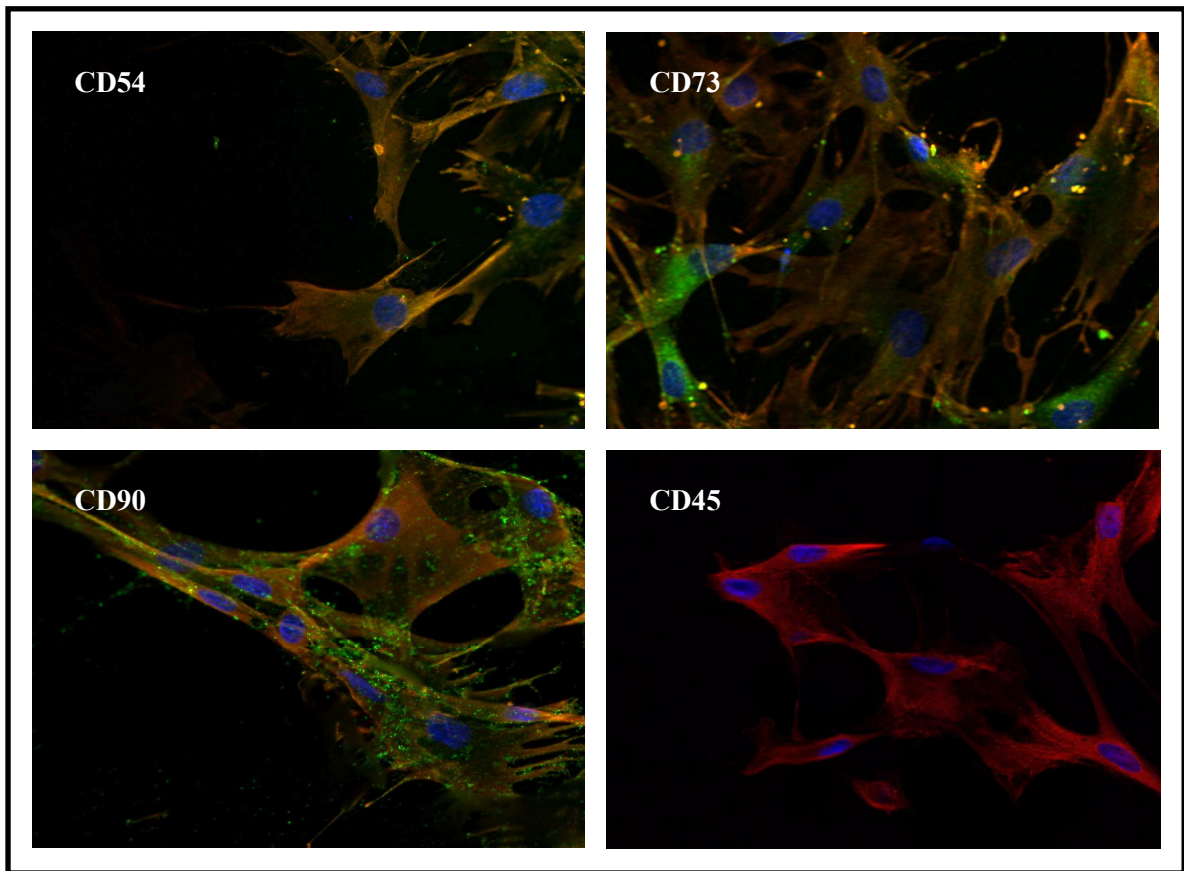
**Figura 14-** Análise da atividade enzimática da fosfatase alcalina (AP) em CTMs de ratos lewis EGFP. Ensaio de AP realizado inicialmente com  $5 \times 10^5$  células/poço. Podemos observar um padrão semelhante na atividade de fosfatase alcalina nas MO-CTMs e TA-CTMs que não expressam e que expressam EGFP.

**Legenda:** BMMSC: MO-CTMs

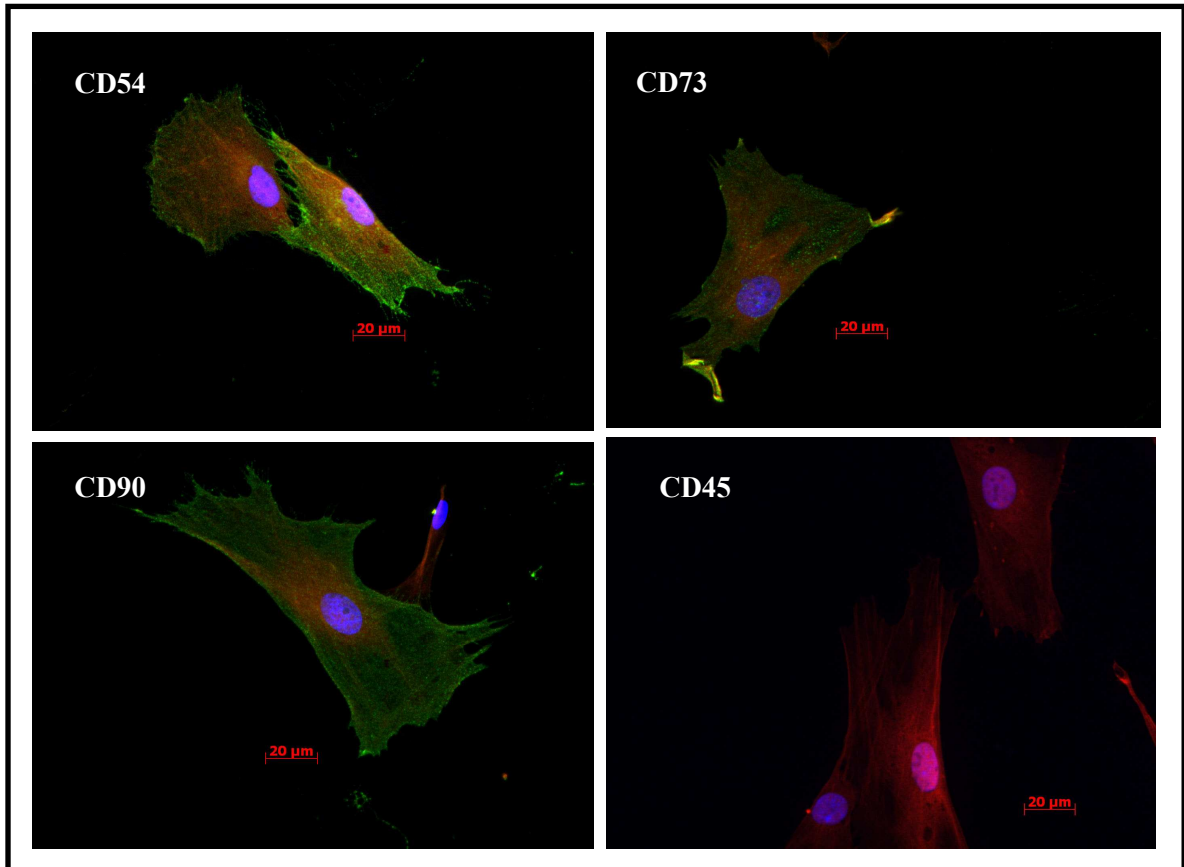
ATMSC: TA-CTMs

#### **4.3B- Análise fenotípica das CTMs por Imunocitoquímica (ICC)**

A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios morfológicos de imunocitoquímica objetivou comprovar de forma qualitativa, o fenótipo das células-tronco obtidas de medula óssea e tecido adiposo de rato Lewis EGFP sendo co-expresso com a EGFP. Essa análise foi feita em células em cultivo após a 3<sup>o</sup> passagem. Portanto, para o estabelecimento da cultura de TA-CTMs (Fig 15) e de MO-CTMs (Fig 16) foram selecionados os *cluster of differentiation* CD45, CD54, e CD73 e CD90. A co-localização da expressão dos CD (verde) e da EGFP (vermelho) foi feita através de sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo.



**Figura 15- Caracterização das TA-CTMs por imunocitoquímica.** As figuras acima mostram que as TA-CTMs co-expressam o EGFP (vermelho) com os respectivos CDs (54, 73, 90) , identificados acima de cada figura, tradicionalmente expressos pelas CTMs, mas não expressam o CD45 (marcador específico para células hematopoiéticas).

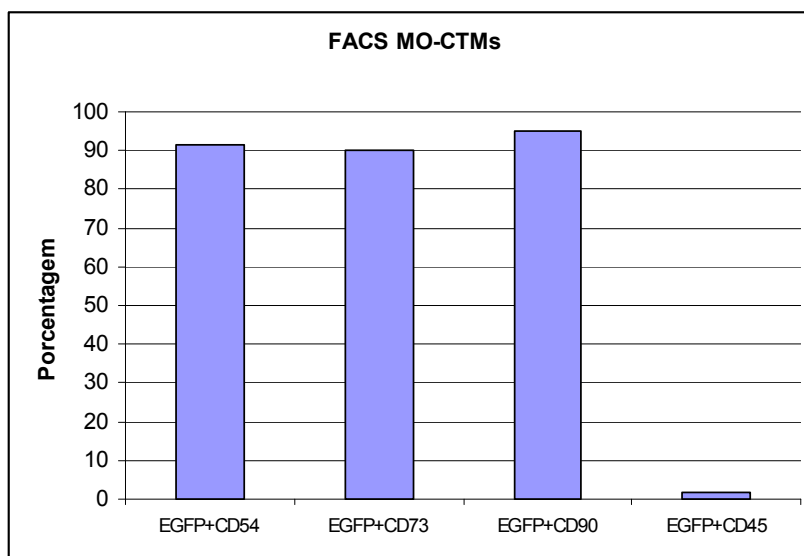


**Figura 16- Caracterização das MO-CTMs por imunocitoquímica.** As figuras acima mostram que as MO-CTMs co-expressam o EGFP (vermelho) com os respectivos CDs (54, 73, 90) , identificados acima de cada figura, tradicionalmente expressos pelas CTMs, mas não expressam o CD45 (marcador específico para células hematopoiéticas).

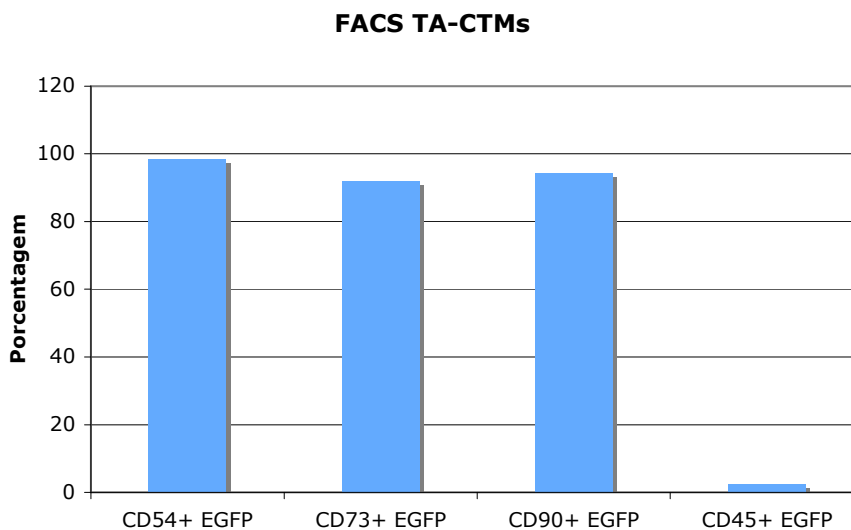
#### **4.4B- Análise fenotípica das CTMs por Citometria de Fluxo (CF)**

A visualização da presença dos marcadores celulares em ensaios de citometria de fluxo objetivou comprovar de forma quantitativa, a co-expressão do fenótipo das células-tronco obtidas de medula óssea com EGFP. Essa análise foi feita em células em cultivo após a 3<sup>o</sup> passagem. Portanto, para o estabelecimento da cultura de MO-CTMs e TA-CTMs foram selecionados os CD45, CD54, e CD73 e CD90 (Fig 17 e Fig 18).





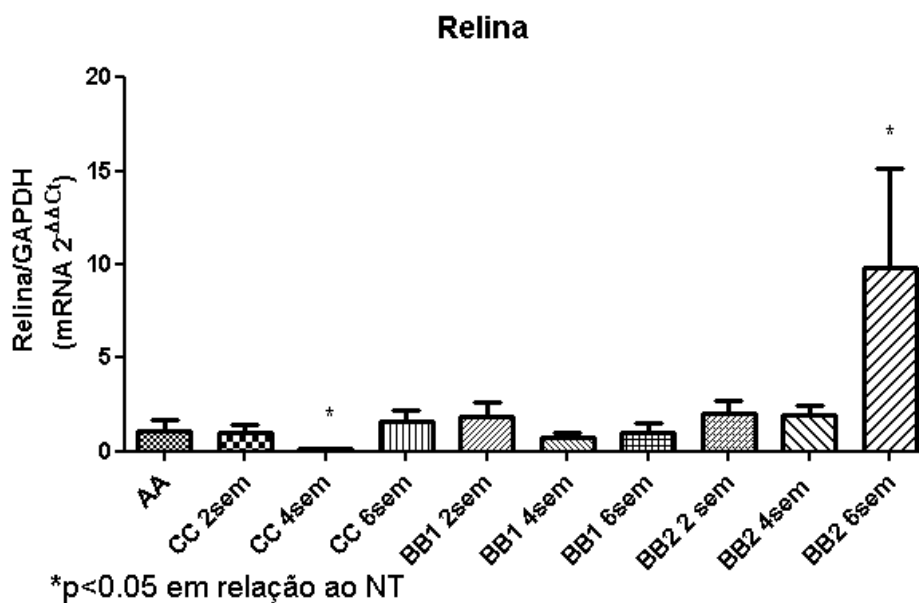
**Figura 17- Análise fenotípica por citometria de fluxo das MO-CTMs EGFP.** O gráfico mostra que 91,51% da população células analisadas co-expressam EGFP com CD54, 90,06% co-expressam EGFP com CD73, 95% co-expressam EGFP com CD90 e apenas 1,93% co-expressam EGFP com CD45.



**Figura 18- Análise fenotípica por citometria de fluxo das TA-CTMs EGFP.** O gráfico mostra que 98,41% da população células analisadas co-expressam EGFP com CD54, 92,12% co-expressam EGFP com CD73, 94,3% co-expressam EGFP com CD90 e apenas 2,49% co-expressam EGFP com CD45

#### **4.5B- Quantificação relativa dos transcritos gênicos**

Para avaliar a evolução da lesão feita laser Nd-YAG no tecido retiniano, a quantificação dos transcritos gênicos para relina foi determinada por PCR em tempo real (Fig 19). Tal quantificação também permite inferir sobre a possível migração das CTMs transplantadas, já que a relina age como fator quimiotático. No grupo com lesão mas sem a presença de CTMs transplantadas, após 4 semanas, houve uma redução na quantidade de transcritos para relina significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (animais sem lesão na retina). Houve, no entanto, após 6 semanas, um aumento significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de transcritos para relina, no grupo cujas retinas lesionadas foram transplantadas com MO-CTMs. Isso significa que as retinas lesadas dos animais que não receberam CTMs codificam, na 4<sup>o</sup> semana, 0,1 vezes menos RNAm para relina quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, as retinas lesadas dos animais que receberam MO-CTMs codificam, na 6<sup>o</sup> semana, 8,8 vezes mais RNAm para relina quando comparado ao grupo controle. Em relação a comparações inter grupos, cabe dizer que o aumento da expressão de transcritos para relina na 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> semanas do grupo que recebeu MO-CTMs é significativamente maior que no grupo que recebeu TA-CTMs. Nos outros grupos avaliados não houve aumento ou diminuição significativos ( $p < 0,05$ ) de transcritos de relina, comparativamente ao grupo controle (Fig 19).



**Figura 19- Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para relina, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH.** Observam-se quantidades significativamente menores de transcritos para relina, na 4<sup>o</sup> semana, no grupo sofreu lesão mas não recebeu CTMs. Houve, no entanto, aumento significativo de transcritos para relina, na 6<sup>o</sup> semana, no grupo cujas retinas lesionadas foram transplantadas com MO-CTMs. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos. Sendo:

**AA-** Ratos sem lesão retiniana e sem nenhum tipo de administração de fármaco ou substância (n=27) -Grupo Controle- 2,4 e 6 semanas após transplante.

**BB-** Ratos com lesão retiniana transplantados com diferentes fontes de CTMs:

**BB1-** TA-CTMs EGFP - 2,4 e 6 semanas após transplante. (n=27)

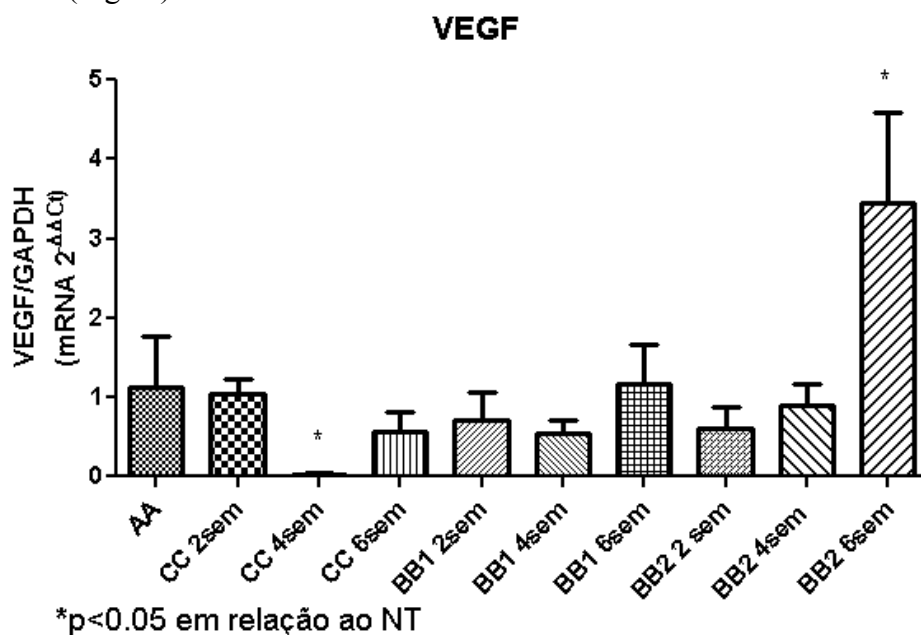
**BB2-** MO-CTMs EGFP -2,4 e 6 semanas após transplante. (n=27)

**CC-** Ratos com lesão retiniana e com injeção de PBS 2,4 e 6 semanas após transplante. (n=27)

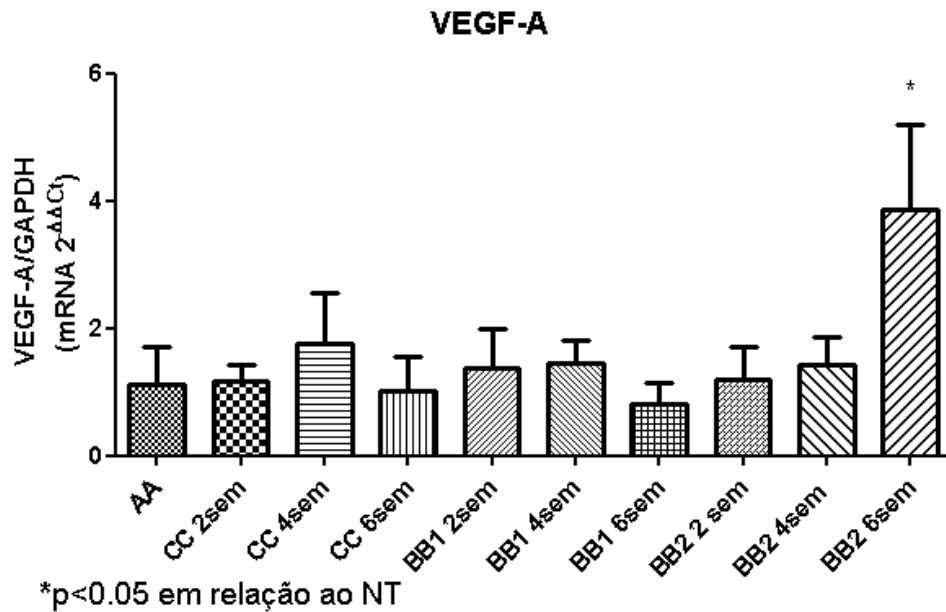
Fatores angiogênicos (VEGF e VEGF-A), assim como seus receptores (VEGFR-1 e VEGFR-2), também são importantes no estudo da evolução de lesões retinianas, já que a angiogênese ocorre em situações patológicas como uma tentativa de reparação de danos teciduais (Fig 20). No grupo com lesão mas sem a presença de CTMs transplantadas, após 4 semanas, houve uma redução na quantidade de transcritos para VEGF significativa ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle. Mas da mesma forma que ocorreu com a relina houve, após 6 semanas, um aumento significativamente maior ( $p<0,05$ ) de transcritos para VEGF, no grupo cujas retinas

lesionadas foram transplantadas com MO-CTMs. Isso significa que as retinas lesadas dos animais que não receberam CTMs codificam, na 4<sup>o</sup> semana, 0,03 vezes menos RNAm para VEGF quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, também corroborando com os resultados obtidos para retina, as retinas lesadas dos animais que receberam MO-CTMs codificam, na 6<sup>o</sup> semana, 3,3 vezes mais RNAm para VEGF quando comparado ao grupo controle. Em relação a comparações inter grupos, é importante ressaltar que o aumento da expressão de transcritos para VEGF e VEGF-A na 6<sup>o</sup> semana do grupo que recebeu MO-CTMs é significativamente maior que no grupo que recebeu TA-CTMs, no mesmo tempo de avaliação. Nos outros grupos avaliados não houve aumento ou diminuição significativos ( $p < 0,05$ ) de transcritos de VEGF, comparativamente ao grupo controle (Fig 20).

Em relação ao VEGF-A (principal tipo encontrado no olho), nenhum grupo avaliado apresentou aumento ou diminuição significativos ( $p < 0,05$ ) de transcritos deste fator (Fig 21).

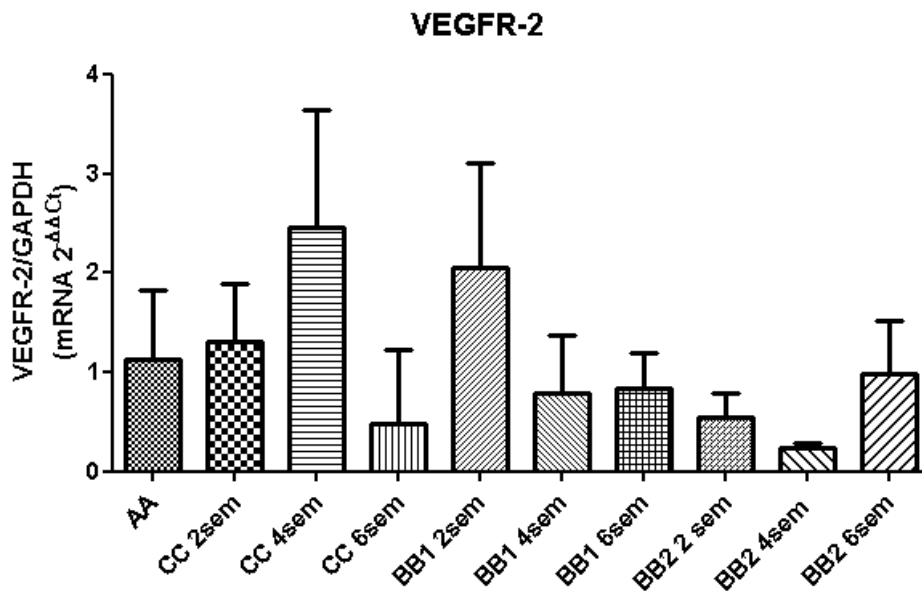


**Figura 20- Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGF, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH.** Observam-se quantidades significativamente menores de transcritos para VEGF, na 4<sup>o</sup> semana, no grupo sofreu lesão mas não recebeu CTMs. Houve, no entanto, aumento significativo de transcritos para VEGF, na 6<sup>o</sup> semana, no grupo cujas retinas lesionadas foram transplantadas com MO-CTMs. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos.

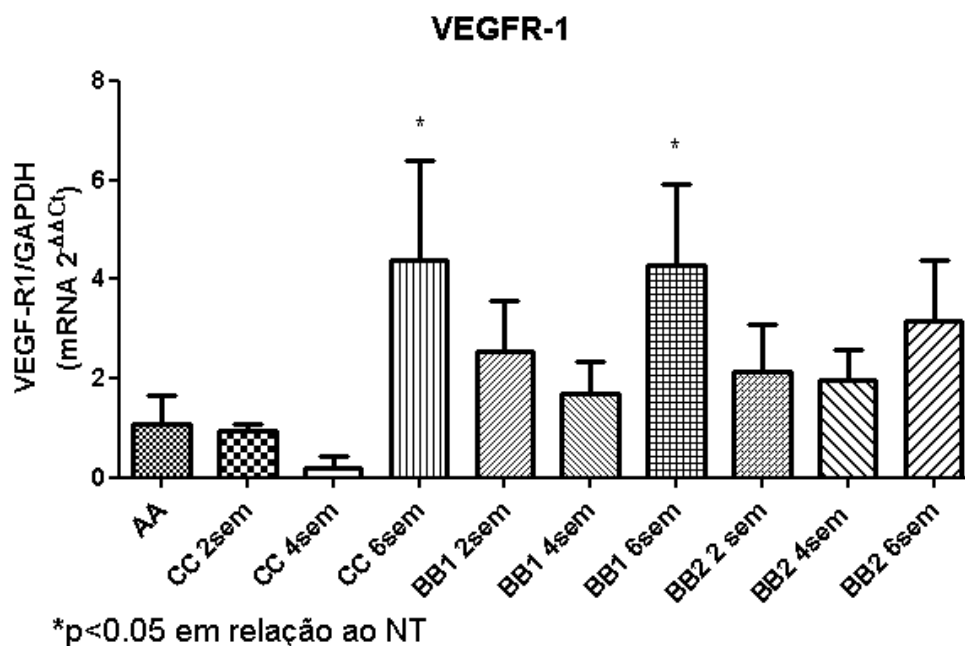


**Figura 21-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGF-A, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. Nenhum grupo avaliado apresentou aumento ou diminuição significativos de transcritos de VEGF-A. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos.

No que se diz respeito a análise dos receptores de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2, somente VEGFR-1 apresentou diferença significativa em sua produção quando comparado ao grupo controle (Fig 22 e 23). Houve, após 6 semanas, um aumento significativamente maior ( $p < 0,05$ ) de transcritos para VEGFR-1, no grupo cujas retinas lesionadas foram transplantadas com TA-CTMs. Isso significa que as retinas lesadas dos animais que receberam TA-CTMs codificam, na 6<sup>o</sup> semana, 4 vezes mais RNAm para VEGFR-1 quando comparado ao grupo controle (Fig 23).



**Figura 22-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGFR-2, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. Nenhum grupo avaliado apresentou aumento ou diminuição significativos de transcritos de VEGFR-2. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos.



**Figura 23-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para VEGFR-1, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. Observam-se quantidades significativamente maiores de transcritos para VEGFR-1, na 6<sup>o</sup> semana, no grupo cujas retinas lesionadas foram transplantadas com TA-CTMs. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos.

Para a avaliação da sobrevivência das CTMs transplantadas foi feita a quantificação dos transcritos gênicos para EGFP, também determinada por PCR em tempo real (Fig 24). Todos os grupos com lesão retiniana que receberam CTMs transplantadas, seja AT-CTMs ou MO-CTMs, apresentaram em todos os tempos avaliados, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na quantidade de transcritos para EGFP em relação ao grupo controle (animais sem lesão retiniana). Em relação ao grupo, com retinas lesadas, que receberam TA-CTMs, houve:

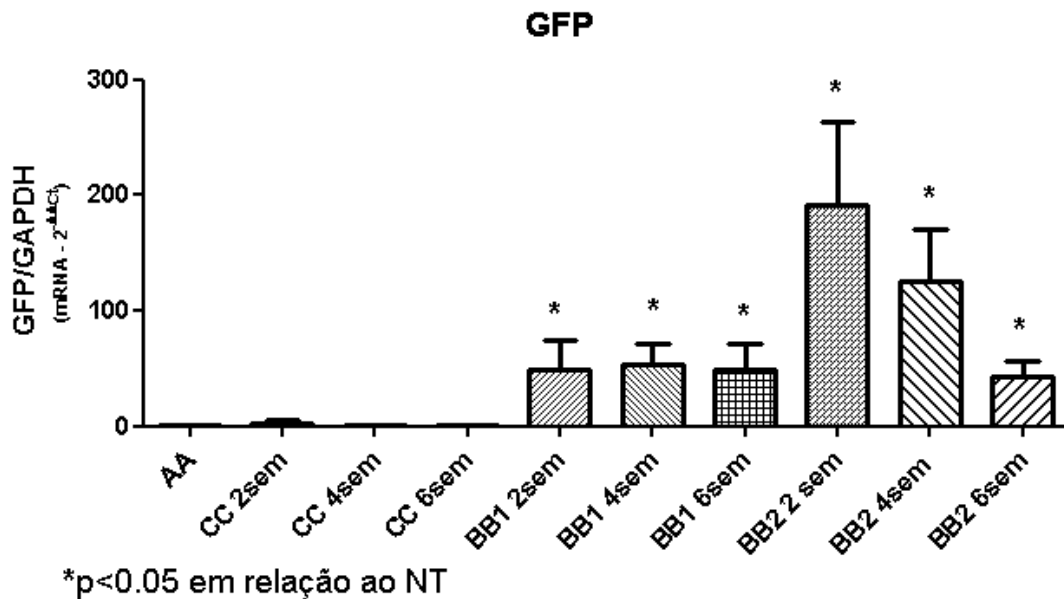
- Na 2<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 45 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.
- Na 4<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 51 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.
- Na 6<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 45 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.

Em relação ao grupo, com retinas lesadas, que receberam MO-CTMs, houve:

- Na 2<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 182 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.
- Na 4<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 119 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.
- Na 6<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 45 vezes na codificação de RNAm para EGFP em relação ao grupo controle.

Em relação a comparações inter grupos, é importante ressaltar que o aumento da expressão de transcritos para EGFP na 2<sup>o</sup> semana do grupo que recebeu MO-CTMs é significativamente maior que no grupo que recebeu TA-CTMs, no mesmo tempo de avaliação. Nos outros grupos cujas retinas lesadas não receberam CTMs transplantadas não houve aumento ou diminuição significativos ( $p < 0,05$ ) de transcritos de GFP, comparativamente ao grupo controle (Fig 24).

A quantificação dos transcritos foi normalizada em relação à media do calibrador endógeno GAPDH. Como controle, foi utilizado cDNA de retinas sem lesão.



**Figura 24-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para EGFP, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. Observam-se que todos os grupos com lesão retiniana que receberam CTMs transplantadas (AT-CTMs ou MO-CTMs) apresentaram, em todos os tempos avaliados, aumento significativo na quantidade de transcritos para EGFP em relação ao grupo controle. A legenda está de acordo com a nomenclatura dos grupos apresentados no item 3.1B (grupos experimentais), na seção 3B materiais e métodos.



Para avaliar a diferença na produção, entre grupos experimentais, do fator neurotrófico BDNF e inferir sobre neuroproteção induzida por CTMs no tecido retiniano lesado, a quantificação dos transcritos gênicos para este fator foi determinada por PCR em tempo real (Fig 25).

Todos os grupos com lesão retiniana que receberam CTMs transplantadas, seja AT-CTMs ou MO-CTMs, apresentaram em todos os tempos avaliados, um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na quantidade de transcritos para BDNF em relação ao grupo controle. Esses resultados apresenta-se de forma semelhante aos resultados obtidos pela análise de EGFP. Em relação ao grupo, com retinas lesadas, que receberam TA-CTMs, houve:

- Na 2<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 10 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.
- Na 4<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 14 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.
- Na 6<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 12 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.

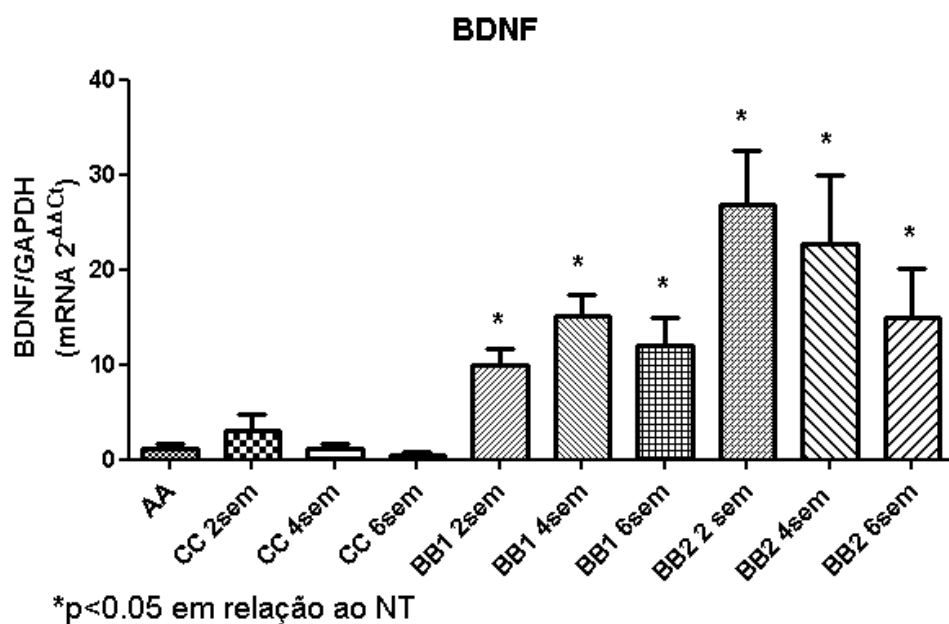
Em relação ao grupo, com retinas lesadas, que receberam MO-CTMs, houve:

- Na 2<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 27 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.
- Na 4<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 21 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.
- Na 6<sup>o</sup> semana, após transplante, aumento de 14 vezes na codificação de RNAm para BDNF em relação ao grupo controle.

Em relação a comparações inter grupos cabe relatar que, da mesma forma que ocorreu na quantificação de transcritos para EGFP, o aumento da expressão de transcritos para BDNF na 2<sup>o</sup> semana do grupo que recebeu MO-CTMs também é significativamente maior que no grupo que recebeu TA-CTMs, no mesmo tempo de avaliação. Nos outros grupos cujas retinas lesadas não receberam CTMs transplantadas não houve aumento ou diminuição significativos ( $p < 0,05$ ) de transcritos de BDNF, comparativamente ao grupo controle (Fig 25).

A quantificação dos transcritos foi normalizada em relação à media do calibrador endógeno GAPDH. Como controle, foi utilizado cDNA de retinas sem

lesão.



**Figura 25-** Representação gráfica da quantificação relativa dos transcritos para BDNF, obtida em unidades arbitrárias, normalizados em relação ao gene constitutivo GAPDH. Observam-se que todos os grupos com lesão retiniana que receberam CTMs transplantadas (AT-CTMs ou MO-CTMs) apresentaram, em todos os tempos avaliados, aumento significativo na quantidade de transcritos para BDNF em relação ao grupo controle.

## 5B- DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) contribuem na regeneração de cartilagem, gordura, ossos, músculos, tecido neural e estroma (Pittenger *et al.*, 1999) e a expansão destas células, provenientes de diversas fontes, tem sido explorada para o uso clínico nas mais variadas áreas (Horwitz *et al.*, 2002; Le Blanc 2006; Makino *et al.*, 1999).

As CTMs isoladas da medula óssea já demonstraram potencial adipogênico, osteogênico e condrogênico, além de possuírem a capacidade de transdiferenciação. O procedimento de retirada das MO-CTMs, no entanto, é considerado invasivo e doloroso, além das CTMs representarem apenas 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea (Pittenger *et al.*, 1999). Quando comparadas às MO-CTMs, as TA-CTMs apresentam as mesmas características e são igualmente capazes de se diferenciarem em células e tecido de linhagens mesodérmicas, além de também apresentarem plasticidade. Pelo fato do tecido adiposo ser um tecido que está em toda parte e ser facilmente obtido, este tecido é muitas vezes, a fonte de escolha para obtenção de CTMs destinadas a terapias celulares autólogas.

Neste estudo, através de análises comparativas, observa-se que as CTMs derivadas da medula óssea e do tecido adiposo apresentam as mesmas características morfológicas e fenotípicas. No entanto, como será discutido adiante, estas células apresentam comportamentos diferentes, *in vivo*, quando utilizadas como fonte de terapias celulares visando a regeneração de retinas lesadas. Sabe-se, contudo, que a escolha do tipo celular adequado para a terapia celular deve ser direcionada pela natureza do tecido que está sendo tratado e pelo efeito terapêutico desejado.

Além da escolha do tipo celular a ser utilizado, outro fator importante a ser avaliado, no estudo de terapias celulares para lesões retinianas é a via preferencial para transplantar essas células no bulbo ocular. Existem atualmente duas formas de transplante descritas na literatura. A via subretiniana e a intravítrea. O acesso subretiniano, para transplante de CTMs requer um procedimento invasivo arriscado, conhecido como vitrectomia. Já a via intravítrea, por ser menos invasiva, é para alguns autores, um método mais atraente no transplante de células-tronco (Williamson &

O'Donnell, 2005). Contudo, a via preferencial para administração de CTMs visando alcance retiniano é controverso (Hill *et al.*, 2009).

Após administração de CTMs, no espaço intravítreo de olhos cujas retinas foram lesadas, é esperado que estas células incorporem no tecido hospedeiro e se diferenciem em células retinianas. De acordo com Chacko *et al* (2000), a ampla migração e diferenciação de CTMs foi observada somente quando a retina se encontrava lesada ou doente (Young *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2000). Esses tipos de injúrias são capazes de promover um meio local (com interleucinas, quimiotaxinas, fatores de crescimento e inflamatórios) que pode ser responsável pela migração e incorporação de células exógenas administradas.

Sabe-se, no entanto, este evento é tempo dependente, ou seja dependendo das diferentes fases em que a resolução da lesão ocorre, um tipo diferente de microambiente é formado. Dependendo, então, do momento em que é feita a administração de CTMs após lesão, esta pode propiciar um microambiente mais ou menos favorável à estas células.

Diferentes microambientes criados nos diferentes momentos da resolução da lesão podem tanto influenciar na sobrevivência das células transplantadas, quanto direcionar seu tipo de diferenciação na tentativa de regeneração. Com isso, vários pesquisadores têm buscado o melhor momento para se fazer um transplante celular pós lesão. De acordo com Ogawa *et al*, (2002), a realização de transplante celular, na medula espinhal de ratos, em fase aguda, pós-lesão não só leva a uma queda significativa na sobrevivência das células transplantadas como também favorece a diferenciação destas células em astrócitos. Já a administração destas células na fase sub-aguda (9 dias pós lesão), leva a um aumento na sobrevivência celular, assim como uma tendência maior de algumas células a se diferenciarem em oligodendrócitos (importantes no processo de remielinização das fibras lesadas), havendo ainda maior diferenciação celular em astrócitos.. Segundo o autor, isso se deve ao fato de que nesta fase, o microambiente ao redor da lesão ter mudado para a fase onde a inflamação generalizada cessa.

Outro estudo relata que as principais diferenças entre o transplante imediato de células (na fase aguda da lesão) e o tardio (da fase crônica em diante) são, o local onde as células são encontradas e os tipos celulares em que estas células se diferenciam (Okada *et al.*, 2005; Hooshmand *et al.*, 2009). As células transplantadas de forma imediata, se encontram em maior quantidade na própria lesão e expressam,

*in vivo*, o marcador GFAP, sugerindo que estas células participaram na formação da cicatriz glial. Já as células transplantadas tardiamente, foram encontradas em maior quantidade ao redor da lesão e grande parte delas apresentaram, o marcador neuronal Hu ou o marcador de oligodendrócitos APC. Esse dados sugerem que o microambiente formado pela lesão apresentou influência distinta na diferenciação das células transplantadas; sugerindo melhores resultados portanto, em transplantes tardios, que imediatos.

Apesar da grande variedade de estudos que demonstram diferenciação de células-tronco, *in vivo*, alguns trabalhos mostram que as CTMs não demonstram capacidade de regeneração através da sua diferenciação em células do tecido hospedeiro lesado (Javazon *et al.*, 2004; Grinnemo *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2002).

Hill *et al* (2009) demonstrou que CTMs derivadas de cordão umbilical não foram capazes de se diferenciar em células de linhagem neural ou de integrar no tecido retiniano de ratos, com lesão no nervo óptico. Várias suposições a respeito da falta de capacidade das CTMs de migrarem e se diferenciarem em células de linhagem neural foram abordadas neste estudo. A primeira seria a via de administração utilizada- a via intravítrea; Segundo os autores, uma barreira física formada pela membrana limitante interna da retina (formada por prologamentos terminais das células de Muller) estaria impedindo a migração das CTMs transplantadas, mesmo com a produção de fatores quimotáticos pela lesão. Outra suposição importante seria a baixa sobrevivência de CTMs após o transplante.

Com isso, foi considerado por uma gama de trabalhos científicos, que o estudo de propriedades neuroprotetoras de alguns fatores produzidos pela CTMs, assim como de fatores quimiotáticos produzidos pela lesão, torna-se uma abordagem muito mais realista e recompensadora para o desenvolvimento de terapias celulares efetivas, no reparo de células e/ou tecidos neurais no SNC (Pisati *et al.*, 2007; Burns *et al.*, 2005; Crigler *et al.*, 2005; Werning *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004).

No que se diz respeito à sobrevivência celular após administração tardia (7 dias após lesão) intravítrea de CTMs, nosso estudo, mostra resultados divergentes entre as células provenientes de tecido adiposo e medula óssea. De acordo com experimentos de quantificação relativa de transcritos gênicos para EGFP, obtidos por PCR em tempo real, ocorreu uma sobrevivência significativamente maior das MO-CTMs, na 2<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> semana após transplante, do que das TA-CTMs. Com isso podemos inferir que, assim como as CTMs provenientes de cordão umbilical, as TA-CTMs possuem baixa

capacidade de sobrevivência em tecidos lesados, após transplante (Hill *et al.*, 2009). Além disso, enquanto a sobrevivência AT-CTMs se mostrou uniforme e semelhante durante os tempos experimentais (2,4 e 6 semanas), a sobrevivência das MO-CTMs foi diminuindo significativamente entre os tempos avaliados.

Nossos resultados, baseados no estudo da produção de fatores neurotróficos como BDNF sugerem um padrão semelhante ao ocorrido na sobrevivência celular avaliada pela quantificação de transcritos gênicos para EGFP. Já foi relatado que o BDNF não só é capaz de promover sobrevivência das células ganglionares retinianas após injúria e prevenir perda dessas células como também é efetivo na manutenção fisiológica da integridade dendrítica das células ganglionares (Weber & Harman, 2008 ; Weber *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Estudos recentes mostram ainda que CTMs são capazes de expressar BDNF *in vivo* e *in vitro*, sob certos estímulos e que a expressão desta proteína é restrita e altamente correlacionada a sub-populações específicas de CTMs (Crigler *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2002; Rodrigues-Hell *et al.*, 2009). Pisati *et al.*, (2007) relatam também que os mecanismos responsáveis pela melhora funcional de um tecido neural lesado após transplante com CTMs se deve a produção, por estas células, de fatores tróficos neuroprotetores como BDNF, NGF, fator de crescimento de hepatócitos e VEGF. Com isso, podemos inferir que a produção aumentada de transcritos para BDNF tem relação estreita com a sobrevivência das células transplantadas. Isto indica que este fator estar sendo produzido por estas células ou as CTMs estão estimulando as células hospedeiras da retina a produzirem este fator.

Em relação aos fatores produzidos ao longo da recuperação da lesão, também foi obtido um padrão semelhante quanto a produção dos transcritos gênicos para os fatores retina, VEGF e VEGF-A; havendo um aumento da produção na 6<sup>o</sup> semana pós transplante em ratos que receberam MO-CTMs. D'Arcangelo (2005) mostrou, em seus estudos, que a retina é capaz de se ligar a receptores (*Very low-density lipoprotein receptor- Vldlr* e *Apolipoprotein E Receptor 2-ApoER-2*) presentes nas células que estão no processo de migração. Este fato pode sugerir que, como a presença de uma quantidade menor de células capazes de migrar e integrar à retina, as células lesadas retinianas, produzem maior quantidade de fatores tróficos como a própria retina e até VEGF e VEGF-A. O VEGF é um importante fator de crescimento com papel fundamental na formação e manutenção de estruturas vasculares. Essas funções são mediadas por seus receptores tirosina quinases, VEGFR1/Flt1 e VEGFR2/Flk1. No

entanto, o VEGF é também caracterizado como importante fator mediador na neuroproteção e neurogênese. Isso foi demonstrado em estudos que mostram que existe uma produção basal e constitutiva de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 em células do epitélio pigmentar e células da glia em olhos normais e quando essa expressão é reduzida ocorre formação anormal do tecido neural.

O aumento de transcritos gênicos para VEGF e VEGF-A, na 6<sup>o</sup> semana após transplante de MO-CTMs, sugere que mesmo com a realização do transplante de células de forma tardia (7 dias após a lesão) pode ter havido tendência, de grande parte das células-tronco injetadas, se diferenciarem em células da glia. Esses dados corroboram com o resultado obtido por Okada *et al.* (2005) e Ogawa *et al.* (2002) já descritos nesta secção. Já foi bastante descrito na literatura os efeitos neurotróficos e neuroprotetores de VEGF e VEGF-A, portanto o aumento da expressão desses fatores por células da glia pode ocorrer na tentativa estimular a proliferação e sobrevivência de células retinianas lesadas e até das CTMs restantes.

Já foi demonstrado que os receptores de VEGF, VEGFR-1 e VEGFR-2 (tipo tirosina-quinases específicas) estão presentes em células endoteliais, células progenitoras retinianas podendo ser expressos também em células-tronco. Estes receptores podem ser regulados tanto pelo aumento da expressão de VEGF e VEGF-A quanto por hipóxia (Fong *et al.*, 1995; Zachary 2005). O VEGFR-1 gera sinais que organizam a reunião de células endoteliais em tubos e vasos funcionais. VEGFR-2 é responsável pela proliferação e migração das células endoteliais.

Nossos resultados mostram um aumento de transcritos gênicos para VEGFR-1, observado na 6<sup>o</sup> semana tanto no grupo cuja retina foi lesada mas não recebeu células quanto no grupo que recebeu TA-CTMs. Este fato sugere que este aumento pode ser devido à hipóxia induzida pela lesão, já que não foi observado aumento da expressão de VEGF ou VEGF-A significativos nestes grupos e que pode, neste momento, estar ocorrendo angiogênese nestes grupos.

O grupo que recebeu MO-CTMs não apresentou aumento significativo na expressão de nenhum dos receptores para VEGF ou VEGF-A testados, mesmo apresentado aumento na expressão destes fatores. Segundo Maurer *et al.* 2003, isso pode indicar um mecanismo alternativo de proteção já que neste momento, os processos de proliferação, mitose e reorganização estrutural estão extremamente susceptíveis a danos no DNA, então uma proliferação, dos neurônios retinianos reduzida, pela diminuição na expressão de VEGFR-1 e VEGFR-2 indica um

mecanismo protetor adicional.

## 6- CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que o resultado final do transplante de CTMs em retinas lesadas por laser é afetado por inúmeras variáveis. Essas variáveis incluem a fonte de obtenção das CTMs, seu tipo de marcação intracelular para posterior traceamento *in vivo*, seu local de administração, assim como o tempo de administração celular pós lesão. Com isso podemos concluir que:

- As CTMs provenientes de medula óssea mostraram-se mais adequadas para serem transplantadas em retinas lesadas. Isso se deve ao fato de que essas células apresentaram, em comparação com as TA-CTMs, maior taxa de sobrevivência e maior efeito parácrino de fatores neuroprotetores como BDNF, VEGF e VEGF-A.
- O uso de EGFP como marcador celular endógeno para traceamento de CTMs *in vivo* se mostrou mais adequado que o fator solúvel DAPI, pois não difunde em tecidos hospedeiros além de exercer rastreabilidade de longa duração *in vivo*.
- O humor vítreo pode não ser o melhor local de escolha para a administração de CTMs, pois pode interferir, no processo de migração e integração das células transplantadas na retina.
- O tempo ideal para administração de CTMs em retinas lesadas seria entre o fim da fase sub-aguda e início da fase crônica de resolução da lesão induzida por laser. Esse período parece ser ideal para sobrevivência e diferenciação adequada de CTMs.



## 7- PERSPECTIVAS

- Comparação entre diferentes locais de administração de CTMs na retina: intravítreo x subretiniano
- Realização de análises morfológicas com o intuito de:
  - Estudar localização de fatores produzidos (BDNF, Relina, VEGF) e dos receptores para estes fatores
  - Identificar a localização das CTMs na retina, em diferentes tempos, após administração destas células
- Avaliar a produção de outros fatores importantes na identificação da lesão e para migração celular como SDF-1 e seu receptor CXCR4

## 8- Referências Bibliográficas

Adamis AP, Shina DT, Yeo KT, et al. Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 1993; 193(2):631-638

Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB. In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res*. 1999;831:1-10.

Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol*, 1995;113:1538 –1544.

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425(6961):968-73.

Anjos-Afonso, E.K. Siapati and D. Bonnet, In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions, *J. Cell. Sci.* 2004; 117: 5655–5664.

Arnhold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermeyer U. Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45: 4251-5.

Atsma DE, Fibbe WE, Rabelink TJ. Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(6):645-9.

Baddoo K, Hill R, Wilkinson D, Gaupp C, Hughes, GC Kopen *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection, *J. Cell. Biochem.* 2003, 89:1235–1249

Baksh R, Yao RS. Tuan. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow, *Stem Cells.* 2004, 25:1384–1392.

Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. Distribution of Müller stem cells within the neural retina: Evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. *Exp Eye Res.* 2009.

Bringmann A, Reichenbach A. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci.* 2001;6:E72–E92.

Burns TC, Ortiz-González XR, Gutiérrez-Pérez M, Keene CD, Sharda R, Demorest ZL, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. *Stem Cells.* 2006; 24(4):1121-7.

Canola K, Angenierux B, Tekaya M, Quiambao A, Naash MI, Munier FL, et al. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:446-454.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006; 98(5):1076-84. Review.

Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science.* 2002;297(5585):1299.

Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, Ahmad I. Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(3):842-6.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): 2739-49.

Chen X, Katakowski M, Li Y. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. *J. Neurosci. Res.* 2002;69: 687–691.

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(5):815-20.

Costa RA, Navajas EV, Farah ME, Calucci D, Cardillo JA, Scott IU. Polypoidal choroidal vasculopathy: angiographic characterization of the network vascular elements and a new treatment paradigm. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(5):560-86.

Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black B. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells*. 2006;24:2483–2492.

Crigler L, Robey RC, Aswachaicharn A, Gaupp D, Phinnery DG. Human mesenchymal stem cells subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol*. 2005;198:54–64.

D'Arcangelo G. Apoer2: a reelin receptor to remember. *Neuron*. 2005;47(4):471-3.

D'costa S, Pettite JN. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *Int J Dev Biol*. 1999 Jul;43(4):349-56

Da Silva Meirelles, Chagastelles PC, Nardi NB, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues, *J. Cell. Sci.*.2006; 119: 2204–2213.

Damico FM. Angiogênese e doenças da retina. *Arq. Bras. Oftalmo*. 2007; 70(3):547-553.

Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med*. 2008; 6: 7-10.

Djojotubroto MW, Arsenijevic Y. Retinal stem cells: promising candidates for retina transplantation. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):347-57.

Donovan, PJ & Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. 2001; 414:92-97.

Enzmann V, Yolcu E, Kaplan HJ, Ildstad ST. Stem cells as tools in regenerative therapy for retinal degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2009;127(4):563-71. Review.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.

Ferris BD, Kinsella M. Fatal complications of the surgical treatment of distal fractures of the femur. *Injury*. 1984;16(3):207-8.

Fisher AJ, Reh TA. Identification of a proliferative marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 2000.220:197–210.

Fisher AJ, Reh TA. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 2001;4:247-252

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995 ;376(6535):66-70.

Fung WE. Interferon alpha 2a for treatment of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 1991;112(3): 349-50.

Gaillard F, Sauvé Y. Cell-based therapy for retina degeneration: the promise of a cure. *Vision Res*. 2007;47(22): 2815-24.

Gong L, Wu Q, Song B, Lu B, Zhang Y. Differentiation of rat mesenchymal stem cells transplanted into the subretinal space of sodium iodate-injected rats. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008;36(7):666-71.

Gregory-Evans K, Chang F, Hodges MD, Gregory-Evans CY. Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF-secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration. *Mol Vis*. 2009;15:962-73.

Grimaldi A, Bianchi C, Greco G, Tettamanti G, Noonan DM, Valvassori R, de Eguileor M. In vivo isolation and characterization of stem cells with diverse phenotypes using growth factor impregnated biomatrices. *PLoS ONE*. 2008; 3(4):1910.

Grinnemo KH, Månsson-Broberg A, Leblanc K, Corbascio M, Wårdell E, Siddiqui AJ, et al. Human mesenchymal stem cells do not differentiate into cardiomyocytes in a cardiac ischemic xenomodel. *Ann Med*. 2006;38(2):144-53.

Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, et al. Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 2002;22(14):5797-802.

Hagemann LF, Costa RA, Ferreira HM, Farah ME. Optical coherence tomography of a traumatic Neodymium:YAG laser-induced macular hole. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2003;34(1): 57-9.

Harris JR, Brown GA, Jorgensen M, Kaushal S, Ellis EA, Grant MB, Scott EW. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(5):2108-13.

Haynes T, Del Rio-Tsonis K. Retina repair, stem cells and beyond. *Curr Neurovasc Res*. 2004;1(3):231-9. Review.

He C, Wan & Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*. 2007;25 69–77.

Hill AJ, Zwart I, Tam HH, Chan J, Navarrete C, Jen LS, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells do not differentiate into neural cell types or integrate into the retina after intravitreal grafting in neonatal rats. *Stem Cells Dev*. 2009 Apr;18(3):399-409.

Hong KH, Ryu J, Han KH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood*. 2005;105(4):1405-7.

Hooshmand MJ, Sontag CJ, Uchida N, Tamaki S, Anderson AJ, Cummings BJ. Analysis of host-mediated repair mechanisms after human CNS-stem cell transplantation for spinal cord injury: correlation of engraftment with recovery. *PLoS One*. 2009;4(6):e5871.

Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(13):8932-7.

Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur. J. Cardiothorac. Surg*. 2007;31:438-443.

Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, et al. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med*. 2003;198(3):483-9.

- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
- Jiang BN, Jahagirdar RL, Reinhardt RE, Schwartz CD Keene, Ortiz-Gonzalez XR, *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002, 418: 41–49.
- Johns PR. Growth of the adult goldfish eye. Source of the new retinal cells. *J Comp Neurol.*1977;176:343-357.
- Kallis MR, Alison, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut.* 2007; 56:716–724
- Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(180):219-42.
- Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable IJ, Robertson T, Rakoczy PE. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci.* 2003;23(21):7742-9.
- Kim D, Chun BG, Kim YK, Lee YH, Park CS, Jeon, I, *et al.* In vivo tracking of human mesenchymal stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant.*2007;16:1007-1012.
- Kim I, Ryan AM, Rohan R. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999;40:2115–2121.
- Klassen H, Kiilgaard JF, Zahir T, Ziaecian B, Kirov I, Scherfig, E, *et al.* Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. *Stem Cells.*2007; 25:1222-1230.
- Klein R, Klein BE, Linton KL. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology.* 1992;99(6):933-43.
- Kolb, H. How the retina works, *American scientist*, 2003; 91:28-35.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;U.S.A. 96:10711-10716.
- Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. *Cytotherapy.* 2006;8(6):559-61.
- Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* 2003;230:263-90. Review.
- Li H, Fu X, Zhang L, Sun T, Wang J. In vivo dedifferentiation of human epidermal cells. *Cell Biol. Int.* 2007;31:1436-1441.
- Li Y, Chen J, Chopp M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant.*2001;10:31-40.
- Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1646-52.

- Liu X, Robinson ML, Schreiber AM, Wu V, Lavail MM, Cang J, Copenhagen DR. Regulation of neonatal development of retinal ganglion cell dendrites by neurotrophin-3 overexpression. *J Comp Neurol.* 2009;514(5):449-58.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Lu P, Blesch A, Tuszynski, MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artefact. *J Neurosci Res.* 2004; 77:174–191.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J Clin Invest.* 1999;103(5):697-705.
- Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp, M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma.* 2002;19(12):1609–1617.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, Meckercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science.* 2000 ;290(5497):1779-82.
- Mitsuda S, Yoshii C, Ikegami Y, Araki M. Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster*. *Dev Biol.* 2005;280(1):122-32.
- Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, Sintuu C, Wang JC. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for *ex vivo* gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine.* 2008;33(8):863-9.
- Moshiri A, Close J, Reh TA. Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):1003-14. Review.
- Mosmann T Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
- Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, Schenk K, Neisen UC, Fries JW, *et al.* Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2006; 41:876-884.
- Munoz-Elias G, Marcus AJ, Coyne TM, Woodbury D, Black IB. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: Engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J. Neurosci.* 2004; 24:4585-4595.
- Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell.* 2008; 132: 661-80.
- Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, *et al.* Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(13):4268-74.
- Nissen NN, Poverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 1998;152:1445–1452.

Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, Miyao S, Watanabe M, Nakamura M, et al. Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res.* 2002 Sep 15;69(6):925-33.

Okada S, Ishii K, Yamane J, Iwanami A, Ikegami T, Katoh H, et al. In vivo imaging of engrafted neural stem cells: its application in evaluating the optimal timing of transplantation for spinal cord injury. *FASEB J.* 2005;19(13):1839-41.

Panteri R, Mey J, Zhelyaznik N, D'Altocolle A, Del Fà A, Gangitano C, et al. Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Mol Cell Neurosci.* 2006;32(1-2):133-42.

Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(6):805-18.

Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 2008

Pera, MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* 2000;113 (Pt 1): 5-10.

Pisati F, Bossolasco P, Meregalli M, Cova L, Belicchi M, Gavina M, et al. Induction of neurotrophin expression via human adult mesenchymal stem cells: implication for cell therapy in neurodegenerative diseases. *Cell Transplant.* 2007;16(1):41-55.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. 1999;284(5411):143-7.

Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Héroult O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.* 2007;25(7):1737-45.

Pozdnyakov S, Gupta N, Yeung J, Yücel Y. Retina remodeling following diode laser. *Can J Ophthalmol.* 2008;43(2):203-7.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005;129(1):118-29.

Pulido JS, Sugaya I, Comstock J, Sugaya K. Reelin expression is upregulated following ocular tissue injury. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007;245(6):889-93.

Reichel MB, Ali RR, Thrasher AJ, Hunt DM, Bhattacharya SS, Baker D. Immune responses limit adenovirally mediated gene expression in the adult mouse eye. *Gene Ther.* 1998;5(8):1038-46.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000;18(4):399-404.

Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira AL. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. *Neurobiol Dis.* 2009;33(2):290-300.

Roizenblatt R, Farah ME, Castro J, Cardillo JA, Costa RA, Roizenblatt J. Diode laser

- modifications for treatment of choroidal neovascularisation. *Lasers Med Sci.* 2003;18(1):43-4.
- Ryan SJ, Stout JT, Dugel PV. Posterior penetrating ocular trauma. In: Ryan SJ, ed. *Retina.* 1994;3:2235–2250.
- Slack JM, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(5):581-6. Review.
- Spence JR, Madhavan M, Ewing JD, Jones DK, Lehman BM, Del Rio-Tsonis K. The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development.* 2004;131(18):4607-21.
- Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 30:353-361; 2006.
- Takahashi M, Palmer TD, Takahashi J, Gage FH. Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci.* 1998 ;12(6):340-8.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002;416(6880):542-5.
- Thews O, Lambert C, Kelleher DK, Biesalski HK, Vaupel P, Frank J. An in vivo tumor model expressing green fluorescent protein for the investigation of metastasis. *Int J Oncol.* 2005;27(3):705-12.
- Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, Flynn E, Chatzistefanou K, et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology.* 1996;103(11):1820-8.
- Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, et al. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells.* 2002;20(4):279-83.
- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000 Mar 17;287(5460):2032-6.
- Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation.* 2002;70(8):397-409.
- Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. *Exp Eye Res.* 2004;78(2):161-72. Review.
- Uccelli, L. Moretta and V. Pistoia, Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells, *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:2566–2573.
- Vingerling JR, Klaver CC, Hofman A, de Jong PT. Epidemiology of age-related maculopathy. *Epidemiol Rev.* 1995;17(2):347-60. Review.
- Weber AJ, Harman CD. BDNF preserves the dendritic morphology of alpha and beta ganglion cells in the cat retina after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(6):2456-63.
- Weber AJ, Viswanathan S, Ramanathan C, Harman CD. Combined application of BDNF to



the eye and brain enhances ganglion cell survival and function in the cat following optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009 Aug 26.

Wernig MF, Benninger T, Schmandt M, Rade KL, Tucker H, Bussow H, et al. Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo. *J Neurosci.* 2004; 24:5258–5268.

Wiley LA, Berkowitz BA, Steinle JJ. Superior cervical ganglionectomy induces changes in growth factor expression in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(1):439-43.

Williamson TH, O'Donnell A. Intravitreal triamcinolone acetonide for cystoid macular edema in nonischemic central retinal vein occlusion. *Am J Ophthalmol.* 2005;139(5):860-6

Witmer AN, Vrensen GFJM, VanNoorden CJF, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:1-29

Wojakowski, W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating stem/progenitor cells in stable ischemic heart disease and acute coronary syndromes – relevant reparatory mechanism? *Heart.* 2008; 94(1):27-33.

Wohl SG, Schmeer CW, Kretz A, Witte OW, Isenmann S. Optic nerve lesion increases cell proliferation and nestin expression in the adult mouse eye in vivo. *Exp Neurol.* 2009 .

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61(4):364-70.

Wu J, Sun Z, Sun HS, Wu J, Weisel RD, Keating A, et al. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant.* 2007;16:993-1005.

Young MJ, Ray J, Whiteley SJ, Klassen H, Gage FH. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci.* 2000;16(3):197-205.

Zachary I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals.* 2005;14(5):207-21. Review.

Zaedi S, Jesmin S, Yamaguchi N, Shimojo N, Maeda S, Gando S, et al. Altered expression of endothelin, vascular endothelial growth factor, and its receptor in hepatic tissue in endotoxemic rat. *Exp Biol Med.* 2006;231(6):1182-6.

Zhang J, Shan Q, Ma P, Jiang Y, Chen P, Wen J, Zhou Y, Qian H, Pei X. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells into retina in normal and laser-injured rat eye. *Sci China C Life Sci.* 2004;47(3):241-50.

Zhao F, Zhang YF, Liu YG, Zhou JJ, Li ZK, Wu CG, et al. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplant. Proc.* 2008;40:1700-1705.

Zwart I, Hill AJ, Al-Allaf F, Shah M, Girdlestone J, Sanusi AB, et al. Umbilical cord blood mesenchymal stromal cells are neuroprotective and promote regeneration in a rat optic tract model. *Exp Neurol.* 2009;216(2):439-48.

