

LEONARDO TORQUETTI COSTA

AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INTEGRAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AO  
TECIDO RETINIANO LESADO  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2009

LEONARDO TORQUETTI COSTA

**AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INTEGRAÇÃO DE  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AO  
TECIDO RETINIANO LESADO  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy  
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Prof. Dr. Alfredo de Miranda Goes  
Universidade Federal de Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2009

Torquetti Costa, Leonardo  
Avaliação da migração e integração de células-tronco mesenquimais ao tecido retiniano lesado. Estudo experimental em ratos Wistar [manuscrito]./ Leonardo Torquetti Costa. - - Belo Horizonte: 2009.

Orientador: Marcio Nehemy

Co-orientador: Alfredo Goes

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Retina. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Regeneração retiniana. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Nehemy, Marcio. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

## **Magnífico Reitor**

Prof. Ronaldo Tadêu Pena

## **Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Ribeiro da Silva

## **Pró-Reitor de Pesquisa**

Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

## **Diretor da Faculdade de Medicina**

Prof. Francisco José Penna

## **Diretora do Hospital das Clínicas**

Prof<sup>a</sup>. Tânia Mara Assis Lima

## **Coordenador do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina**

Prof. Carlos Faria Santos Amaral

## **Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Edison Samesima Tatsuo

## **Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia**

Prof<sup>a</sup>. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

## **Membros do Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia**

Prof. Edison Samesima Tatsuo

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

A comissão examinadora que assina abaixo\_\_\_\_\_ a tese intitulada “AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INTEGRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AO TECIDO RETINIANO LESADO - ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR”; apresentada e defendida, em sessão pública, por Leonardo Torquetti Costa, para a obtenção do grau de Doutor em Medicina, pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

---

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy  
Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

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

---

Prof. Dr. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho  
Universidade Federal do Para

---

Prof. Dr. Joel Edmur Boteon  
Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Raul Nunes Galvarro Vianna  
Universidade Federal Fluminense

## Suplentes

---

Dra. Elke Passos Machado

---

Dr. Christian Marcellus Campos

Belo Horizonte, 3 de julho de 2009.



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 7009  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3248.9641 FAX: (31) 3248.9939



ATA DA CENTESIMA TERCEIRA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO, de **LEONARDO TORQUETTI COSTA**, nº de registro 2004212726. Às quatorze horas do dia **três de julho de dois mil e nove**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INTEGRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AO TECIDO RETINIANO LESADO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR."**, requisito final para a obtenção do grau de doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia. Abrindo a sessão, o presidente da comissão, Prof. Marcio Bittar Nehemy, após dar conhecimento aos presentes sobre o teor das normas regulamentares do trabalho final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Marcio Bittar Nehemy/orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Alfredo de Miranda Góes/co-orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Joel Edmur Boteon	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna	Instituição: UFF	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho	Instituição: UFFA	Indicação: <u>aprovado</u>

Pelas indicações, o candidato foi considerado aprovado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da comissão. Nada mais havendo a tratar encerrou-se a reunião e lavrou-se a presente ATA, que segue assinada por todos os membros participantes da comissão examinadora. Belo Horizonte, 03 de julho de 2009.

Prof. Marcio Bittar Nehemy/orientador \_\_\_\_\_

Prof. Alfredo de Miranda Góes/co-orientador \_\_\_\_\_

Prof. Joel Edmur Boteon \_\_\_\_\_

Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna \_\_\_\_\_

Prof. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho \_\_\_\_\_

Prof. Edson Samesima Tatsuo (coordenador) \_\_\_\_\_

**PROF. EDSON SAMESIMA TATSUO**  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas  
à Cirurgia e à Oftalmologia  
Faculdade de Medicina/UFMG

CONFERE COM O ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 7009  
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100  
Fone: (031) 3248.9641 FAX: (31) 3248.9939



**DECLARAÇÃO**

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Marcio Bittar Nehemy, Joel Edmur Boteon, Alfredo de Miranda Góes, Raul Nunes Galvarro Vianna e Edmundo Frota de Almeida Sobrinho, aprovou a defesa da tese intitulada: **“AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO E INTEGRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS AO TECIDO RETINIANO LESADO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR.”**, apresentada pelo doutorando **LEONARDO TORQUETTI COSTA** para obtenção do título de doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 03 de julho de 2009.

Prof. Marcio Bittar Nehemy  
(orientador)

Prof. Alfredo de Miranda Góes  
(co/orientador)

Prof. Joel Edmur Boteon

Prof. Raul Nunes Galvarro Vianna

Prof. Edmundo Frota de Almeida Sobrinho



*Dedico este trabalho aos meus queridos filhos  
Vítor e Letícia, estímulos para a vida.*

*A Flaviane, pelo amor e carinho incondicional,  
eterna companheira, fonte de força e sabedoria  
nos momentos mais difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, fonte de tudo e todos, pelo Dom da vida, pela possibilidade de exercer a Oftalmologia, por poder encerrar mais esta etapa da vida.

Aos meus pais, Mauro e Marlene, meus exemplos de sabedoria, dignidade, humanidade, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida.

Aos meus segundos pais, João Tinoco e Edimar por não medirem esforços em me apoiar e acolher como filho, sempre.

Ao meu orientador, Professor Márcio Nehemy, pela honra do convívio, por todos os ensinamentos, apoio e estímulo para perfeita execução desta tese.

Ao meu co-orientador, Professor Alfredo Goes, pelo acolhimento em seu laboratório, por toda a orientação e atenção.

A Dra. Paula Castanheira, por toda paciência, disponibilidade, auxílio e apoio; pela viabilização desta tese.

Ao Dr Moisés Pedrosa pela disponibilidade em realizar os experimentos histopatológicos iniciais.

Aos colegas de Hospital São Geraldo, especialmente os amigos Alberto Diniz Filho, Rafael Merula, Patrick Reis, Patrick Tzelicks, Breno Lino, Cristiano Menezes, Luis Felipe Ramos, Rafael Amaya, Daniel Vitor Vasconcelos Santos e Max Morales.

A Sra. Rosemary Rodrigues Silva, funcionária do Departamento de Oftalmologia – FM – UFMG, pelo apoio recebido durante todo o curso de Doutorado.

A Srta Mari do Centro de Pós-Graduação – FM – UFMG, pelo auxílio recebido na qualificação e defesa da tese.

As funcionárias do Serviço de Retina e Vítreo do Hospital São Geraldo – UFMG, Sras. Maria Bernadete, Helena e Kenia, por todo apoio durante a execução deste trabalho.

Aos colegas pós-graduandos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A todos aqueles não mencionados aqui, que colaboraram de alguma forma para a concretização desta tese.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Cultura celular de células-tronco isoladas de medula óssea.....	37
FIGURA 2 - Ensaio da atividade de fosfatase alcalina.....	38
FIGURA 3 - Análises individuais plotadas a partir das análises fenotípicas para marcadores moleculares obtidas por citometria de fluxo das CTM.....	40
FIGURA 4 - Análise morfológica das CTM em cultivo e marcadas com DAPI.....	41
FIGURA 5 - Microscopia de fluorescência mostrando a migração das CTM marcadas com DAPI após transplante intravítreo em ratos cujas retinas foram lesadas pelo laser.....	43
FIGURA 6 - Análise imunohistoquímica das CTM marcadas com DAPI em cortes de retinas lesadas oito semanas após transplante intravítreo.....	46
FIGURA 7 - Migração das CTM marcadas com DAPI e Qdot, duas semanas após o transplante.....	49

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Anticorpos primários para Imunocitoquímica (ICC) e Citometria de Fluxo (CF).....	34
QUADRO 2 - Anticorpos primários para Imunohistoquímica.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>EPR</b>	Epitélio Pigmentar da Retina
<b>CNE</b>	Camada Nuclear Externa
<b>CNI</b>	Camada Nuclear Interna
<b>CCG</b>	Camada de Células Ganglionares
<b>FIG</b>	figura
<i>et al</i>	e outros
<b>Nd-YAG</b>	Neodimium-Yatrium-Garnet
<b>mJ</b>	milijoule
<b>TAB</b>	tabela
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindol
<b>Qdot</b>	<i>Quantum Dot</i> (pontos quânticos)
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>CD</b>	cluster of differentiation (grupamento de diferenciação)
<b>CO<sub>2</sub></b>	gás carbônico
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>mM</b>	milimol
<b>µL</b>	microlitro
<b>mL</b>	mililitro
<b>µg.</b>	micrograma
<b>MTT</b>	metiltetrazol
<b>NBT</b>	nitrobluetetrazol

## RESUMO

**OBJETIVO:** Avaliar a migração, integração e diferenciação retiniana de células-tronco mesenquimais (CTM) injetadas na cavidade vítrea de ratos portadores de lesões retinianas.

**MÉTODOS:** 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.

**RESULTADOS:** As células injetadas na cavidade vítrea sobreviveram na retina por pelo menos 8 semanas e quase todas CTM migraram para a retina neural, principalmente nas camadas nuclear externa e interna e camada de células ganglionares. Uma pequena quantidade de células foi encontrada no espaço sub-retiniano. A análise imunohistoquímica dos tecidos lesados/tratados após oito semanas mostrou que a maioria das células injetadas expressou rodopsina (marcador para fotorreceptores), parvalbumina (marcador para células bipolares e amácrinas) e GFAP (marcador de células gliais). As células injetadas não expressaram a pancitoqueratina, que é a marcadora de células do epitélio pigmentar da retina. Ocorreu difusão do DAPI para células de camadas adjacentes da retina

**CONCLUSÃO:** Células-tronco injetadas na cavidade vítrea migraram 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

**PURPOSE:** To evaluate the migration, retinal integration and differentiation of bone marrow-mesenchymal stem cells (BM-MSCs) injected into the vitreous cavity of rat eyes with retinal injury.

**METHODS:** Adult rat retinas were submitted to laser damage followed by transplantation of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) and Quantum Dot-labeled BM-MSCs grafts. Host retinas were evaluated at two, four and eight weeks after injury/transplantation to assess the migration, integration and differentiation of BM-MSCs in the laser-injured retina.

**RESULTS:** The grafted cells survived in the retina for at least eight weeks and almost all BM-MSCs migrated into the neural retina, mainly in the outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL) whereas a subset of grafted cells were found in the subretinal space after the transplantation. Immunohistochemical analysis with several retinal specific markers revealed, at eight weeks, that the majority of the grafted cells expressed rhodopsin, a rod photoreceptor marker, followed by parvalbumin, a marker for bipolar and amacrine cells. A few subsets of cells were able to express the glial marker, GFAP. However, grafted cells failed to express pan-cytokeratin, a retinal pigment epithelium marker. There was DAPI diffusion for adjacent cells of the retina.

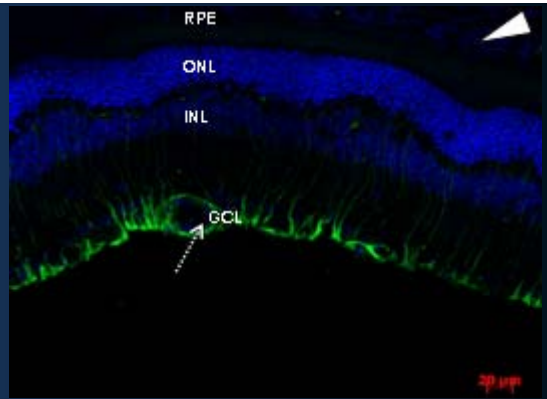
**CONCLUSION:** There is BM-MSCs migration toward the lesion site following intravitreal injection of the cells. It is not possible to assure that there is differentiation and incorporation of the stem cells into the retina of rats after injury. DAPI diffusion to adjacent cells may be a bias.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3	OBJETIVOS.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
	4.1. ESTUDO <i>IN VITRO</i>	
	4.1.1 Isolamento e Cultura das CTM.....	25
	4.1.2. Teste de Viabilidade Celular.....	25
	4.1.3. Detecção da atividade da fosfatase alcalina.....	26
	4.1.4. Análise fenotípica das CTM por Citometria de Fluxo (CF).....	27
	4.1.5. Marcação celular com anticorpos primário e secundário.....	28
	4.1.6. Leitura no citômetro de fluxo FACScan.....	28
	4.1.7. Análise fenotípica das CTMs por Imunocitoquímica (ICC).....	29
	4.1.8. Marcação celular para rastreamento.....	30
	4.2. ESTUDO <i>IN VIVO</i>	
	4.2.1. Estabelecimento de um modelo de lesão pelo laser.....	31
	4.2.2. Transplante intravítreo das CTM.....	31
	4.2.3. Preparo dos tecidos para análise.....	32
	4.2.4. Análise morfológica por imunohistoquímica.....	32
5	RESULTADOS.....	36
	5.1 Morfologia das CTM isoladas de medula óssea.....	37
	5.2. Análise morfológica das atividades enzimáticas das CTM isoladas de medula óssea.....	38
	5.3. Análise fenotípica das CTMs por Citometria de fluxo (CF).....	38
	5.4. Marcação das células para rastreamento.....	41
	5.5. Padrão de migração das CTM após transplante.....	42
	5.6. Análise imunohistoquímica da retina.....	44
	5.7. Dupla marcação: Resultados do QuantumDot.....	47
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÃO.....	59
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9	PUBLICAÇÕES RESULTANTES DA TESE.....	72



# 1. INTRODUÇÃO



As células-tronco têm sido estudadas em vários campos da medicina, especialmente na cardiologia, em que seu uso já tem alcançado a prática clínica (BLATT A, *et al.*, 2005; CORREIA AS, *et al.*, 2005; BALSAM LB, *et al.*, 2005; VAN LAAKE LW, *et al.*, 2005). Existem dois princípios básicos envolvidos no estudo das células-tronco: auto-renovação e multi-potencialidade para originar todos os tipos celulares de um determinado tecido (KLASSEN H, *et al.*, 2004).

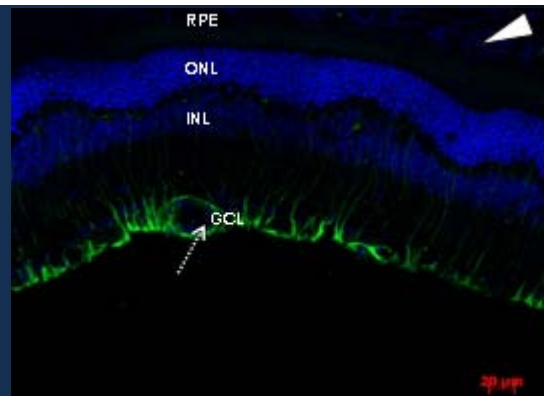
Existem várias doenças degenerativas da retina capazes de levar à cegueira legal, tais como a retinose pigmentar e outras distrofias retinianas. Não existem terapias eficazes, até o presente momento, capazes de prevenir ou reverter o processo degenerativo nestas doenças. O transplante de retina é uma opção, entretanto a integração neuronal e sobrevivência das células diferenciadas ainda são questões não resolvidas.

A identificação e caracterização de células-tronco, nos últimos anos, levaram ao uso potencial dessas células como uma alternativa promissora para a regeneração tecidual (WARVFINGE *et al.*, 2001). A injeção de células-tronco teria a capacidade potencial de ser utilizada para o tratamento de distrofias retinianas. O efeito benéfico poderia advir do seu auxílio na restauração da visão pela regeneração da retina lesada e/ou pela paralisação da degeneração progressiva dos neurônios (SMITH LEH, 2004).

As células-tronco mesenquimais, extraídas da medula óssea, apresentam facilidades de obtenção e utilização. O doador das células pode ser o próprio indivíduo, o que elimina complicações relacionadas à rejeição tecidual. O fato destas células poderem ser facilmente obtidas e multiplicadas em grande quantidade em cultura, com potencial de auto-renovação, faz com que estas sejam candidatas para regeneração retiniana por meio do transplante autólogo.

As células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser induzidas à diferenciação, *in vivo* e *in vitro*, em células não-mesenquimais tais como neurônios, em um processo chamado de “plasticidade das células-tronco” (MORRISON, *et al.*, 1995; POUNTOS e GIANNOUDIS, 2005). As CTM da medula óssea podem se diferenciar em neurônios, *in vivo* e *in vitro*, e quando implantadas em locais submetidos a lesões, em modelos experimentais animais, demonstram habilidade para migrar para o local da lesão e iniciar o reparo tecidual (KLASSEN, *et al.*, 2004). Embora as células-tronco possam integrar-se às camadas lesadas da retina e diferenciarem-se em células da retina, ainda não há evidências de restauração da função visual e de sobrevivência destas células por longo prazo (WOJCIECHOWSKI, *et al.*, 2002; SCHRAERMEYER, *et al.*, 2001).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA



As primeiras investigações a respeito da renovação celular em doenças retinianas foram realizadas transferindo-se fotorreceptores maduros para ratos portadores de distrofias retinianas. Observou-se que ocorre migração parcial das células transplantadas. Entretanto não se observou integração dessas células no tecido receptor (SILVERMAN, *et al.*, 1992; ARAMANT, *et al.*, 1995; BERSON e JAKOBIEC, 1999; KWAN, *et al.*, 1999).

O corpo humano contém diversos tipos de células progenitoras que são capazes de dividir várias vezes, originando células-filhas com potencial de desenvolvimento mais restrito. Os principais exemplos dessas células-tronco incluem o zigoto totipotente, células-tronco embrionárias, células-tronco hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais.

Células-tronco embrionárias (CTE) são coletadas no estágio de blastocisto do desenvolvimento embrionário. Estas células podem originar outras células derivadas dos três folhetos embrionários: endoderma, ectoderma e mesoderma. Estudos recentes sugerem que as CTE podem ser diferenciadas e incorporadas à retina após lesão (BANIN, *et al.*, 2006; MEYER, *et al.*, 2006)

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 destas células é o CD34 (D`COSTA, *et al.*, 1999).

Células-tronco mesenquimais (CTM) são isoladas da medula óssea de organismos adultos. Elas caracterizam-se por apresentarem aderência ao plástico, ter aspecto de fibroblastos e poder se diferenciar em células distintas (POUNTOS, *et*

*al.*, 2005). Estas células são encontradas em vários tecidos durante o desenvolvimento, e em adultos, são encontradas principalmente na medula óssea, de onde podem ser facilmente aspiradas (BERTRAM, *et al.*, 2005; AHRENS, *et al.*, 2004; CHIOU, *et al.*, 2005). As células podem ser isoladas, expandidas em cultura e estimuladas a se diferenciarem em osteoblastos (KASSEM, *et al.*, 1993), condrócitos (JHONSTONE, *et al.*, 1998), músculo esquelético (SAMPAOLESI, *et al.*, 2005), endotélio (ABEDIN, *et al.*, 2004), cardiomiócitos (LEE, *et al.*, 2004), hepatócitos (JUSTESEN, *et al.*, 2002), adipócitos (JIANG, *et al.*, 2002) e outros tipos celulares não-mesodérmicos como neurônios, *in vivo* e *in vitro* (SANCHEZ-RAMOS, *et al.*, 2000; DE BARI, *et al.*, 2003).

A medula óssea é considerada fonte ideal de células-tronco pluripotentes. Apresenta diversas vantagens quanto ao uso de suas células pela sua natureza autóloga, relativa facilidade de isolamento e ausência de problemas éticos e religiosos em relação ao seu uso, quando comparadas às células-tronco embrionárias.

Em animais a regeneração retiniana pode ocorrer por duas vias. Em uma delas as células diferenciadas próximas a uma lesão tecidual sofre um processo de desdiferenciação e subsequente re-diferenciação em uma linhagem específica, para reparação da lesão, em um processo chamado trans-diferenciação. A outra via é por meio de células-tronco. Em algumas espécies animais células-tronco provenientes de trans-diferenciação podem ser recrutadas para repovoar a retina lesada (HAYNES, *et al.*, 2004; MITSUDA, *et al.*, 2005).

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 (STRAZNICKY, *et al.*, 1971, JOHNS, 1977; FISCHER, *et al.*, 2000, SPENCE, *et al.*, 2004). Observou-se que a maioria das células da retina destes animais é originada após o período embrionário (JOHNS, 1977).

Em anfíbios, a ZCM contribui para a regeneração retiniana, mas é o EPR representa a mais importante fonte de regeneração. Após lesão retiniana as células do EPR perdem a sua pigmentação, desdiferenciam e geram neurônios através de um processo chamado transdiferenciação (REH, 1987, FISCHER, *et al.*, 2001).

Em galinhas, ao final do período de embriogênese, a retina está completamente formada. A trans-diferenciação celular ocorre via EPR e ZCM. Em outros pássaros adultos, o dano retiniano é reparado pela trans-diferenciação de células de Müller (TSONIS, 2002; TSONIS, *et al.*, 2004; MITASHOV, 1996; AMATO, *et al.*, 2004).

Em mamíferos, uma vez completada a histogênese retiniana, não há produção continuada de neurônios retinianos. Até recentemente, não havia evidência da existência de uma região de crescimento similar à ZCM das galinhas.

Estudos em retinas humanas adultas mostraram a expressão de um marcador de progenitor neural denominado Nestina. Na retina humana, a Nestina é expressa em algumas células na junção da retina neural e o corpo ciliar, o que sugere a presença de um remanescente da ZCM em humanos, que podem ser consideradas como “células-tronco da retina” (MAYER, *et al.*, 2003). O mesmo estudo que sugere a presença da ZCM em humanos evidenciou a presença de células Nestina-positivas em membranas epirretinianas presentes na vitreorretinopatia proliferativa (PVR), o que implica que este tipo celular pode contribuir para esta doença.

Tem sido relatado o uso experimental de células-tronco neurais (CTN) 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 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). Entretanto, esta não é uma fonte viável de células-tronco para terapias oculares, considerando a disponibilidade muito limitada de células-tronco retinianas (KICIC, *et al.*, 2003).

Existem várias fontes de células disponíveis para o reparo de lesões retinianas, entretanto, a multipotencialidade das CTM, associada à facilidade de seu isolamento e cultivo, além do seu grande potencial de multiplicação faz com que estas células sejam uma fonte apropriada para o estudo do reparo de danos retinianos.

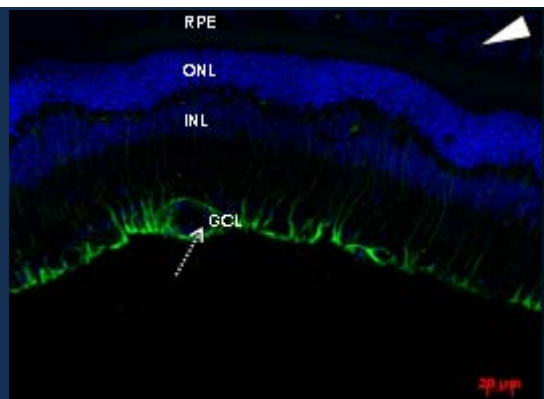
Estudos recentes demonstraram que as CTM cultivadas podem ser induzidas *in vitro* e *in vivo* a se diferenciarem em derivados não-mesenquimais como as células neurais (MEZEY, *et al.*, 2000; WOODBURY, *et al.*, 2000). Tomita *et al.* (2002) injetaram CTM em ratos portadores de lesões retinianas e observaram que as células se diferenciaram em células retinianas *in vivo*. Kicic *et al.* 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 funcionalidade deste tecido é ainda questionável (TSONIS, *et al.*, 2004; TAKAHASHI, *et al.*, 1998). Em contraste com esses estudos, outros trabalhos mostram que o eletrorretinograma (ERG) melhora após a injeção de células-tronco, indicando integração funcional das células transplantadas (MOSHIRI, *et al.*, 2004).



Diversos “sinais” podem direcionar as CTM no sentido de se diferenciarem em células de linhagens teciduais diferentes. Estes sinais incluem trauma, fratura, necrose e tumores. Demonstrou-se, experimentalmente, que as CTM podem migrar para tecidos lesados e estimular o reparo tecidual pela diferenciação celular (POUNTOS e GIANNOUDIS, 2005).

As células-tronco mesenquimais humanas isoladas em cultura podem ser estudadas pela citometria de fluxo, que identifica em sua superfície as moléculas CD29, CD44, SH2, SH3, CD71, CD90, CD106, CD120a e CD124. (PITTENGER, *et al.*, 1999; LODIE, *et al.*, 2002; JAVAZON, *et al.*, 2004; HAYNESWORTH, *et al.*, 1992).

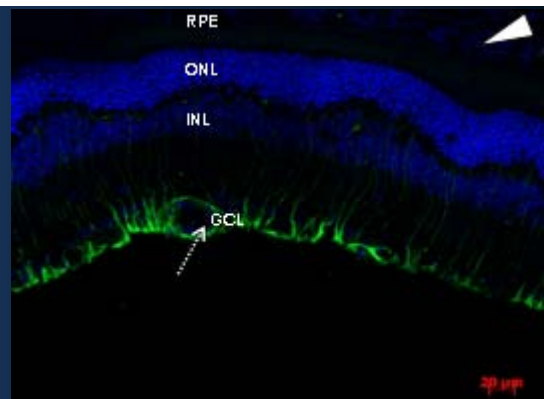
### 3. OBJETIVOS



Os objetivos deste estudo foram:

- 1) Criar e padronizar um modelo experimental adequado para o estudo de indução de lesão retiniana, a fim de se avaliar possível regeneração tecidual, após injeção intravítrea de células-tronco;
- 2) Avaliar a migração das células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea e sua integração à retina lesada, após diferentes tempos do transplante;
- 3) Avaliar, por meio de estudo de imuno-histoquímica, se é possível caracterizar a diferenciação das células-tronco transplantadas após injeção intravítrea dessas células no tecido retiniano lesado.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS



## **4. ESTUDO *IN VITRO***

### **4.1.1. Isolamento e Cultura das CTM**

Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética Animal (CETEA/UFMG) e aprovados sob o número 3/2006. As células-tronco da medula óssea foram coletadas de ratos Wistar isogênicos, com 2 meses de idade. Os animais foram sacrificados e tiveram suas tíbias e fêmures extraídos. Em meio estéril, as epífises dos ossos coletados foram cortadas expondo a medula. Realizou-se uma injeção, sob pressão, de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), na cavidade medular do fêmur e tibia dos animais. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 48 horas e as células não-aderentes foram removidas. As células, que apresentaram forma similar à de fibroblastos, foram cultivadas e expandidas por 3 semanas. Estas células demonstraram características típicas de CTM.

Utilizou-se o meio de cultivo 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 estreptomicina/mL e 0,25µg de anfotericina B /mL (PSA, Gibco).

### **4.1.2. Teste de Viabilidade Celular**

Para testar a viabilidade celular utilizou-se o ensaio de MTT (metil tetrazol) (DENIZOT e LANG, 1986) que é um método colorimétrico sensível e quantitativo capaz de medir a viabilidade e estado de ativação das células. Esse ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o substrato dimetiltiazol (MTT), solúvel em água, no

cristal de formazan, produto insolúvel em 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 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 foram adicionados. Foi acrescentado às células, 170 µL 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 (Elix800, Bio-Tek, Instruments Inc.).

#### **4.1.3. Detecção da atividade da fosfatase alcalina.**

O nível de diferenciação celular foi avaliado por meio da atividade da fosfatase alcalina, que 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 mesênquima tais como fibroblastos, já que a produção da fosfatase alcalina é elevada nas CTM quando comparada aos fibroblastos. A produção de fosfatase alcalina foi avaliada por meio do ensaio de NBT-BCIP (bromo-cloro-indol fosfato) (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromatogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP 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.

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

#### **4.1.4. Análise fenotípica das CTM por Citometria de fluxo (CF)**

A análise das moléculas de superfície das CTM foi realizada por citometria de fluxo em células cultivadas. Os resultados foram plotados em forma de histograma.

As CTM de medula óssea foram caracterizadas por citometria de fluxo através da análise da presença de 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, foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45, que são considerados marcadores positivos de células-tronco hematopoiéticas.

#### **4.1.5. Marcação celular com anticorpos primário e secundário**

As CTM, em terceira passagem, de medula óssea na quantidade  $1 \times 10^6$  células 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  $4^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com  $1 \mu\text{g}$  do anticorpo secundário monoclonal de coelho anti-IgG de camundongo, marcado com FITC fluoresceína isotiocianato (calbiochem) ou ALEXA (Invitrogen) – 568nm ou 488nm (invitrogen) por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . 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.

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

Um mínimo de 15.000 eventos foi adquirido, 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, utilizou-se um gráfico de histograma para se delimitar 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 . A partir da definição destes parâmetros, iniciou-se a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

#### **4.1.7. Análise fenotípica das CTMs por Imunocitoquímica (ICC)**

As CTMs de medula óssea em cultura na terceira passagem, foram fixadas por 10 minutos 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 3 vezes em PBS, 5 minutos cada lavagem e bloqueadas, à temperatura ambiente, com 3% de BSA em PBS-Tween 0,05% por 2 horas. As células foram então novamente lavadas 2 vezes 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 3 vezes 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, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas, 3 vezes 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 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). A co-localização das imagens com dupla marcação foi feita pela sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo.

#### 4.1.8. Marcação celular para rastreamento

- DAPI

Após a terceira passagem as CTM 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. As CTM 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 microcápsulas que liberam nanocristais fluorescentes chamados *quantum dots* (Qdots) no citoplasma de células vivas usando um peptídeo ligante específico. Uma vez dentro das células vivas, estes nanocristais emitem uma fluorescência intensa e estável que pode ser rastreada durante várias gerações mas não são transferidas para populações de células adjacentes. Para marcação das CTMs com os Qtrackers foi realizado o seguinte procedimento:

Preparou-se uma solução de marcação de 10nM misturando 1µl do reagente A e B do Qtracker em um *ependorf* de 1,5 mL que foi incubada à temperatura ambiente

por 5 minutos. A seguir adicionou-se DMEM ao tubo, procedeu-se à sua homogeneização e adicionou-se uma suspensão de  $1 \times 10^6$  CTM. As células foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 60 minutos e lavadas com meio DMEM 3 vezes. As células foram mantidas no gelo até a realização do transplante.

## **4.2. ESTUDO *IN VIVO***

### **4.2.1. Estabelecimento de um modelo de lesão pelo laser**

Os ratos Wistar (n=18) foram anestesiados com uma mistura de ketamina (40 mg/kg peso) e xylazina (15 mg/kg peso), injetadas por via intraperitoneal. A midríase foi induzida pela anestesia sem necessidade de dilatação pupilar medicamentosa. A lesão retiniana foi induzida pelo Nd-YAG laser, utilizando-se uma energia média de 0,5 mJ. Utilizou-se a lente de 3 espelhos de Goldman para visibilização da retina e realizou-s aproximadamente 15 a 20 disparos de laser, ao redor do disco óptico. As lesões produzidas foram todas de espessura total da retina e coróide, observando-se na maioria das vezes uma hemorragia sub-retiniana profunda e às vezes leve hemorragia vítrea, após o disparo do laser. Animais que evoluíram com hemorragia vítrea maciça (3 animais) foram excluídos do estudo.

### **4.2.2. Transplante intravítreo das CTM**

Dezoito ratos Wistar SHR, com 10 a 12 semanas de vida foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina (40 mg/kg peso) e xylazina (15 mg/kg peso). Uma suspensão celular (20  $\mu\text{l}$ ) contendo aproximadamente  $4 \times 10^5$  CTM marcadas pelo DAPI foi lentamente injetada na cavidade vítrea, por via justalímbica, utilizando-

se uma agulha 30 gauge, 24 horas após a indução da lesão. A injeção foi realizada em ambos os olhos de 9 ratos. Portanto, dois grupos de animais foram estudados: 1) Ratos com lesões retinianas e injeção de CTM (n=9); 2) Ratos com lesões retinianas sem injeção de CTM (n=9) .

#### **4.2.3. Preparo dos tecidos para análise**

Os animais foram sacrificados 2, 4, e 8 semanas após o transplante. O bulbo ocular foi enucleado, por peritomia límbica 360°, isolamento dos músculos extra-oculares e dissecação do nervo óptico até o ápice da órbita. Os olhos 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  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ) usando um micrótomo. Para ambos os processos, as lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina, e examinadas em um microscópio óptico para avaliar a preservação da morfologia retiniana.

#### **4.2.4. Análise morfológica por imunohistoquímica**

Todos os blocos embebidos em paraplast foram cortados, o paraplast foi removido, os cortes foram re-hidratados e submetidos à 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 em 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). Co-localização das imagens com dupla marcação foi feita pela sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo.

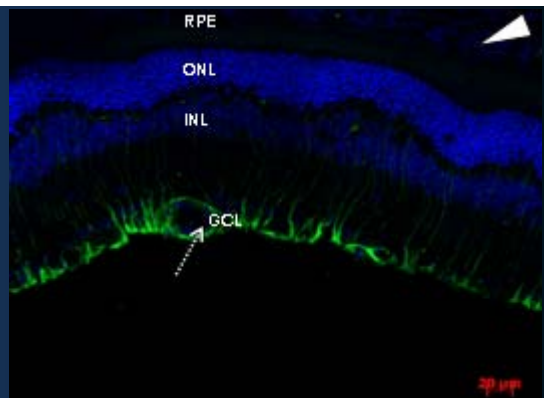
**Quadro 1- Anticorpos primários para Imunocitoquímica (ICC) e Citometria de Fluxo (CF)**

<b>Imunocitoquímica e Citometria de Fluxo</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Teste</b>	<b>Espécie</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Diluição</b>
	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

**Quadro 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

## 5. RESULTADOS

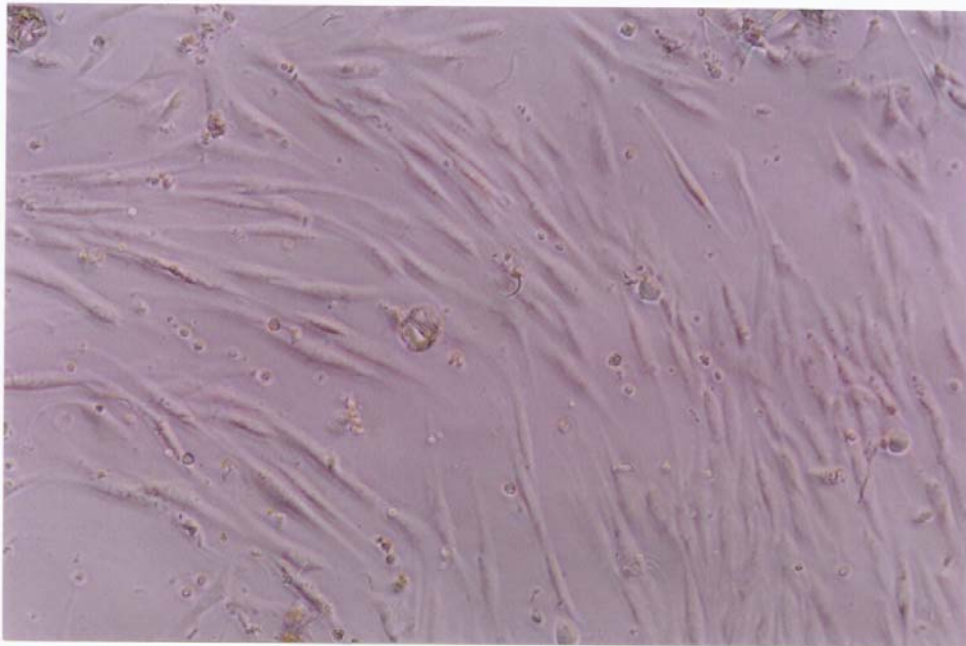




As células-tronco foram testadas quanto à sua viabilidade, produção de fosfatase alcalina e quanto à presença de marcadores específicos de membrana para células-tronco mesenquimais.

### **5.1. Morfologia das Células-Tronco mesenquimais isoladas de medula óssea**

As células-tronco isoladas de medula óssea de ratos Wistar, em cultura com meio de cultivo celular DMEM - 10% SFB, assumiram a forma fusiforme alongada com núcleo central e alguns prolongamentos. Essas células apresentaram altas taxas replicativas e aderiram às garrafas de cultivo celular.

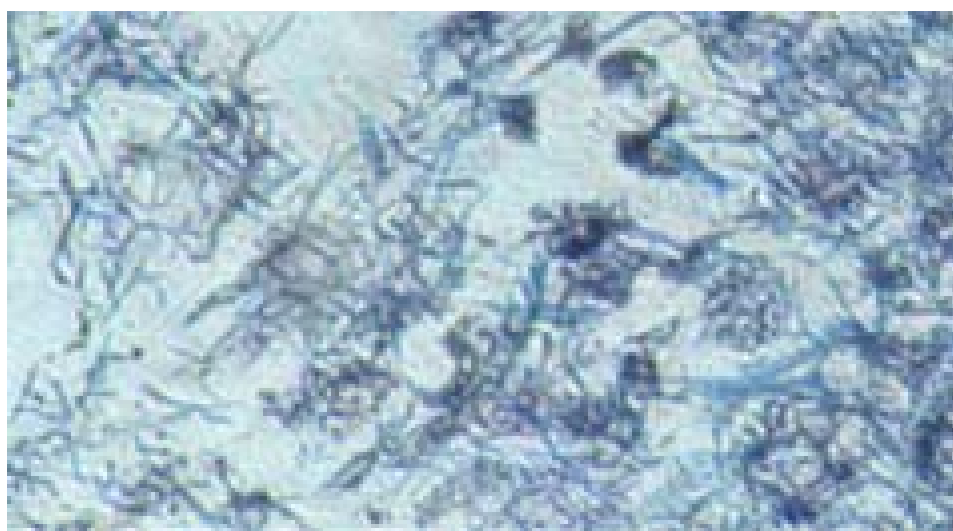


**Figura. 1. Cultura celular de células-tronco isoladas de medula óssea .**

Documentação fotográfica das células-tronco após 3<sup>a</sup> passagem ao microscópio óptico no aumento de 100x.

## 5.2. Análise morfológica das atividades enzimáticas das células-tronco mesenquimais isoladas de medula óssea

A análise morfológica documentada nos ensaios de viabilidade celular (MTT) das CTM mostrou a presença de cristais de formazam , comprovando a viabilidade celular por meio da atividade enzimática. Nos ensaios da atividade da Fosfatase alcalina (FA) foram observados pontos escuros, nas figuras, que representam a formação do produto e sua sedimentação. Isso comprova a atividade enzimática das CTM (Fig. 2).

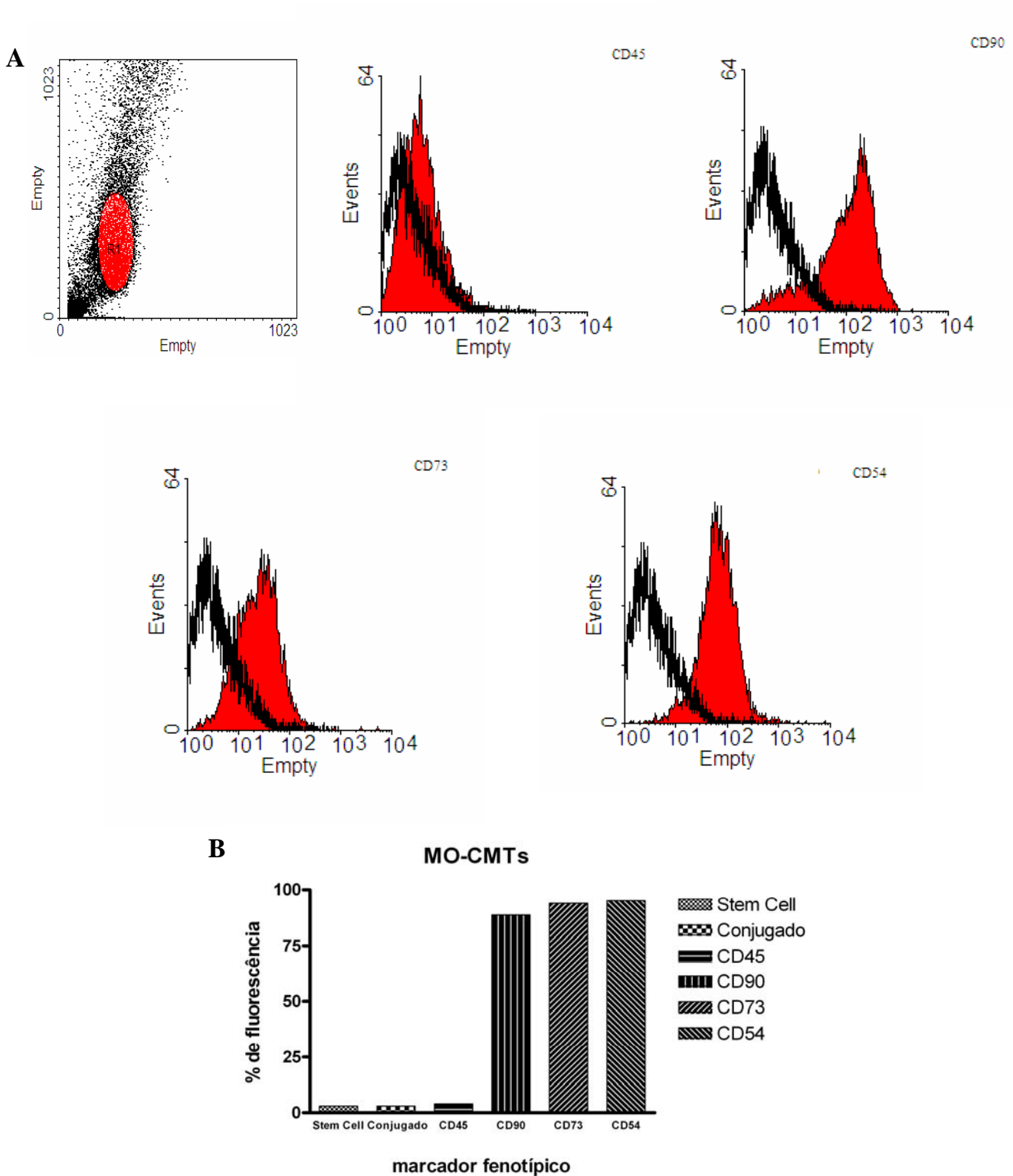


**Figura 2. Ensaio da atividade de fosfatase alcalina.** Análise morfológica documentada no aumento de 100X ao microscópio óptico.

## 5.3. 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

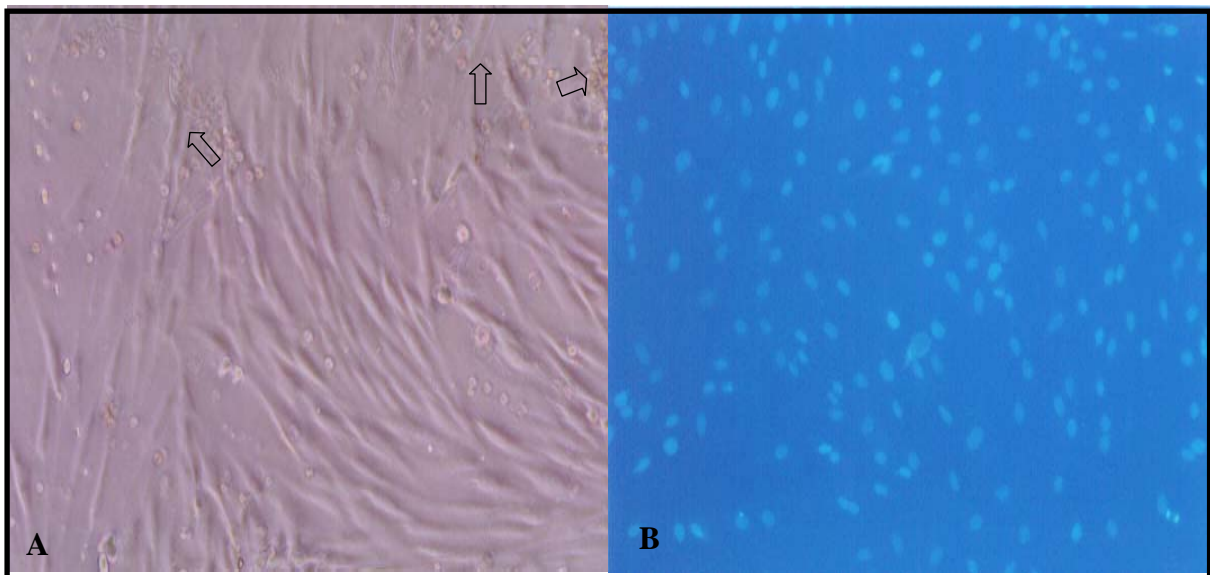
medula óssea. Para o estabelecimento da cultura de CTM foram selecionados os determinantes de complementaridade: CD45, CD54, CD73,e CD90. Os CD29, CD44, CD54, CD73 e CD90 são, de acordo com a literatura marcadores específicos para CTMs. Os CD34 e CD45 são característicos das células-tronco hematopoiéticas.



**Figura 3-** Análises individuais plotadas a partir das análises fenotípicas para marcadores moleculares obtidas por citometria de fluxo das CTM. Na fig. 3A, o gráfico de pontos (1<sup>o</sup> fig. à esquerda) mostra a população analisada e os histogramas mostram a intensidade de fluorescência de cada marcador analisado. Na fig. 3B, a análise quantitativa dos controles (só células e controle de conjugado) e de cada marcador está representada em forma de gráfico.

#### 5.4. Marcação das células para rastreamento

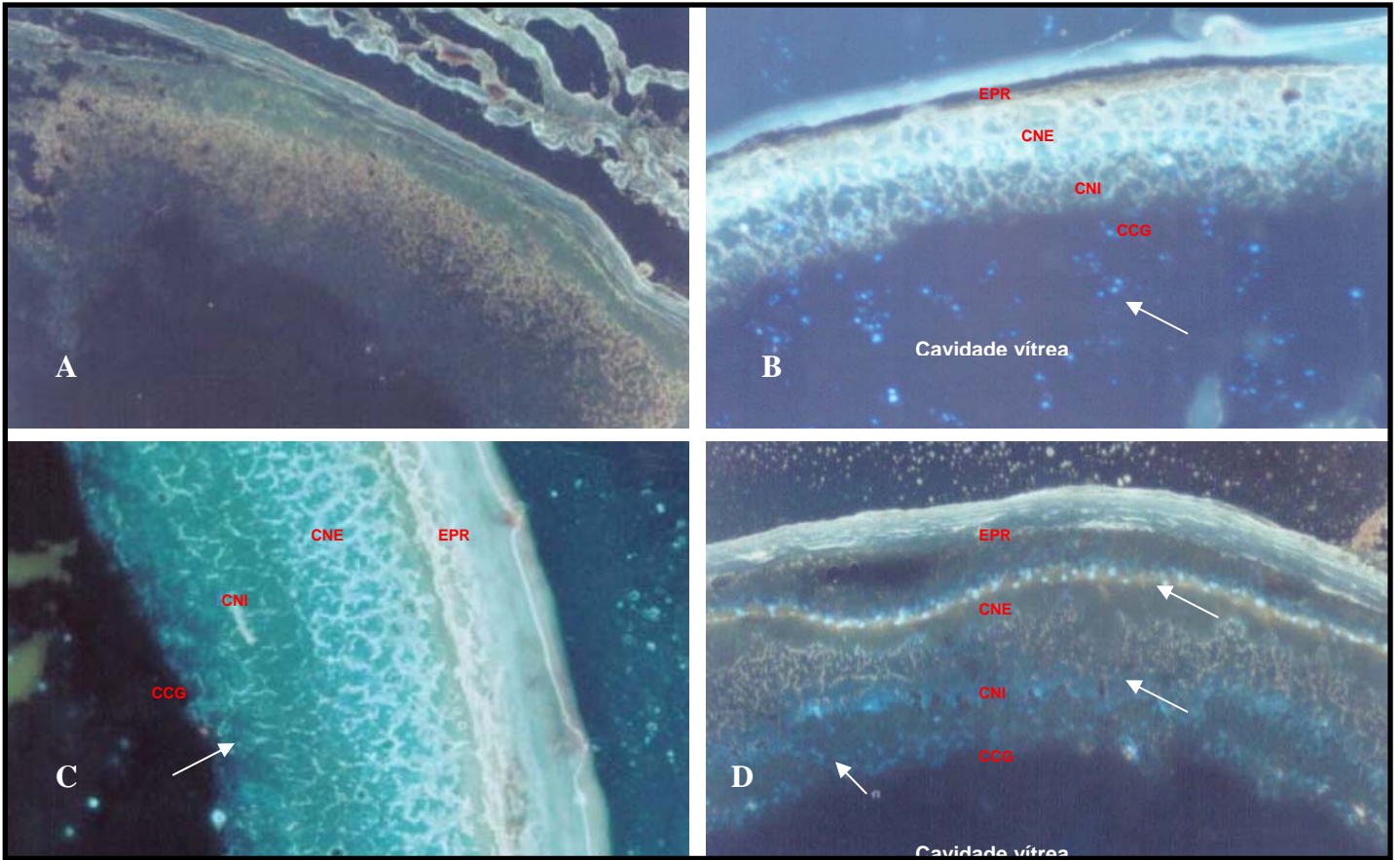
Para verificar o destino das CTM transplantadas em retinas lesadas pelo Nd-YAG laser, as células foram pré-marcadas em cultura com DAPI antes da realização do transplante.



**Figura 4- Análise morfológica das CTM em cultivo e marcadas com DAPI.** A figura 4A mostra uma microscopia de contraste de fase das CTM de rato em garrafas de cultura, na segunda passagem. As setas mostram a presença de células (eritrócitos) não aderentes de forma redonda. Depois de expandir essas células até a terceira passagem, obtivemos uma cultura homogênea em monocamada (CTM) a qual foi marcada com DAPI, como é mostrado na fig. 4B.

### **5.5. Padrão de migração das CTM após transplante**

Para verificar a incorporação e distribuição das células transplantadas na retina lesada, os olhos foram enucleados em duas, quatro e oito semanas após o transplante (Fig. 6). Observou-se que as células transplantadas incorporaram ao tecido retiniano de forma tempo-dependente. A maioria das células transplantadas sobreviveu em todos os olhos e em todos os tempos avaliados. Na segunda semana (Fig. 6B), a maioria das CTM se manteve na cavidade vítrea, na quarta semana (Fig. 6C) algumas células foram encontradas na retina. Na oitava semana (Fig. 6D) pôde-se observar que uma grande quantidade de células encontrava-se na retina neural. Estes achados sugerem que as CTM transplantadas possuem capacidade de migração em direção ao tecido lesado (trofismo) e são capazes de se incorporar neste tecido.



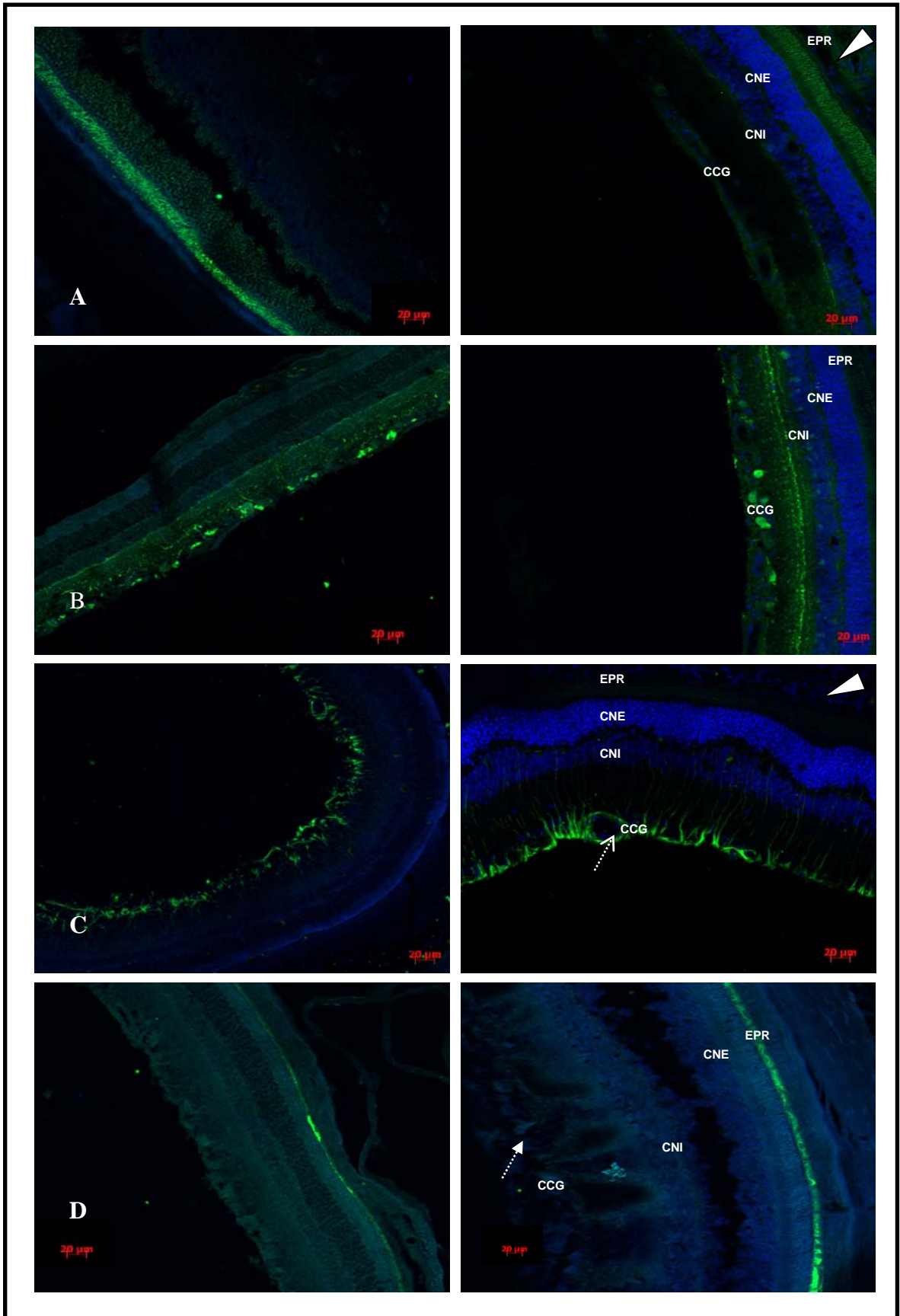
**Figura 5-** Microscopia de fluorescência mostrando a migração das CTM marcadas com DAPI após transplante intravítreo em ratos cujas retinas foram lesadas pelo laser. A Figura 5A mostra um corte de retina do grupo controle, cuja retina foi lesada mas não houve injeção de células-tronco. Fig. 5B: Distribuição das células transplantadas 2 semanas após o transplante, mostrando que a maioria das células ainda se encontra na cavidade vítrea. Fig. 5C: Quatro semanas após o transplante algumas células transplantadas já haviam se incorporado na retina. Fig. 5D: Oito semanas após o transplante observa-se que a maioria das células transplantadas já se encontrava nas camadas nuclear externa, nuclear interna e de células ganglionares. As setas mostram a localização das CTM após transplante. Aumento de 150x.

## 5.6. Análise imunohistoquímica da retina

Com o objetivo de averiguar se as CTM transplantadas e distribuídas pelo tecido retiniano (na oitava semana) expressavam marcadores específicos de células retinianas, foi realizado um ensaio de imunohistoquímica, em que o tecido retiniano foi fixado e embebido em paraplast. Optou-se pela fixação do tecido ao invés da avaliação deste tecido a 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 confiável. 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 utilizados neste estudo foram a rodopsina, para bastonetes, a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para células de Müller e astrócitos, parvalbumina para células bipolares e amácrinas, e pan-citoqueratina para o epitélio pigmentar da retina (Tabela 2). A maioria das células marcadas com DAPI, presumivelmente CTM, incorporou na camada nuclear externa (CNE) e expressaram rodopsina (Fig. 6A- painel direito), e parvalbumina (Fig. 6B- painel direito). Um pequena quantidade destas células também se mostrou positiva para GFAP (Fig. 6C-painel direito). Também foram observadas células marcadas com DAPI no espaço sub-retiniano, mas estas células não expressaram marcadores retinianos específicos (Fig. 6 A e D painel direito). Nos cortes de tecido retiniano do grupo controle (onde a retina lesada 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. 6-painel esquerdo). Não



houve co-localização de células marcadas com DAPI e marcadores específicos para EPR. (Fig.6D-painel direito).

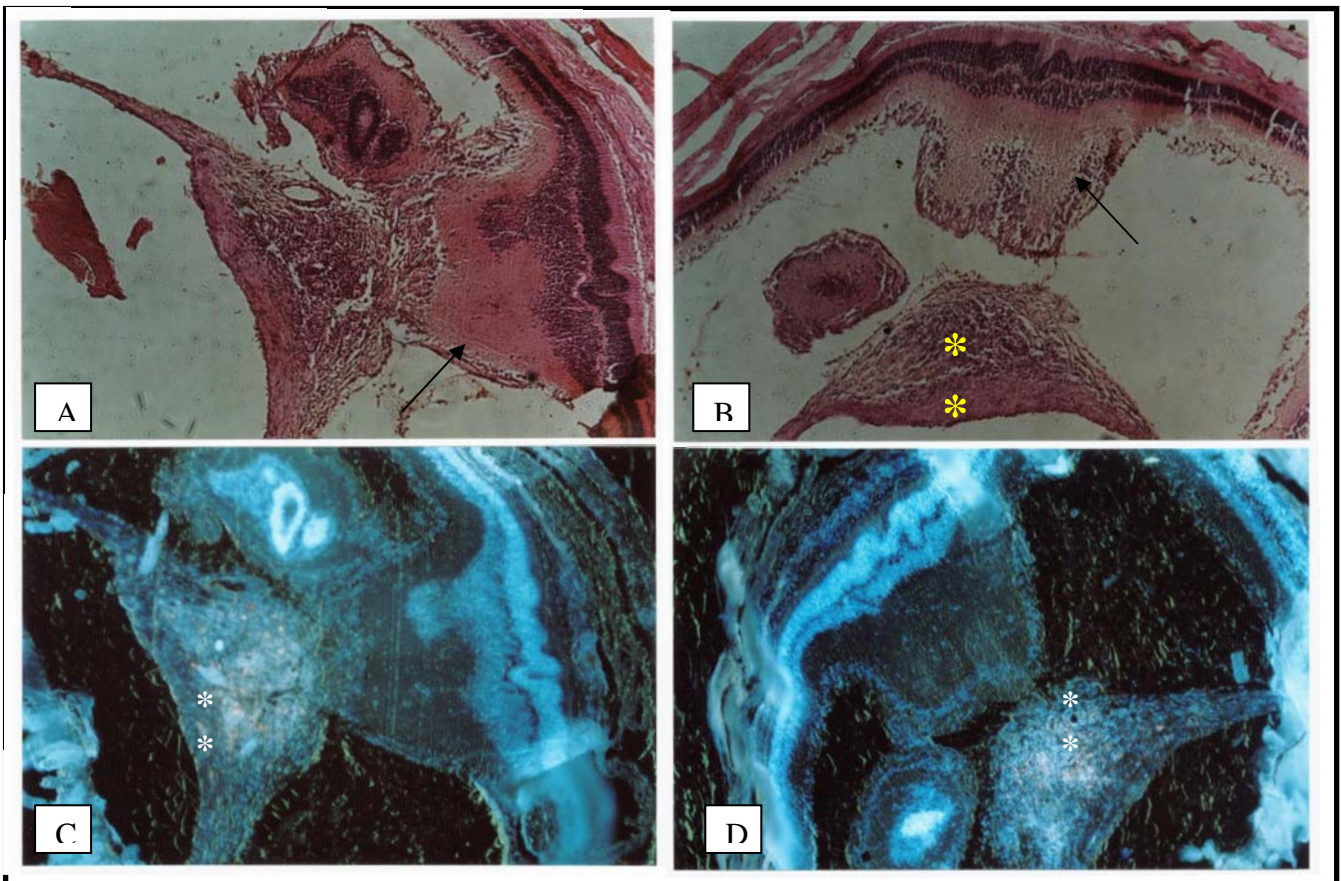


**Figura 6- Análise imunohistoquímica das CTM marcadas com DAPI em cortes de retinas lesadas 8 semanas após transplante intravítreo.** As imagens localizadas no **painel esquerdo** da figura 6 mostram imuno-reatividade por um marcador retiniano específico em cortes de retinas lesadas **tratadas somente com PBS** (controle). As imagens no **painel direito** da figura mostram imuno-reatividade por um marcador retiniano específico (verde), em cortes de retinas lesadas e **tratadas com CTM**. Oito semanas após o transplante, as células transplantadas marcadas com DAPI (azul) co-expressaram rodopsina (verde-6A) , parvalbumina (verde-6B) e GFAP (verde- 6C) . As cabeças de setas no painel direito (A e D) indicam a presença de células transplantadas (azul) no espaço sub-retiniano. As imagens do grupo controle (painel esquerdo) não mostraram marcações inespecíficas. Observa-se o núcleo azul corado pelo DAPI na maior parte das células, devido à difusão do corante para as células do tecido receptor. Os anticorpos específicos se ligam a membrana celular das células, o que provavelmente obscureceu os núcleos celulares supostamente corados pelo DAPI. Barras de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

### **5.7. Dupla marcação: Resultados do QuantumDot**

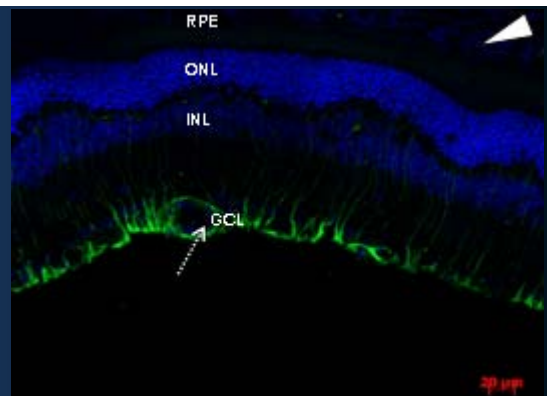
Realizou-se uma dupla marcação das CTM . O núcleo foi marcado com DAPI e o citoplasma foi marcado com Qdot, um nanocristal que emite fluorescência e precisa de um peptídeo alvo para entrar na célula. Por isso, se ocorrer morte celular durante o processo de transplante as células marcadas com DAPI e Qdots 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, o tecido retiniano lesado pelo Nd-YAG laser foi processado da mesma forma que anteriormente. Neste tempo é esperado que a maioria das células ainda se encontre no espaço vítreo, com pouca integração. Foi feita, então, uma coloração por Hematoxilina e Eosina em alguns cortes (fig. 7A e B) para avaliar a morfologia, e outros foram simplesmente processados a fresco para localização das células transplantadas no tecido por meio de sua fluorescência (fig. 7C e D).



**Figura 7- Migração das CTM marcadas com DAPI e Qdot, duas semanas apos o transplante.** Nas figuras 7A e B, coradas por HE pode ser observada uma desorganização no tecido retiniano pela lesão induzida (setas). Pode-se observar também um grupo de células adjacentes. É difícil precisar se são células do tecido ou se são CTM que estão migrando em direção a essa lesão (asteriscos), por eventual trofismo. Nas figuras 7C e D é verificado também que neste grupo de células existem células duplamente marcadas com DAPI e Qdot (azul e rosa, 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. 7C e D, mas não com Qdot (rosa). Isso indica que realmente está havendo transferência do corante DAPI de células mortas transplantadas para células residentes do tecido.

## 6. DISCUSSÃO



Existem várias doenças degenerativas da retina, como a retinose pigmentar e outras distrofias, que podem evoluir com acentuada baixa de acuidade visual (HARTONG, *et al*, 2006; GOODWIN P, 2008). Embora se procure prevenir ou retardar o processo degenerativo, os resultados dessas medidas ainda são muito limitados. A possibilidade do uso de células-tronco com esta finalidade despertou grande interesse e ensejou pesquisas científicas para avaliar seu real alcance e limitações.

As células-tronco vêm sendo estudadas por meio de vários modelos experimentais. O modelo experimental utilizado neste experimento mostrou-se de fácil execução e boa reprodutibilidade. Optou-se por realizar o trabalho em ratos Wistar pelo fato destes animais serem facilmente mantidos em biotério em grande quantidade e serem isogênicos, ou seja, o material genético dos ratos doadores é idêntico ao material genético dos animais receptores - o que descarta a possibilidade de rejeição às células injetadas e torna desnecessário o uso de imunossuppressores.

Alguns estudos (TOMITA, *et al* 2002, COLES, *et al.*, 2004), sugerem o uso de agulha de insulina para indução da lesão na retina. Inicialmente, no presente estudo, as lesões retinianas foram induzidas com agulha de insulina, por via *pars plana*. Entretanto, a baixa reprodutibilidade das lesões criadas nos fez abandonar este método de indução de lesão. Foi aventada a hipótese de realizar as lesões retinianas utilizando laser de argônio, mas devido ao fato dos ratos serem albinos (EPR não pigmentado), além da lesão pelo laser de argônio teoricamente não ser profundamente destrutiva, foi abortada a idéia de realizar este método de lesão.

As lesões foram induzidas com YAG laser, pela obtenção de trauma retiniano de espessura total, em região peripapilar, utilizando-se lente de 3 espelhos de Goldman. O padrão de lesão induzida foi muito similar em todos os animais

estudados, razão pela qual este modelo foi selecionado para a realização deste estudo.

Além do tipo celular a ser utilizado, outra questão a ser estudada é a via preferencial de transplante das células-tronco para dentro do olho. As principais vias são a intravítrea e a sub-retiniana. Ambas são amplamente descritas na literatura. O implante sub-retiniano de células-tronco necessita de vitrectomia prévia, com a indução de descolamento localizado da retina sensorial para injeção das células. A injeção intravítrea é um procedimento menos invasivo e com menor risco de complicações (JAISSE, *et al.*, 2005), razão pela qual se escolheu esta via de administração de células-tronco.

Diferentes estudos publicados têm mostrado diferentes resultados quanto à migração, incorporação e diferenciação das CTM no tecido retiniano. Embora tenha sido demonstrado que o transplante de células-tronco possa sobreviver na retina receptora (KLASSEN, 2007), integrar-se às várias camadas da retina e estabelecer sinapses com as células receptoras, o seu uso para substituir/renovar fotorreceptores parece ainda ser limitado. De fato, vários estudos sugerem que não há integração de células doadoras na camada nuclear externa e que as células-tronco não se diferenciam em fotorreceptores (PRESSMAR, *et al.*, 2001; VAN HOFFELEN, *et al.*, 2003; MEYER, *et al.*, 2006; CANOLA, *et al.*, 2007).

Algumas células expressando marcadores específicos de fotorreceptores foram detectadas em estudos após transplante sub-retiniano (KWAN, *et al.*, 1999; QIU, *et al.*, 2005) e intravítreo (COLES, *et al.*, 2004) de células-tronco. Entretanto, nestes estudos, não se demonstrou, que as células transplantadas desenvolveram um aspecto morfológico típico de fotorreceptores maduros.

Por outro lado, outros estudos como o de Kicic *et al.* (2003), sugeriram que as



CTM estão aptas a se diferenciar em fotorreceptores *in vitro* e *in vivo*. Nesse estudo, sob condições de cultura específicas, as CTM se diferenciaram em fotorreceptores em oito a dez dias, *in vitro*. Esses autores demonstraram também, *in vivo*, que houve diferenciação das CTM em fotorreceptores, duas semanas após transplante de CTM em ratos portadores de distrofias retinianas.

No presente estudo observou-se que com duas semanas de transplante havia alguma migração celular em direção ao sítio da lesão. Um maior número de células havia migrado para a retina quatro semanas após a injeção das células-tronco. Ao final de oito semanas a maioria das células injetadas encontrava-se na retina receptora.

A sobrevivência celular com duração de alguns meses foi observada em estudos prévios. De fato, Warfvinge *et al* (2005) e Klassen *et al* (2007), em trabalho utilizando porcos, observaram que as células podem sobreviver por até cinco semanas após o transplante. Em trabalho mais recente, em porcos GFP, KLASSEN *et al.*, 2008 descreveram que as células transplantadas sobreviveram por até 10 semanas após o transplante e sugeriram que esta maior sobrevivência era devida à utilização de células alogênicas GFP+ como doadoras.

Neste estudo, os resultados obtidos por imunohistoquímica realizados após oito semanas de injeção das CTM na cavidade vítrea sugeriram que, se as células transplantadas (CTM) estão co-expressando marcadores específicos de células retinianas elas teriam se diferenciado em neurônios retinianos.

Analisando-se as imagens de imunohistoquímica observa-se que toda a camada da retina que contém os fotorreceptores, se encontrava marcada, ou seja, seus núcleos estavam marcados com DAPI e suas membranas estavam marcadas com anticorpo anti-rodopsina, sugerindo que todas essas células poderiam ser as

células transplantadas (CTM) que já teriam, assim, se diferenciado em bastonetes e estavam produzindo rodopsina.

Na análise desses resultados devem ser considerados alguns fatos relevantes. Inicialmente, consideramos que teria ocorrido diferenciação das células injetadas em células das camadas específicas da retina. Esses resultados - aparentemente contundentes - sugeriam que uma análise cuidadosa necessitava ser implementada para verificar eventuais limitações metodológicas. De fato, estudos publicados após estas nossas observações (BURNS *et al.*, 2006) vieram esclarecer algumas destas limitações. Nesse estudo os autores relataram 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 na 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 captada pelas células residentes neste local. Este evento, que ocorre *in vivo*, demonstra uma importante limitação de experimentos que utilizam tais corantes como marcadores, já que células normalmente residentes no tecido podem se tornar marcadas e sendo assim, confundidas com células transplantadas, o que caracterizaria um falso positivo (BURNS *et al.*, 2006).

Os resultados observados neste estudo demonstraram que, de fato, o uso desses corantes apresentam estas limitações. Os resultados do nosso estudo bem como as observações de BURNS *et al.*, 2006, sugeriram que a difusão do corante era um fator que precisava ser considerado e se possível eliminado, permitindo assim a melhor identificação das CTM que migraram.

Embora o DAPI seja extensivamente utilizado para marcação de células-tronco, uma falsa marcação celular pode produzir resultados pouco confiáveis, já que a marcação adequada das células-tronco é um passo indispensável na validação de qualquer terapia celular baseada em propriedades de diferenciação.

O corante fluorescente azul, DAPI, liga-se à cadeia dupla de DNA da célula (BARCELLONA e GRATTON, 1989; BARCELLONA e GRATTON, 1990; KAPUSCINSKI, 1995) para formar um complexo que fluoresce 20 vezes mais que o DAPI isoladamente. Embora o corante seja impermeável às células, altas concentrações penetram em células vivas. O DAPI é um corante popularmente utilizado em técnicas fluorescentes multicoloridas, hibridização *in situ* do RNAm e experimentos celulares *in vivo*.

Corantes fluorescentes podem extravasar das células marcadas e “contaminar” células adjacentes. A marcação celular sem alterar sua morfologia ou função é um fator crítico na investigação do comportamento celular, crescimento, migração e diferenciação. Por estas razões, pesquisadores estão sempre procurando marcadores que sejam estáveis, não-tóxicos e que não sejam transmitidos de célula à célula em experimentos *in vivo* e *in vitro*.

Para provar a hipótese de difusão do DAPI para células adjacentes, foi feito um experimento controle. Neste, foi realizada uma dupla marcação das CTM. O núcleo foi marcado com DAPI e o citoplasma foi marcado com Qdot, um nanocristal, marcador citoplasmático, que emite fluorescência e precisa de um peptídeo alvo para entrar na célula (MULLER-BORER *et al.*, 2007; SHAH *et al.*, 2007; SOLANKI *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008). Este peptídeo, que normalmente não está presente nos tecidos oculares, é adicionado durante o preparo da marcação das células-tronco. Por isso, caso ocorra morte celular durante o processo de transplante

das células marcadas com DAPI e Qdots, pode haver liberação de ambos no tecido hospedeiro. Entretanto, para o Qdot marcar células hospedeiras é preciso que existam peptídeos alvos neste meio, o que não ocorre. Ou seja, o QuantumDot só pode ser incluído dentro das células através de um peptídeo, e não pode ser transferido de uma célula para outra.

Neste último experimento, duas semanas após o transplante, o tecido retiniano também lesado por Nd-YAG laser, foi processado como no experimento anterior. Foi feita, então, uma coloração por HE em alguns cortes (fig. 8A 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. 8C e D). Observou-se que as células coradas pelo QuantumDot (rosa) haviam migrado em direção a lesão, mas um número muito maior de células estava corado em azul (DAPI), o que confirma a difusão do DAPI para células adjacentes.

Vários marcadores tem sido utilizados para marcação de células-tronco antes do transplante. Os principais marcadores são análogos de timidina, como o 5-bromo-2-deoxiuridina, DAPI, iododeoxiuridina, e timidina tritiada. Alguns estudos mostram que estes marcadores permitem a identificação adequada das células transplantadas. (LIMB, *et al*, 2006; VEMUGANTI, *et al*, 2006; KAN, *et al*, 2007). Entretanto, como descrito por trabalhos recentes, a difusão dos corantes, assim como a captação e incorporação destes pelas células receptoras limitam o seu uso. Tais corantes tendem a ser perdidos em situações em que há divisão celular das células doadoras, e em casos em que seja necessário avaliar detalhes da morfologia celular (KLASSEN *et al.*, 2008). O presente estudo demonstra a limitação da utilização de corantes que se difundem, como o DAPI, quando utilizados isoladamente. A utilização de outros marcadores, como o QDot utilizado neste

estudo, parece ser fundamental para uma melhor avaliação do comportamento das células-tronco.

Em síntese, o presente estudo mostrou que o modelo experimental desenvolvido é útil para estudos envolvendo transplante de células-tronco mesenquimais. Entre as vantagens deste modelo incluem-se:

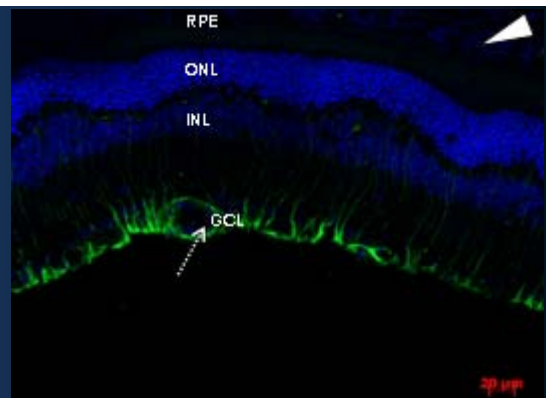
1. A facilidade de obtenção, manuseio e baixo custo dos animais;
2. A utilização de ratos albinos isogênicos favorece o mesmo padrão de resposta biológica, minimizando assim a ocorrência de respostas diferentes secundárias a peculiaridades individuais;
3. Os parâmetros para a indução da lesão produzida pelo YAG-laser podem ser precisamente selecionados, de forma a tornar as lesões mais reprodutíveis, de acordo com os padrões pré-estabelecidos;
4. A indução da lesão por meio de procedimento não-invasivo reduz o risco de infecção, que não é infreqüente com os procedimentos mecanicamente produzidos por agulha.

Ao iniciarmos este estudo o DAPI vinha sendo amplamente utilizado para estudar a integração e diferenciação das CTM transplantadas. Este estudo, assim como outros recentemente publicados, demonstraram que a difusão do DAPI limita grandemente a análise dos resultados observados quando ele é utilizado como marcador de células-tronco. Este fato explica inequivocamente resultados aparentemente discrepantes de diferentes trabalhos publicados na literatura. Embora algumas CTM possam ter sido incorporadas e ter experimentado diferenciação, os métodos utilizados não permitem esta conclusão.

Este estudo mostrou que, nas condições do experimento, as CTM obtidas da medula óssea de outros ratos isogênicos quando injetadas na cavidade vítrea,

migram, ao longo das primeiras semanas, para o sítio de lesão induzida pelo YAG-laser. A comprovação que as CTM experimentam diferenciação em células do tecido normal, requer, estudos adicionais que apresentem metodologia específica e adequada para a identificação e comprovação desse efeito biológico.

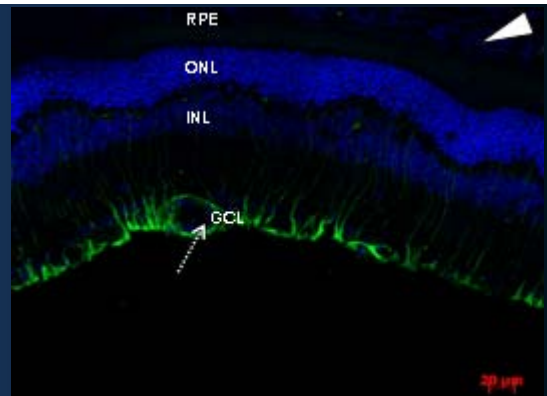
## 7. CONCLUSÃO



- 1) O modelo experimental criado mostrou-se adequado, reprodutível e efetivo para o estudo de indução de lesão retiniana e injeção intravítrea de CTM;
- 2) Houve migração das células-tronco para o sítio de lesão coriorretiniana. A migração foi progressiva e ocorreu ao longo das primeiras semanas após o transplante;
- 3) Não é possível afirmar se ocorreram integração e diferenciação das células-tronco transplantadas em células do tecido neuroretiniano.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



ABEDIN M, TINTUT Y, DEMER LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. **Circ Res.** 2004 Oct 1;95(7):671-6. Review.

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.

AHRENS N, TORMIN A, PAULUS M, ROOSTERMAN D, SALAMA A, KRENN V, NEUMANN U, SCHEDING S. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. **Transplantation.** 2004 Sep 27;78(6):925-9.

AMATO MA, ARNAULT E, PERRON, M. Retinal stem cells in vertebrates: parallels and divergences. **Int J Dev Biol.** 2004;48:993-1001.

ARAMANT RB, SEILER MJ. Fiber and synaptic connections between embryonic retinal transplants and host retina. **Exp Neurol.** 1995;133:244-255.

BALSAM LB, ROBBINS RC. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. **Clin Sci (Lond).** 2005;109(6):483-492.

BANIN E, OBOLENSKY A, IDELSON M. Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells . **Stem Cells.** 2006;24:225-246.

BARCELLONA ML, GRATTON E. Fluorescence lifetime distributions of DNA-4',6-diamidino-2-phenylindole complex. **Biochim Biophys Acta.** 1989;993(2-3):174-8.

BARCELLONA ML, GRATTON E. The fluorescence properties of a DNA probe. 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Eur Biophys J.** 1990;17(6):315-23.

BERSON EL; JAKOBIEC FA. Neural retinal cell transplantation: ideal versus reality. **Ophthalmology.** 1999; 106: 4445-446.

BERTRAM H, MAYER H, SCHLIEPHAKE H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stroma

cells for tissue engineered growth of bone. **Clin Oral Implants Res.** 2005 Oct;16(5):524-31.

BLATT A, COTTER G, LEITMAN M, KRAKOVER R, KALUSKI E, MILO-COTTER O, RESNICK IB, SAMUEL S, GOZAL D, VERED Z, SLAVIN S, SHAPIRA MY. Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells after induction of short ischemia is safe and may improve hibernation and ischemia in patients with ischemic cardiomyopathy. **Am Heart J.**2005.Nov;150(5):986.e1-986.e7.

BURNS TC, ORTIZ-GONZÁLEZ XR, GUTIÉRREZ-PÉREZ M, KEENE CD, SHARDA R, DEMOREST ZL, JIANG Y, NELSON-HOLTE M, SORIANO M, NAKAGAWA Y, LUQUIN MR, GARCIA-VERDUGO JM, PRÓSPER F, LOW WC, VERFAILLIE CM. 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, SCHORDERET DF, ARSENIJEVIC Y. 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.

CHIOU SH, KAO CL, PENG CH, CHEN SJ, TARNG YW, KU HH, CHEN YC, SHYR YM, LIU RS, HSU CJ, YANG DM, HSU WM, KUO CD, LEE CH. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2005 Jan 21;326(3):578-85.

COLES BL, ANGENIERUX B, INOUE T, DEL RIO-TSONIS K, SPENCE JR, McINNIS RR, ARSENIJEVIC, VAN DER KOOY. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2004;101:15772-15777.

CORREIA AS, ANISIMOV SV, LI JY, BRUNDIN P. Stem cell-based therapy for Parkinson's disease. **Ann Med.** 2005;37(7):487-98.

D'COSTA S, PETITTE 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.

DE BARI C, DELL'ACCIO F, VANDENABEELE F, VERMEESCH JR, RAYMACKERS JM, LUYTEN FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. **J Cell Biol.** 2003;160(6):909-18.

DENIZOT F, LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986;89(2):271-7.

FERREIRA L, KARP JM, NOBRE L, LANGER R. New opportunities: the use of nanotechnologies to manipulate and track stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008;3(2):136-46.

FISCHER, A.J. AND REH, T.A. Identification of a proliferative marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. **Dev Biol** 2000.220:197–210.

FISCHER, A.J. AND REH, T.A. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. **Nat Neurosci** 2001;4:247-252

GOODWIN P. Hereditary retinal disease. **Curr Opin Ophthalmol.** 2008;19(3):255-62.

HARTONG DT, BERSON EL, DRYJA TP. Retinitis pigmentosa. **Lancet.** 2006 Nov 18;368(9549):1795-809.

HAYNES T, DEL RIO-TSONIS K. Retina repair, stem cells and beyond. **Curr Neurovasc Res.** 2004 Jul;1(3):231-9. Review.

HAYNESWORTH SE, BABER MA, CAPLAN AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone.** 1992;13(1):69-80.

JAISSE GB, SZURMAN P, BARTZ-SCHMIDT KU; GERMAN RETINA SOCIETY; GERMAN SOCIETY OF OPHTHALMOLOGY; GERMAN PROFESSIONAL ASSOCIATION OF OPHTHALMOLOGISTS. Recommendation for the implementation of intravitreal injections--statement of the German Retina Society, the German Society of Ophthalmology (DOG) and the German Professional Association of Ophthalmologists (BVA). **Klin Monatsbl Augenheilkd**. 2005 May;222(5):390-5.

JAVAZON EH, BEGGS KJ, FLAKE AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Exp Hematol**. 2004 May;32(5):414-25. Review.

JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**. 2002 Jul 4;418(6893):41-9. Epub 2002 Jun 20.

JOHNS PR. Growth of the adult goldfish eye. Source of the new retinal cells. **J Comp Neurol**. 1977;176:343-357.

JOHNSTONE B, HERING TM, CAPLAN AI, GOLDBERG VM, YOO JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. **Exp Cell Res**. 1998 Jan 10;238(1):265-72.

JUSTESEN J, STENDERUP K, ERIKSEN EF, KASSEM M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. **Calcif Tissue Int**. 2002 Jul;71(1):36-44. Epub 2002 Jun 24.

KAPUSCINSKI J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotech Histochem**. 1995;70(5):220-33.

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.

KASSEM M, MOSEKILDE L, ERIKSEN EF. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates fluoride-stimulated collagen type I Production in cultures of human bone marrow stoma osteoblast-like cells. **J Bone Miner Res.** 1993 Dec;8(12):1453-8.

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 Aug 27;23(21):7742-9.

KLASSEN H, SAKAGUCHI DS, YOUNG MJ. Stem cells and retinal repair. **Prog Retin Eye Res.** 2004 Mar;23(2):149-81. Review.

KLASSEN H, KILGAARD JF, ZAHIR T, WARFVRINGE K. Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. **Stem Cells.** 2007;25:1222-1230.

KLASSEN H, WARFVRINGE K, SCHWARTZ PH, KILGAARD JF, SHAMIE N, JIANG C, SAMUEL M, SCHERFIG E, PRATHER RS, YOUNG MJ. Isolation of progenitor cells from GFP-transgenic pigs and transplantation to the retina of allorecipients. **Cloning and Stem Cells.** 2008;10(3):391-402.

KWAN AS, WANG S, LUND RD. Photoreceptor layer reconstruction in a rodent model of retinal degeneration. **Exp Neurol.** 1999;59:21-33.

LEE KD, KUO TK, WHANG-PENG J, CHUNG YF, LIN CT, CHOU SH, CHEN JR, CHEN YP, LEE OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Hepatology.** 2004 Dec ;40(6):1275-84.

LIMB GA, DANIELS JT, CAMBREY AD, *ET AL.* Current prospects for adult stem cell-based therapies in ocular repair and regeneration. **Curr Eye Res.** 2006 May;31(5):381-90. Review.

LODIE TA, BLICKARZ CE, DEVARAKONDA TJ, HE C, DASH AB, CLARKE J, GLENECK K, SHIHABUDDIN L, TUBO R. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. **Tissue Eng.** 2002 Oct;8(5):739-51.

MAYER EJ, HUGHES EH, CARTER DA, DICK AD. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. **Br J Ophthalmol.** 2003 Sep;87(9):1154-8.

MEYER JS, KATZ ML, MARUNIAK JA, KIRK MD. Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. **Stem Cells.** 2006;24:274-283.

MEZEY E, CHANDROSS KJ, HARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science.** 2000 Dec 1;290(5497):1779-82.

MITASHOV, V.I. Mechanisms of retina regeneration in urodeles.1996 **Int J Dev Biol** 40:833–844.

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 Apr 1;280(1):122-32.

MOSHIRI A, CLOSE J, REH TA. Retinal stem cells and regeneration. **Int J Dev Biol.** 2004;48(8-9):1003-14. Review.

MORRISON, SJ; UCHIDA, N; WEISSMAN, IL. The biology of hematopoietic stem cells. **Ann. Rev. Cell Dev. Biol.** (1995) 11: 35-71.

MULLER-BORER BJ, COLLINS MC, GUNST PR, CASCIO WE, KYPSON AP. Quantum dot labeling of mesenchymal stem cells. *J Nanobiotechnology.* 2007; 7;5:9.

PALLINI R, VITIANI LR, BEZ A, CASALBORE P, FACCHIANO F, DI GIORGI GEREVINI V, FALCHETTI ML, FERNANDEZ E, MAIRA G, PESCHLE C, PARATI E. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. **Neurosurgery**. 2005 Nov;57(5):1014-25; discussion 1014-25.

PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC; JAISWAL, RK; DOUGLAS, R; MOSCA, JD; MOORMAN, MA; SIMONETTI, DW; CRAIG, S; MARSHAK. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science** (1999) 284: 143-147.

POUNTOS I, GIANNOUDIS PV. Biology of mesenchymal stem cells. **Injury**. 2005;36 Suppl 3:S8-S12.

PRESSMAR S, ADER M, RICHARD G, SCHACHNER M, BARTSCH U, POUNTOS I, GIANNOUDIS PV. The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2001;42:3311-3319.

QIU G, SEILER MJ, MUI C, ARAI S, ARAMANT RB, JUAN JR E, SADDA S. Photoreceptor differentiation and integration of retinal progenitor cells transplanted into transgenic rats. **Exp Eye Res**. 2005;80:515-525.

REH TA. Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. **J Neurosci**. 1987;7:3317-3324.

REUBINOFF, BE; PERA, MF; FONG, CY; TROUNSON, A; BANGSO, A. Embryonic stem cells lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nature Biotechnology**.2000; 18: 399-404.

SAMPAOLESI M, BIRESSI S, TONLORENZI R, INNOCENZI A, DRAGHICI E, CUSELLA DE ANGELIS MG, COSSU G. Cell therapy of primary myopathies. **Arch Ital Biol**. 2005 Sep;143(3-4):235-42. Review

SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSSEN W, PATEL N, COOPER DR,



SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Exp Neurol**. 2000 Aug;164(2):247-56.

SCHRAERMEYER U, THUMANN G, LUTHER T, KOCIOK N, ARMHOLD S, KRUTTWIG K, ANDRESSEN C, ADDICKS K, BARTZ-SCHMIDT KU. Subretinally transplanted embryonic stem cells rescue photoreceptor cells from degeneration in the RCS rats. **Cell Transplant**. 2001;10(8):673-80.

SHAH BS, CLARK PA, MOIOLI EK, STROSCIO MA, MAO JJ. Labeling of mesenchymal stem cells by bioconjugated quantum dots. *Nano Lett*. 2007;7(10):3071-9.

SILVERMAN MS, HUGHES SE, VALENTINO TL, LIU Y. Photoreceptor transplantation: anatomic, electrophysiologic and behavioral evidence for the functional reconstruction of retinas lacking photoreceptors. **Exp Neurol**. 1992;115:87-94.

SMITH LEH. Bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa. **The Journal of Clinical Investigation**. 2004;114(6):755-757.

SOLANKI A, KIM JD, LEE KB. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging. *Nanomed*. 2008;3(4):567-78.

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 Sep ;131(18):4607-21.

STRAZNICKY, K, GAZE, RM. The growth of the retina in *Xenopus laevis*: an autoradiographic study. **J Embryol Exp Morphol**. 1971;26:67-79.

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 Dec;12(6):340-8.

TOMITA M, ADACHI Y, YAMADA H, TAKAHASHI K, KIUCHI K, OYAIZU H, IKEBUKURO K, KANEDA H, MATSUMURA M, IKEHARA S. 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, DEL RIO-TSONIS K. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. **Exp Eye Res**. 2004 Feb;78(2):161-72. Review.

TSONIS PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. **Differentiation**. 2002 Oct;70(8):397-409. Review.

VAN HOFFELEN SJ, YOUNG MJ, SHATOS MA, SAKAGUHI DS. Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2003;44:426-434.

VACCARINO FM, GANAT Y, ZHANG Y, ZHENG W. Stem cells in neurodevelopment and plasticity. **Neuropsychopharmacology**. 2001 Dec;25(6):805-15. Review.

VAN LAAKE LW, VAN HOOFF D, MUMMERY CL. Cardiomyocytes derived from stem cells. **Ann Med**. 2005;37(7):499-512.

VEMUGANTI GK. Can we Grow New Retina? **Community Eye Health J** 2006;19(57): 6-8.

YOUNG HE, DUPLAA C, KATZ R, THOMPSON T, HAWKINS KC, BOEV AN, HENSON NL, HEATON M, SOOD R, ASHLEY D, STOUT C, MORGAN JH 3RD, UCHAKIN PN, RIMANDO M, LONG GF, THOMAS C, YOON JI, PARK JE, HUNT DJ, WALSH NM, DAVIS JC, LIGHTNER JE, HUTCHINGS AM, MURPHY ML, BOSWELL E, MCABEE JA, GRAY BM, PISKURICH J, BLAKE L, COLLINS JA,

MOREAU C, HIXSON D, BOWYER FP 3RD, BLACK AC JR. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. **J Cell Mol Med.** 2005 Jul-Sep;9(3):753-69. Review.

WARFVINGE K, KAMME C, ENGLUND U, WICTORIN K. Retinal integration of grafts of brain-derived precursor cell lines implanted subretinally into adult, normal rats. **Experimental Neurology.** 2001;169, 1-12.

WARFVINGE K, KIILGAARD J, LAVIK E. Retinal progenitor cell xenografts to the pig retina: morphological integration and cytochemical differentiation. **Arch Ophthalmol.** 2005;123, 1385-1393.

WOJCIECHOWSKI AB, ENGLUND U, LUNDBERG C, WARFVINGE K. Long-term survival and glial differentiation of the brain-derived precursor cell line RN33B after subretinal transplantation to adult normal rats. **Stem Cells.** 2002;20(2):163-73.

WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J Neurosci Res.** 2000 Aug 15;61(4):364-70.

# Stem cells: potential source for retinal repair and regeneration

*Células tronco: fonte potencial para a regeneração retiniana*

Leonardo Torquetti<sup>1</sup>  
Paula Castanheira<sup>2</sup>  
Alfredo Miranda de Góes<sup>3</sup>  
Marcio Nehemy<sup>4</sup>

## ABSTRACT

Stem cells have been studied in several fields of Medicine, and their applications are not too far from the clinical practice. Retinal impairment by neuronal death has been considered incurable due to the limited regenerative capacity of the central nervous system. The capacity of stem cells to regenerate tissues, as well as their plasticity makes them a potential source for retinal repair. The stem cells are a great promise for the therapy of inherited retinal disorders and retinal-neuronal degenerative diseases, such as retinitis pigmentosa and allied retinal dystrophies, which can result in blindness. Because of the accessibility, expansibility, and multipotentiality mesenchymal stem cells are expected to be useful for clinical applications, especially in regenerative medicine and tissue engineering. Mesenchymal stem cells are clonogenic, nonhematopoietic stem cells present in the bone marrow. Given the appropriate microenvironment, they could differentiate into cardiomyocytes or even into cells of nonmesodermal derivation including hepatocytes and neurons. So far, the results of a few studies are consistent with the belief that cell-based therapies using mesenchymal stem cells may be effective when it comes to retinal damaged tissue repair.

**Keywords:** Stem cells; Regeneration/physiology; Retina; Mesenchymal stem cells; Retinal ganglion cells

## STEM CELLS: GENERAL OVERVIEW

The stem cells have been widely studied in the last few years in virtually all fields of Medicine<sup>(1-4)</sup>, especially in Cardiology<sup>(5-6)</sup>. There are two cardinal principles of stem cells: self-renewal and the multipotentiality to make all of the cell types of the particular tissue to which they belong<sup>(7)</sup>.

The human body contains several types of progenitor cells that are capable of dividing many times, while also giving rise to daughter cells with more restricted developmental potentials. Eventually these cells differentiate and have specific phenotypic characteristics that contribute to their highly specialized function. Examples of such stem cells include the totipotent zygote, as well as embryonic stem cells, hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells.

Two types of mammalian pluripotent stem cells have been isolated - Embryonic Stem Cells (ES) derived from pre-implantation embryos and Embryonic Germ Cells (EG) derived from primordial germ cells of the post-implantation embryo<sup>(8)</sup>. Embryonic stem cells express the transcription factor Oct-4, which maintains them in an undifferentiated state, with continuous proliferation. However, when these cells are removed from their origin, they begin to differentiate into other tissues even without stimulus.

Trabalho realizado na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

<sup>1</sup> Doutorando em Oftalmologia pela Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

<sup>2</sup> Doutoranda em Bioquímica e Imunologia pela UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brasil.

<sup>4</sup> Professor Adjunto do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Faculdade de Medicina da UFMG Belo Horizonte (MG) - Brasil.

**Endereço para correspondência:** Hospital São Geraldo - HC - Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Alfredo Balena, 110 - Belo Horizonte (MG) CEP 30130-100  
E-mail: leonardotorquetti@yahoo.com.br

Recebido para publicação em 30.01.2006

Última versão recebida em 17.07.2006

Aprovação em 02.08.2006

**Nota Editorial:** Depois de concluída a análise do artigo sob sigilo editorial e com a anuência do Dr. Ayrton Roberto Branco Ramos sobre a divulgação de seu nome como revisor, agradecemos sua participação neste processo.

As a result of the loss of the Oct-4 factor, *in vivo*, these cells could differentiate properly or inappropriately forming tumors after transplantation. So, when it comes to transplants, this becomes a very serious safety issue and the ability of these cells to form tumors in histocompatible animals reinforces the idea that it might be better to use differentiated cells, rather than embryonic stem cells for transplantation<sup>(8)</sup>.

Embryonic germ cells express SSEA-1<sup>(9)</sup>, a cell surface embryonic antigen, whose functions have been associated with cell adhesion, migration and differentiation and is often differentially expressed during development<sup>(10)</sup>. They are derived from the primordial germ cells, which occur in a specific part of the embryo/fetus called the gonadal ridge, and which normally develop into mature gametes (eggs and sperm). Both ES and EG are able to differentiate into derivatives of all three primary germ layers—endoderm, mesoderm, and ectoderm when culture conditions are adjusted<sup>(11)</sup>.

Hematopoietic stem cells are responsible for the constant renewal of the blood. These cells express CD34<sup>(12)</sup> and are classically isolated from the bone marrow or blood but they can also be found in the umbilical chord, in the fetal hematopoietic system. They are capable of self-renewal and differentiate in blood and immune system cells, however, their expansibility and differentiation capacity *in vitro* is decreased<sup>(13)</sup>.

Mesenchymal stem cells are non-hematopoietic, stromal cells that exhibit multilineage differentiation capacity, being capable of giving rise to diverse tissues<sup>(14)</sup>. They are found in a variety of tissues during development, mainly in the bone marrow of adults. These cells can be aspirated directly from iliac crest of the donors<sup>(15-17)</sup>. They are also easily isolated, expanded in culture and stimulated to differentiate into osteoblast<sup>(18)</sup>, chondrocytes<sup>(19)</sup>, skeletal muscle cells<sup>(20)</sup>, endothelium<sup>(21)</sup>, cardiac muscle cells<sup>(5-6)</sup>, hepatocytes<sup>(22)</sup>, adipocytes<sup>(23)</sup>, and non-mesoderm-type cells like neurons both *in vitro* and *in vivo*<sup>(24-25)</sup>.

The ability of stem cells to migrate to damaged tissue sites and stimulate repairs by differentiation into tissue-specific cells has been already demonstrated *in vivo*<sup>(26)</sup>.

In fact, different signals such as trauma, fracture, inflammation and necrosis, *in vivo*, can direct MSCs to mobilize and differentiate into cells of connective tissue lineages as well as other tissue lineages<sup>(27-28)</sup>.

The human mesenchymal stem cells (hMSC) are a population of cells in which a phenotype was determined by analysis of surface molecules by flux cytometry, as CD29, CD44, SH2, SH3, CD71, CD90, CD106, CD120a and CD124<sup>(29-32)</sup>. The ability to isolate, expand and direct the hMSC *in vitro* in distinct lineages allows to study the events associated with impairment and differentiation of these cells.

Finally, the bone marrow is the most common used source of stem cells. On account of its autologous characteristic, relative easy isolation and less ethical controversial nature when compared to embryonic stem cells, embryonic or bone marrow stem cells become the best choice in the treatment of diseases using cell-based therapy.

---

## STEM CELLS: RETINA REPAIR

---

Retinal impairment by neuronal death has been considered incurable because the central nervous system has a limited regenerative capacity. The ability to regenerate and repair damage of the retina is at the center of hopes for the therapeutic use of stem cells in the eye.

In retina regeneration, two events can occur. In one of them, differentiated cells neighboring the damage site go through a natural process of dedifferentiation and subsequently redifferentiate into a specific cell lineage for repair, in a process called transdifferentiation. The other strategy for retinal regeneration is the use of stem cells. Depending on the species, transdifferentiation or stem cells can be recruited to populate damaged retina<sup>(33-34)</sup>.

Regeneration of the retina in fish, bird, and amphibian has been observed to take place by a transdifferentiation of the retinal pigment epithelium (RPE). As for embryonic chicks, the transdifferentiation occurs via RPE and multipotent retinal progenitor cells in the ciliary marginal zone (CMZ), a circumferential neurogenic zone located at the extreme peripheral retina<sup>(35-36)</sup>. In adult birds, local retinal damage is repaired by the transdifferentiation of Müller glia cells<sup>(37-39)</sup>. In mammals, once retinal histogenesis is complete, there is no continued production of retinal neurons, and there is no evidence for a CMZ-like growth zone so retina regeneration in these species, even in embryos, is not observed unless their retina is properly induced<sup>(40)</sup>.

However, studies in humans have examined the expression of the neural progenitor marker nestin in retina. Nestin is expressed in some cells at the junction of the neural retina and the ciliary body, which suggests that a remnant of the CMZ may remain in humans<sup>(41)</sup>. Furthermore, it has been reported that neural stem cells (NSC), which are the potential source of several cells in the central nervous system, including neurons, astrocytes and oligodendrocytes could be isolated *in vitro* from mouse, rat and human remnant ciliary marginal zone; these cells can differentiate into neurons, such as photoreceptors, bipolar neurons and even Müller glia cells *in vitro*<sup>(37,42)</sup>. This approach, because of the complication of the extraction of these cells which involves microsurgical procedures, is not an option for the treatment of ocular diseases, and it is not clinically feasible, considering also the limited availability of pluripotent retinal stem cells<sup>(43)</sup>. In this case stem cells of other origins (harvested from other tissues) may be a hope for the retinal disorder therapy.

Retinal stem cells are not the only cells capable of retina regeneration. In the search for other sources of possible retinal progenitors in mammals, some authors have found that non-neuronal stem cells present in the eye, such as cells from the iris, corneal limbus, choroid and sclera can be induced to differentiate into retinal cells or at least neural cells<sup>(44-46)</sup>. These cells could also potentially provide a source for replacing damaged retina, but further investigation is needed.

There are plenty of possible sources for retina repair.

However, the multipotentiality of the MSCs as well as the easy isolation and culture properties and their high expansive potential make these cells the most appropriate source to be used as a therapeutic tool for retinal repair.

It was recently reported that cultured MSCs can be induced *in vitro* and *in vivo* to differentiate into non-mesenchymal derivatives such as neural cells<sup>(47-48)</sup>. Tomita et al. injected MSCs into injured rat eyes and observed that they were able to differentiate into retinal neural cells *in vivo*<sup>(49)</sup>. It was also demonstrated that MSCs can be induced to differentiate into photoreceptors *in vitro* and *in vivo*<sup>(43)</sup>. But despite the integration of stem cells in damaged retina layers and their differentiation into retinal cells, there was no evidence of functionality<sup>(37,50)</sup>. In contrast to these studies, another research using electroretinography (ERG), states that the ERG response after stem cell implantation was improved, indicating a functional integration of grafted cells<sup>(40)</sup>.

Taken together, these results suggest that a better understanding of the differentiated stem cell physiology is still needed, before considering the clinical application of these cells. However, it is clear that in the future MSCs could be used as an alternative in the treatment of degenerative retinal diseases and could potentially rescue injured retinal tissue.

---

#### CLINICAL APPLICATIONS AND FUTURE DIRECTIONS

---

A lot of inherited retinal and retinal-neuronal degenerative diseases, such as retinitis pigmentosa and allied retinal dystrophies can result in blindness. To date, no effective therapies have been developed to prevent or reverse the degenerative processes in these disorders. Studies were undertaken to evaluate the prospects of using stem cell transplantation as a mean of treating those disorders.

The first evidence that cell replacement therapy could be possible in the retina emerged with the observations that adult hippocampal stem cells/progenitors, transplanted into the vitreous of neonatal or adult eyes survived and were incorporated into the laminar structure of the host retina<sup>(51-52)</sup>. It was also recently reported that fetal mesenchymal stem cells have been successfully used already in intrauterine cell transplantation in the treatment of osteogenesis imperfecta, showing that the scope of potential medical indications is wide<sup>(53)</sup>.

When it comes to transplants, stem cells can be grafted into the eye in an undifferentiated state or in a more specialized state, similar to neuronal stem cells. After grafting stem cells in the retina, it is expected that these cells will differentiate into retinal cells and incorporate into the existing tissue. The migration and integration of the transplanted cells in host tissue is probably induced by its injury. According to Chako et al.<sup>(54)</sup>, the widespread migration and incorporation of neural stem cells were observed only in retina that was either diseased<sup>(52)</sup> or traumatized<sup>(55)</sup>. These types of injuries could provide a local milieu (interleukins, chemotaxins, inflammatory and

growth factors, etc) which may be responsible for the migration and incorporation of exogenous ocular stem cells.

Studies using the *rd* mouse model with retinal degeneration demonstrated that one marrow-derived stem cells exert great vasculotrophic and neurotrophic effects on the retina when injected intravitreally<sup>(56)</sup>. This rescue effect is most efficient when stem cells were injected prior to complete retinal degeneration. In the clinical setting, this could be feasible in degenerative disorders such as retinitis pigmentosa, in the early to mid-stages, when theoretically the therapy would be more efficient<sup>(57)</sup>.

A major issue facing stem cell research, and retinal transplantation of stem cells in particular, is the question of functional integration of grafted cells.

Despite the existence of ocular immune privilege, immune rejection is a major barrier to successful retinal transplantation. It is important to evaluate if stem cell grafts in different sites of the retina will survive without disrupting the morphology and laminar organization of the host retina and will not induce the formation of rosettes, which could compromise the functional integration of the graft within the host retina, failing to reconstruct its normal anatomy<sup>(53,57-58)</sup>. It becomes important to determine whether immune privilege is a feature of the subretinal space and the vitreous cavity when grafted with stem cells<sup>(25,59)</sup>.

Jiang et al. demonstrated in mice that retinal allografts, implanted in the subretinal space and vitreous cavity, experienced immune privilege and promoted deviation of immune responses at these sites<sup>(60)</sup>.

Väänänen demonstrated, in rats, that the transplantation of retinal progenitor cells survived in the subretinal space for a prolonged period of time and did not induce the formation of rosettes. In addition, this study suggested that the subretinal space offers a conducive environment for the differentiation of these cells as photoreceptors<sup>(53)</sup>.

In addition to the type of cell to be used, another issue to be investigated is the preferential way to insert the stem cells into the human eye. There are two ways of transplantation: subretinal or intravitreal. They are widely described in the literature and both of them have immune privilege features. The subretinal implantation of stem cells requires a vitrectomy, which is a large and risky procedure. Alternatively, the intravitreal injection is a more popular and much less invasive procedure<sup>(61)</sup>. As the current literature shows that, in rats and mice, there are no differences in both procedures, the intravitreal injection would be the best choice for being less invasive.

In conclusion, there are still many questions to be investigated and much work needs to be done before clinical application of a stem cell-based therapeutic approach in retinal repair could be applied. It is still too early to predict the possibility of a vision rescue of a patient with macular degeneration or retinitis pigmentosa. However, experimental studies point towards this direction. Findings in the field of retinal transplantation and stem cell grafting offer a new opportunity for the development of therapeutic strategies in human eye diseases and open new fields in the study of retinal repair using stem cells.

## RESUMO

Células-tronco têm sido estudadas em várias áreas da Medicina e suas aplicações brevemente deverão estar incorporadas à prática clínica. O dano retiniano pela morte neuronal é considerado incurável devido a pobre capacidade regenerativa do sistema nervoso central. A capacidade das células-tronco em regenerar tecidos, assim como sua plasticidade, faz que estas sejam uma fonte potencial de células para a regeneração retiniana. Células-tronco são muito promissoras para o tratamento das distrofias retinianas, como a retinose pigmentar e outras doenças neurodegenerativas, que podem evoluir para cegueira. As células-tronco mesenquimais são o tipo mais provável de células-tronco a serem utilizadas na prática clínica devido a sua fácil acessibilidade e multipotencialidade de diferenciação em vários tecidos. As células-tronco mesenquimais são células clonogênicas, não-hematopoiéticas, localizadas na medula óssea. Desde que seja proporcionado um microambiente apropriado, estas células podem se diferenciar em cardiomiócitos e até mesmo em células de origem não-mesodérmica, como hepatócitos e neurônios. Até o presente momento, os resultados dos estudos iniciais são animadores em relação ao uso de células-tronco mesenquimais e uso eficaz destas no reparo de tecidos retinianos lesados.

**Descritores:** Células-tronco; Regeneração/fisiologia; Retina; Células-tronco mesenquimais

## REFERENCES

- Blatt A, Cotter G, Leitman M, Krakover R, Kaluski E, Milo-Cotter O, et al. Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells after induction of short ischemia is safe and may improve hibernation and ischemia in patients with ischemic cardiomyopathy. *Am Heart J.* 2005; 150(5):986.
- Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE, et al. Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;40(1):195-200.
- Pallini R, Vitiani LR, Bez A, Casalbone P, Facchiano F, Di Giorgi Gerevini V, et al. Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice. *Neurosurgery.* 2005;57(5):1014-25; discussion 1014-25.
- Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, Pinho-Filho JA, Mota A, Almeida AJG, et al. Transplante de células de medula óssea para o miocárdio em paciente com insuficiência cardíaca secundária à doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol.* 2004;82(2):181-7.
- Balsam LB, Robbins RC. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(6):483-92.
- Van Laake LW, Van Hoof D, Mummery CL. Cardiomyocytes derived from stem cells. *Ann Med.* 2005;37(7):499-512.
- National Institutes of Health (NIH). Department of Health and Human Services. Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions. [text on the Internet]. [cited 2004 May 24]. Washington; 17 June 2001. Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/2001report.htm>
- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):92-7.
- 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. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2000;18(5):559. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2000;18(5):559. Comment in: *Nat Biotechnol.* 2000;18(4):381-2.
- D'Costa S, Petite JN. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *Int J Dev Biol.* 1999;43(4):349-56.
- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000;113(Pt 1):5-10.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992;89(7):2804-8.
- Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury.* 2005;36 Suppl 3:S8-S12.
- Bertram H, Mayer H, Schliephake H. Effect of donor characteristics, technique of harvesting and in vitro processing on culturing of human marrow stroma cells for tissue engineered growth of bone. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(5):524-31.
- Ahrens N, Torment A, Paul's M, Rooster man D, Salaam A, Kern V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. *Transplantation.* 2004;78(6):925-9.
- Chou SH, Kao CL, Pang CH, Chen SJ, Tang YW, Ku HH, et al. A novel in vitro retinal differentiation model by co-culturing adult human bone marrow stem cells with retinal pigmented epithelium cells. *Brioche Biophysics Res Commun.* 2005;326(3):578-85.
- Kassel M, Roskilde L, Erikson EF. 1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1993;8(12):1453-8.
- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238(1):265-72.
- Sampaolesi M, Biressi S, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Draghici E, Cusella de Angelis MG, et al. Cell therapy of primary myopathies. *Arch Ital Biol.* 2005;143(3-4):235-42.
- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res.* 2004;95(7):671-6.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004;40(6):1275-84.
- Justesen J, Stenderup K, Eriksen EF, Kassem M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(1):36-44.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418(6893):41-9. Comment in: *Nature.* 2002;418(6893):1. *Nature.* 2002;418(6893):25-7.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000;164(2):247-56.
- De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol.* 2003;160(6):909-18. Comment in: *J Cell Biol.* 2003;160(6):807-9.
- Vaccarino FM, Ganat Y, Zhang Y, Zheng W. Stem cells in neurodevelopment and plasticity. *Neuropsychopharmacology.* 2001;25(6):805-15.
- Young HE, Duplaa C, Katz R, Thompson T, Hawkins KC, Boev AN, et al. Adult-derived stem cells and their potential for use in tissue repair and molecular medicine. *J Cell Mol Med.* 2005;9(3):753-69.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
- Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.* 2002;8(5):739-51.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;32(5):414-25.
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone.* 1992;13(1):69-80.
- Haynes T, Del Rio-Tsonis K. Retina repair, stem cells and beyond. *Curr Neurovasc Res.* 2004;1(3):231-9.
- 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.
- 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.

36. Fischer, AJ. and Reh, TA. Identification of a proliferative marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 2000;220(2):197-210.
37. Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. Lens and retina regeneration: transdifferentiation, stem cells and clinical applications. *Exp Eye Res.* 2004;78(2):161-72.
38. Mitashov VI. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 1996;40(4):833-44.
39. Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation.* 2002;70(8):397-409.
40. Moshiri A, Close J, Reh TA. Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol.* 2004;48(8-9):1003-14.
41. Mayer EJ, Hughes EH, Carter DA, Dick AD. Nestin positive cells in adult human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(9):1154-8.
42. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000;287(5460):2032-6.
43. 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.
44. Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, et al. Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci.* 2001;4(12):1163-4.
45. Zhao X, Das AV, Thoreson WB, James J, Wattnem TE, Rodriguez-Sierra J, et al. Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors. *Dev Biol.* 2002;250(2):317-31.
46. Arsenijevic Y, Taverney N, Kostic C, Tekaya M, Riva F, Zografos L, et al. Non-neural regions of the adult human eye: a potential source of neurons? *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(2):799-807.
47. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000;290(5497):1779-82. Comment in: *Science.* 2000;290(5497):1672-4.
48. 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.
49. 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.
50. Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(2):149-81.
51. 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.
52. 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.
53. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption-rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(7):959-71
54. 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.
55. 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.
56. Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, et al. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114(6):765-74. Comment in: *J Clin Invest.* 2004;114(6):755-7.
57. Kociok N. Can the injection of the patient's own bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa and other diseases of the eye? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005;243(3):187-8.
58. Streilein JW, Ma N, Wenkel H, Ng TF, Zamiri P. Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* 2002;42(4):487-95.
59. Sheedlo HJ, Gaur V, Li LX, Seaton AD, Turner JE. Transplantation to the diseased and damaged retina. *Trends Neurosci.* 1991;14(8):347-50.
60. Jiang LQ, Jorquera M, Streilein JW. Subretinal space and vitreous cavity as immunologically privileged sites for retinal allografts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(12):3347-54.
61. 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.

## XVIII Congresso Brasileiro de Prevenção da Cegueira e Reabilitação Visual

**3 a 6 de Setembro de 2008**

**FLORIANÓPOLIS - SC**

### INFORMAÇÕES:

Attitude Promo Marketing e Eventos  
Tel.: (48) 3035-4388  
e-mail: [contato@attitudepromo.com.br](mailto:contato@attitudepromo.com.br)



# Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats

*Incorporação e diferenciação retiniana de células tronco mesenquimais intravítreas em ratos*

Paula Castanheira<sup>1</sup>  
Leonardo Torquetti<sup>2</sup>  
Marcio Bittar Nehemy<sup>3</sup>  
Alfredo Miranda Goes<sup>4</sup>

Trabalho realizado na Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

<sup>1</sup> MSc Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

<sup>2</sup> MD Department of Ophthalmology, Medicine Faculty, São Geraldo Eye Hospital, UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

<sup>3</sup> PhD Department of Ophthalmology, Medicine Faculty, São Geraldo Eye Hospital, UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

<sup>4</sup> PhD Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, UFMG - Belo Horizonte (MG) - Brazil.

**Correspondence to:** Alfredo M. Goes. Department of Biochemistry and Immunology - Biological Sciences Institute - Universidade Federal de Minas Gerais - Av. Antonio Carlos, 6627 - ICB, Q4 -167 - Belo Horizonte (MG) Zip Code 31270-901

**Disclosure of potential conflicts of interest:** The authors indicate no potential conflicts of interest.

**Financial Support:** This investigation received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil). All experiments were performed according to the Ethical Principles in Animal Experimentation (CETEA/UFMG) and approved under the certificate number 3/2006.

Recebido para publicação em 16.12.2007

Última versão recebida em 20.07.2008

Aprovação em 07.08.2008

**Nota Editorial:** Depois de concluída a análise do artigo sob sigilo editorial e com a anuência do Dr. Haroldo Vieira de Moraes Jr. sobre a divulgação de seu nome como revisor, agradecemos sua participação neste processo.

## ABSTRACT

**Purpose:** To evaluate the pattern of retinal integration and differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) injected into the vitreous cavity of rat eyes with retinal injury. **Methods:** Adult rat retinas were submitted to laser damage followed by transplantation of DAPI-labeled BM-MSCs grafts. To assess the integration and differentiation of BM-MSCs in laser-injured retina, host retinas were evaluated 2.4 and 8 weeks after injury/transplantation. **Results:** Our results demonstrated that the grafted cells survived in the retina for at least 8 weeks and almost all BM-MSCs migrated and incorporated into the neural retina, specifically in the outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL) and ganglion cell layer (GCL) while a subset of grafted cells were found in the subretinal space posttransplantation. At 8 weeks immunohistochemical analysis with several retinal specific markers revealed that the majority of the grafted cells expressed rhodopsin, a rod photoreceptor marker, followed by parvalbumin, a marker for bipolar and amacrine cells. A few subsets of cells were able to express a glial marker, glial fibrillary acidic protein. However, grafted cells failed to express pan-cytokeratin, a retinal pigment epithelium marker. **Conclusions:** These results suggest the potential of BM-MSCs to differentiate into retinal neurons. Taken together, these findings might be clinically relevant for future mesenchymal stem cell therapy studies concerning retinal degeneration repair.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells/physiology; Cell survival/drug effects; Retinal degeneration; Retina/injuries; Injections; Vitreous body; Rats

## INTRODUCTION

There are a number of inherited retinal and retinal-neuronal degenerative diseases that can result in blindness, such as retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma, and related retinal dystrophies. No effective therapies have yet been developed to prevent or reverse the degenerative processes in these disorders. Retinal transplantation has been considered, but effective neural integration and survival of the differentiated cells have not been reported<sup>(1)</sup>.

Over the past few years, the identification and characterization of stem cells has led the potential use of these cells as a promising alternative to cell replacement therapy. The use of stem cells as a therapeutic option might be a practical approach for treating retinal dystrophies and might help to

restore vision by repopulating the damaged retina and/or by rescuing retinal neurons from further degeneration<sup>(2)</sup>.

From a clinical perspective, mesenchymal stem cells (MSCs) have some potential advantages for retinal transplantation compared to retinal stem cells. Retinal stem cells have been extensively used, but the technical difficulties in obtaining these cells and their limited availability must be overcome prior to the application of these stem cells for human treatment<sup>(3)</sup>. One great advantage of MSCs is that these cells can be directly obtained from the patient by a simple procedure, thereby eliminating the complications associated with immune rejection of allogenic tissue and infectious diseases. The fact that these cells are easily obtained and propagated in large amounts in culture with potential plasticity and self-renewal capacity also makes them an attractive candidate therapeutic tool for retinal repair by autologous transplantation<sup>(4)</sup>.

*In vitro* isolation and characterization of MSCs is often based on their adherence, rapid expansion, and expression of specific cell surface antigens, as well as their ability to differentiate into various mesodermal tissues, such as fat, bone, cartilage, and muscle<sup>(5-10)</sup>.

Cultured MSCs can be induced *in vitro* and *in vivo* to differentiate into non-mesenchymal derivatives such as neural cells, a process called stem cell plasticity<sup>(11-13)</sup>.

Bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) differentiate into retinal neural cells *in vivo* and *in vitro*<sup>(14)</sup>, and when implanted at a site of injury in experimental animal models, they demonstrate the ability to migrate to the injury site, initiate tissue repair, and restore function<sup>(15-17)</sup>. Despite the fact that stem cells integrate into damaged retina layers and differentiate into retinal cells, there has been no evidence of restored functionality or long-term graft survival<sup>(18-19)</sup>.

The purpose of the present study was to evaluate the pattern of retinal integration and differentiation of MSCs injected into the vitreous cavity of eyes with retinal injury.

---

## METHODS

---

### *Isolation and Culture of BM-MSCs*

Bone marrow was collected from two 2-month-old isogenic Wistar rats by flushing their femurs and tibias with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco). Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 48 h and nonadherent cells were removed. The cells, fibroblast-like in shape, were grown and expanded in flasks for several weeks, and exhibited typical characteristics of MSCs.

### *Establishment of a laser-injured model*

All experiments were performed according to the Ethics Principles in Animal Experimentation (CETEA/UFGM) and approved (certificate number 3/2006).

Wistar rats (n=18) were anesthetized with solution ketamine (40 mg/mL) and xylazine (60 mg/mL), injected intramuscularly. Mydriasis was induced by anesthesia; no eye-

drops were used for pupillary dilation. The retinal lesion was induced by an Nd-YAG laser, using an average 0.5 mJ energy. A Goldmann three-mirror lens was used to produce approximately 15 to 20 YAG laser shots around the optic disc. The lesions were all full-thickness retina and choroid disruptions, as observed by deep subretinal hemorrhage and sometimes mild vitreous hemorrhage after the spot was produced. Animals in which the laser caused massive vitreous hemorrhage (n=3) were not used in the study.

### *BM-MSC labeling and viability*

After three passages, bone marrow-derived adherent cells were incubated with 50 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 2 h. BM-MSCs were treated with trypsin (Gibco) for 3 min to generate a single-cell suspension, washed three times with DMEM, resuspended in serum-free DMEM, counted, and stored on ice until transplantation. Fluorescence from DAPI labeling of BM-MSCs and cell viability were evaluated at 1, 2, 3, 4, and 8 weeks after cell labeling.

### *Intravitreal transplantation of MSCs*

Rats (10 - 12-week-old Wistar SHR rats; n=18) were anesthetized by intramuscular injection with solution ketamine (40 mg/mL) and xylazine (60 mg/mL). A cell suspension (20 µl) containing approximately 4x10<sup>5</sup> DAPI - labeled BM-MSCs was slowly injected into the vitreous cavity via the pars plana using a 30 gauge needle 24 h after the retinal lesion was induced by the laser in 9 animals (both eyes). Three groups of animals were studied: 1) rats with retinal injury and injection of BM-MSCs (n=9); 2) rats with retinal injury without injection of BM-MSCs (n=9); 3) rats without retinal injury with injection of BM-MSCs (n=9).

### *Tissue sectioning*

The animals were sacrificed 2, 4, and 8 weeks following transplantation. The eyeball was enucleated by performing a 360° limbal peritomy, isolating the extraocular muscles, and dissecting the optic nerve at the apex of the orbit. The eyes were either processed freshly (embedded in OCT compound and freshly sectioned) or fixed in Omnifix (FR Chemical Inc, Mount Vernon, NY). For both processes, slides were stained with hematoxylin/eosin, and visualized under a compound microscope to evaluate retina morphology.

### *Immunohistochemical detection*

All Paraplast-Plus embedded blocks were cut, deparaffinized, rehydrated, and subjected to immunostaining with several antibodies specific for the retinal cells. Following blocking for 1 h at room temperature in phosphate buffered saline (0.15 M PBS), 1% bovine serum albumin, and 2% normal bovine serum, ocular tissue sections were exposed to primary antibodies (Table 1) overnight at 4°C in a moist

chamber. Control sections were treated identically, but the primary antibody was omitted. Sections were then washed three times for 5 min each in 0.15 M PBS. Secondary antibody (goat anti-rabbit and anti-mouse labeled with Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen) was then applied for 1 h at room temperature. Sections were washed three times for 5 min each in 0.15 M PBS. The slides were viewed under a fluorescence microscope (Olympus®, Optical sectioning microscope attached to an Axioplan imaging Apotome® apparatus, Zeiss®, Germany). Colocalization of Alexa 488 - labeled primary antibodies and DAPI was assessed by superimposing separate digital images of each fluorochrome.

## RESULTS

### *BM-MSCs characteristics and transplantation*

After three passages in culture, the isolated cell population became homogeneous, showing a monolayer consisting of adherent cells displaying further traits of MSCs, including a typical fibroblast-like morphology and increased proliferation (Figure 1 Left and Right). Adhesion to the culture dish also served as a criterion to distinguish MSCs from free-floating hematopoietic cells.

### *Incorporation and distribution of the grafted cells*

To verify the fate of BM-MSCs grafted in the laser-injured rat retina, the cells were prelabeled with DAPI and injected into the vitreous space. Retinal damage has an important role in the incorporation of transplanted cells in the retina, due to the high expression of chemoattractants by injured retinal pigment epithelium (RPE). To determine the distribution of BM-MSCs in the retina, we examined the tissue 2, 4, and 8 weeks after the grafting procedure (Figure 2). The transplanted cells were incorporated in a time-dependent manner. Survival of the grafted cells was substantial in all transplanted eyes at all evaluated points. At 2 weeks, the majority of the grafted cells remained in the vitreous space (Figure 2, top, right) and at 4 weeks the cells had migrated and incorporated into the host neural retina (Figure 2, bottom left). At 8 weeks, the grafted cells were almost fully incorporated into the host neural retina; BM-MSCs were present in the outer nuclear layer, inner nuclear layer, and the ganglion cell layer (Figure 2, bottom, right).

### *Immunohistochemical analysis and fluorescence microscopy*

Immunohistochemistry was performed on sections in which BM-MSCs were incorporated in the injured retina at 8 weeks after transplantation and in the control group to examine whether the grafted cells distributed into the retinal layers expressed retinal cell type-specific markers. The cell-type markers used were rhodopsin for rod photoreceptor cells, glial fibrillary acidic protein (GFAP) for Muller cells and astrocytes, parvalbumin for bipolar and amacrine cells, and pancytokeratin for RPE (Table 1).

Most of the DAPI-labeled cells, which we presumed to be the grafted BM-MSCs, incorporated into the outer nuclear layer (ONL) and expressed rhodopsin (Figure 3, top of the right panel), and parvalbumin (Figure 3, top middle of the right panel), suggesting their potential to differentiate into rod photoreceptors and amacrine or bipolar cells, respectively. A small subset of labeled cells in the inner retina was also labeled for the glial marker GFAP (Figure 3, bottom, middle of the right panel), suggesting that these cells possess the ability to differentiate into astrocytes and Muller cells. Some DAPI-labeled cells were also observed in the subretinal space, but they did not express any retina-associated markers at any point (Figure 3, top and middle bottom of the right panel). This finding suggests that these cells might provide a local milieu that somehow evolves with the incorporation and differentiation of the grafted cells. In the control group sections (where the injured retina did not receive BM-MSC transplants), the retina-specific markers were evident and no DAPI-labeled cells were observed, ruling out the possibility of auto-fluorescence of the retinal cells (Figure 3, left panel). There was also no co-localization of DAPI-labeled cells with the RPE-specific marker (Figure 3, bottom, right panel), suggesting that the grafted cells did not differentiate into RPE cells.

## DISCUSSION

There are several sight-threatening retinal disorders for which treatment is not yet available or produces poor results. In some of these diseases, retinal degeneration occurs early in life and might be quite rapid, whereas in other disorders, retinal degeneration begins later and progresses very slowly. There are some possible sources for the repair of retinal dege-

Table 1. Primary antibodies for immunohistochemistry

	Antigen	Clone	Species	Supplier	Dilution
Immunohistochemistry	Rhodopsin	[RET-P1]	Mouse monoclonal	Abcam	1:16
	GFAP (Glial fibrillary acidic protein)		Rabbit	Abcam	1:1000
	Parvalbumin		Rabbit	Abcam	1:1000
	Pan-cytokeratin	[C-11]	Mouse monoclonal	Abcam	1:250

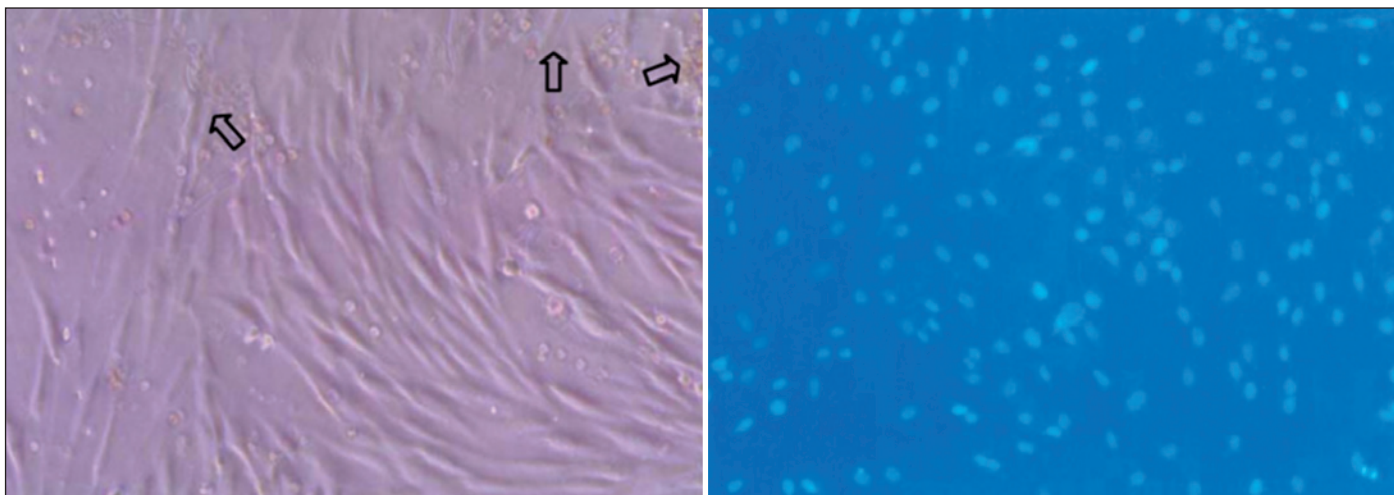


Figure 1 - Morphologic analysis of cultivated and DAPI-labeled rat bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs). (Left) Phase contrast microscopy of rat BM-MSCs in the cell culture dish at passage 3, showing a stretched fibroblastic phenotype. Arrows shows the presence of round-shaped erythrocytes and nonadherent cells. After expansion to the third passage, a monolayer of adherent, fibroblast-like cells were labeled with DAPI. (Right) Fluorescence microscopy of adherent, fibroblast-like cells labeled with DAPI. Original magnification X150.

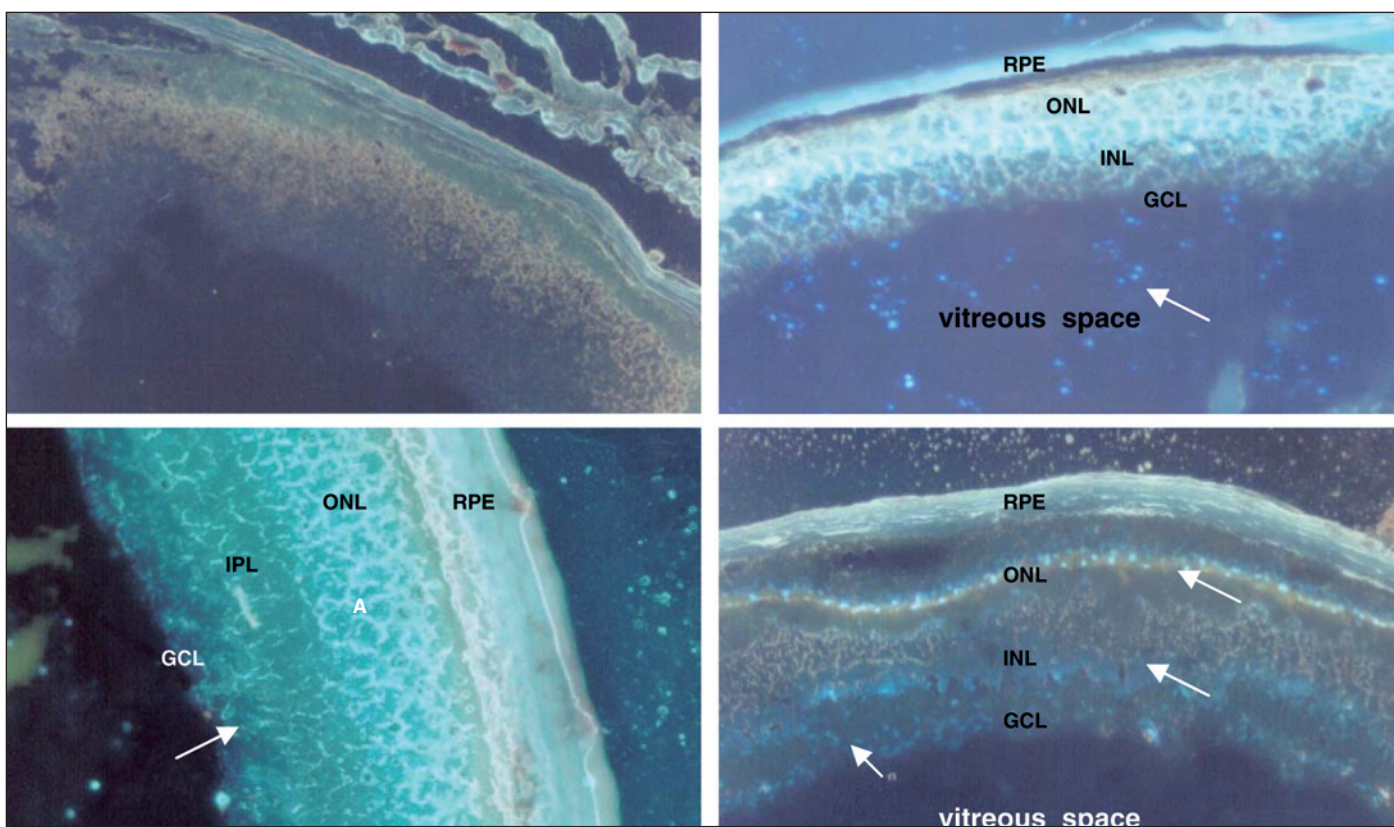
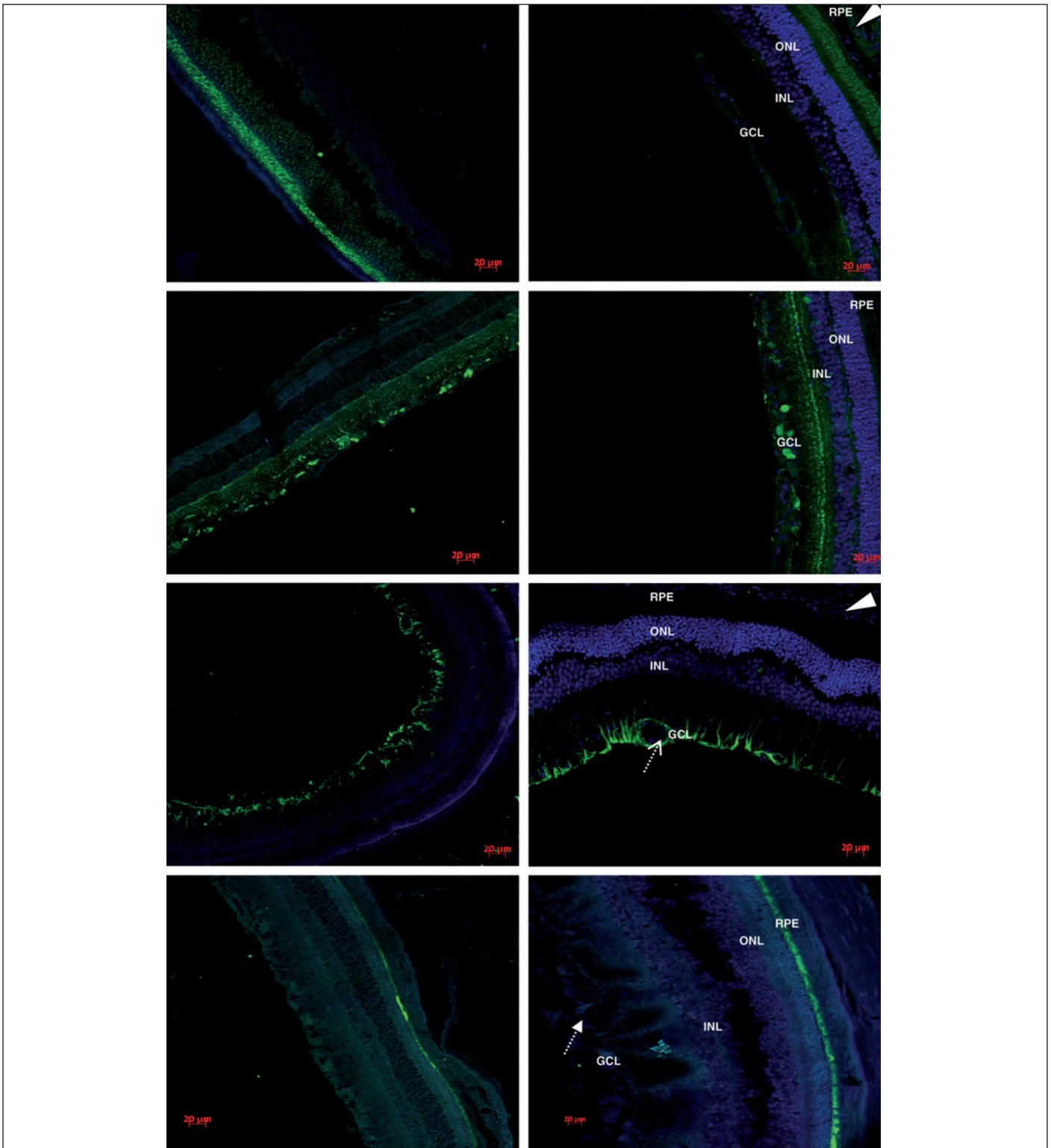


Figure 2 - DAPI-labeled BM-MSCs transplanted into the intravitreal space in rats with laser-induced damage to the retina. Distribution of the grafted cells, (top right) 2 weeks after transplantation, most of the grafted cells were still in the vitreous space, (bottom left) 4 weeks after transplantation, a few grafted cells incorporated into the neural retina, (bottom right) 8 weeks after transplantation, most of the grafted cells were observed in the ONL, INL, and GCL of the neural retina, (top left) control group - injured retina without BM-MSC transplantation. White arrows shows the location of the grafted cells after transplantation. Original magnification X150. RPE= retinal pigment epithelium; ONL= outer nuclear layer; INL= inner nuclear layer; GCL= ganglion cell layer

neration. A current therapeutic approach to neovascular eye diseases involves the application of angiostatic or antiproliferative agents to the eye. A cell-based therapy, however,

should be explored, because, in contrast to inhibiting angiogenesis with small molecules or recombinant factors, a cell-based approach might enable the cell to adapt and respond to



**Figure 3 - Immunohistochemical detection of DAPI-labeled BM-MSCs in injured retinal sections 8 weeks after intravitreal transplantation. The left panel of each row shows immunoreactivity for a particular marker in retinal sections with laser-induced injury without BM-MSC treatment (control). The right panel of each row shows immunoreactivity for a particular marker (green) in retinal sections with laser-induced injury and BM-MSC treatment. Eight weeks after transplantation, the grafted cells labeled with DAPI (blue) co-expressed the rod photoreceptor marker (green) (top) rhodopsin, the bipolar and amacrine cell marker (green) (top middle) parvalbumin and the Muller cell and astrocyte marker (green) (bottom middle) GFAP. No grafted cells coexpressed the RPE marker (green) (bottom) pan-cytokeratin. Note that only a small subset of grafted cells was GFAP-immunoreactive (dashed arrows). Arrowheads in the right panel (top) and (bottom middle) indicate the presence of grafted cells (blue) in the subretinal space. Micrographs of the control group did not show any nonspecific labeling or fluorescence expression. Scale bars, 20  $\mu$ m. RPE= retinal pigment epithelium; ONL= outer nuclear layer; INL= inner nuclear layer; GCL= ganglion cell layer.**

a changing environment. Cell-based therapy likely involves numerous factors produced by the cell that can be appropriately modulated in response to changing conditions<sup>(20)</sup>. It was demonstrated that MSCs are able to secrete neurotrophic factors that promote neural cell survival<sup>(21)</sup>.

The multipotentiality of BM-MSCs as well as their easy isolation and culture properties and their high expansion potential makes these cells an ideal source for autologous transplantation aimed at a cell-based therapy for retinal degeneration repair<sup>(2)</sup>.

Several studies have demonstrated the survival, incorporation, and morphologic integration of transplanted neural stem cells in injured retinas<sup>(22-24)</sup>. Few studies, however, have examined the potential of BM-MSCs to regenerate damaged retinas<sup>(25)</sup> injecting stem cell-enriched bone marrow cells into injured rat eyes and observed that the cells were incorporated into the host retina and that some of the CD45+ cells differentiated into retinal neural cells *in vivo*. MSCs can also be induced to differentiate into photoreceptors *in vitro* and *in vivo*<sup>(14)</sup>.

Also, a recent study compared MSCs and retinal progenitor cells to evaluate their potential as a source for retinal transplantation<sup>(26)</sup>. Both cell types expressed neuronal markers *in vitro* but some MSCs differentiated into cells that resembled microglia rather than neural cells. These findings suggested that retinal progenitor cells are the best choice for retinal transplantation studies, but MSCs remain an attractive candidate as a therapeutic tool for retinal repair in autologous transplantation.

In the present study, we injected BM-MSCs intravitreally into the rat eye 24 h after an Nd-YAG laser injury in the retina and observed that the grafted cells dispersed into the host retina and assumed different patterns of distribution. Specific antibodies were used to determine the ability of grafted MSCs to morphologically differentiate within the environment of transplanted eyes. Co-localization of DAPI with one of the specific phenotypic antibody markers was used to evaluate neural differentiation of the grafted cells. The grafted BM-MSCs incorporated into the host neural retina and expressed GFAP, rhodopsin, and parvalbumin, suggesting neural differentiation.

The presence of a subset of cells in the subretinal space suggests that these cells are accelerating the regeneration process of the retina. The stimulatory effect of BM-MSCs is related to the secretion of various neurotrophic factors that activate compensatory processes in abnormal tissues<sup>(27-29)</sup>. Also, BM-MSCs produce several matrix molecules and have a great potential to repair damage resulting from injury, ischemia, and normal aging<sup>(30)</sup>.

In addition to the used cell type, another issue to be investigated is the preferential method of transplantation of the stem cells close to the retina. There are two methods of transplantation, subretinal and intravitreal, that are widely described in the literature and both seem to be effective. The subretinal implantation of stem cells is a more

demanding and complex procedure. Intravitreal injection is a more popular and a much less invasive procedure. No apparent differences in the efficacy of these cell engrafting procedures are reported in the literature, thus intravitreal injection is the best choice because it is less invasive. The vitreous body anatomy of the rat eye, however, should also be considered. The vitreous cavity in the rat eye is crescent moon-shaped, which brings the injected cells closer to the retinal surface, perhaps allowing easier access of the cells to the retinal layers.

A comparison of the incorporation of cells between the injured and non-injured groups suggested that the extent of the lesion had a role in the engrafting of the cells. The study demonstrated that the cells incorporated and differentiated in the injured group, but not in the non-injured group, as previously reported by some authors. Migration and integration of the transplanted cells into the host tissue is probably induced by its injury. According to Chacko, the widespread migration and incorporation of neural stem cells was observed only in retina that was either diseased<sup>(24)</sup> or traumatized<sup>(23)</sup>. Those injuries could provide a local milieu (interleukins, chemotaxins, inflammatory and growth factors, etc), that is responsible for the migration and incorporation of exogenous ocular stem cells. It was recently reported that damaged RPE secretes cytokines that serve as chemoattractants for BM-MSCs by regulating the homing and migration of these cells to the injury site<sup>(17)</sup>.

The use of DAPI as a cell tracer can become a problem in transplant experiments, due to its considerable diffusion and uptake by host retinal cells. To overcome this problem, there are now some ongoing experiments, in our laboratory, using MSCs labeled with GFP.

These *in vitro* studies are essential to understand the process of stem cell-based therapies and allow for the evaluation of the nature of the factors responsible for the homing of these cells as well as the conditions that promote integration and differentiation of the grafted cells into the host retina. Once these issues are clear, there is a great potential for the use of stem cells in clinical therapy, but further studies are needed to ensure their safe and effective transplantation.

---

## CONCLUSIONS

---

The present study demonstrated that MSCs can incorporate and differentiate into specific cellular components of the retina after laser-induced tissue injury.

---

## ACKNOWLEDGMENTS

---

The authors would like to thank Gregory Thomas Kitten, PhD from the Morphology Department for assistance in the immunohistochemical studies and Marco Antônio Máximo

Prado, PhD from the Pharmacology Department of the Biological Sciences Institute of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil for assistance in data acquisition.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar o padrão de integração e diferenciação retiniana de células tronco mesenquimais (CTM) injetadas na cavidade vítrea de ratos portadores de lesões retinianas. **Métodos:** Ratos Wistar adultos foram submetidos a múltiplas lesões retinianas utilizando-se YAG laser e injeção intravítrea de células tronco mesenquimais. A fim de se avaliar a integração e diferenciação retiniana, o tecido retiniano lesado pelo YAG laser / tratado pelas células tronco, foi avaliado 2, 4 e 8 semanas após a lesão. **Resultados:** As células injetadas na cavidade vítrea sobreviveram na retina por pelo menos 8 semanas e quase todas células tronco mesenquimais migraram e incorporaram-se na retina neural, especificamente nas camadas nucleares externa e interna e camada de células ganglionares. Uma pequena quantidade de células foi encontrada no espaço sub-retiniano. A análise imuno-histoquímica de 8 semanas mostrou que a maioria das células injetadas expressou rodopsina (marcador para fotorreceptores), parvalbumina (marcador para células bipolares e amácrinas), GFAP (marcador de células gliais). As células injetadas não expressaram a pancitoqueratina, que é a marcadora de células do epitélio pigmentar da retina. **Conclusões:** Ocorre aparente diferenciação e incorporação de células tronco mesenquimais na retina de ratos após injeção intravítrea destas células.

**Descritores:** Células-tronco mesenquimais/fisiologia; Sobrevida celular/efeitos de droga; Degeração retiniana; Retina/lesões; Injeções; Corpo vítreo; Ratos

## REFERENCES

1. Limb GA, Daniels JT, Cambrey AD, Secker GA, Shortt AJ, Lawrence JM, et al. Current prospects for adult stem cell-based therapies in ocular repair and regeneration. *Curr Eye Res.* 2006;31(5):381-90.
2. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, et al. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 2007;85(2):234-41.
3. Vemuganti GK. Can we grow new retina? *Community Eye Health J.* 2006;19(57):6-8.
4. 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.
5. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004;(32):414-25.
6. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;(7):211-28.
7. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997;64(2):295-312.
8. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Jt Surg Am.* 1998;80(12):1745-57.
9. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995;18(12):1417-26.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
11. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000;290(5497):1779-82. Comment in: *Science.* 2000;290(5497):1672-4.
12. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res.* 2002;69(6):908-17.
13. Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intra-arterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2001;18(8):813-9.
14. 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.
15. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004;95(1):9-20.
16. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;108(7):863-8.
17. Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, et al. 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.
18. 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.
19. Klassen H, Sakaguchi DS, Young MJ. Stem cells and retinal repair. *Prog Retin Eye Res.* 2004;23(2):149-81. Review.
20. Friedlander M. Fibrosis and diseases of the eye. *J Clin Invest.* 2007;117(3):576-86.
21. Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, et al. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res.* 2005;80(5):611-9.
22. Wojciechowski AB, Englund U, Lundberg C, Warfvinge K. Survival and long distance migration of brain-derived precursor cells transplanted to adult rat retina. *Stem Cells.* 2004;22(1):27-38.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells.* 2006;24(10):2270-8.
27. Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002;59(4):514-23. Comment in: *Neurology.* 2002;59(4):486-7.
28. Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stroma cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurgery.* 2004;55(5):1185-93.
29. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol.* 2006;198(1):54-64.
30. Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005;11(5):321-34.

1                   **ACCEPTED FOR PUBLICATION – CELL TRANSPLANTATION**

2  
3                   **DAPI DIFFUSION AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF MESENCHYMAL STEM**  
4                   **CELLS IN THE INJURED RETINA OF RATS**

5  
6                   **Paula Castanheira MSc<sup>1</sup>, Leonardo Torquetti MD<sup>2</sup>, Débora Rodrigues Soares Magalhães<sup>1</sup>,**  
7                   **Marcio B. Nehemy PhD<sup>2</sup>, Alfredo M. Goes PhD<sup>1</sup>**

8  
9  
10                  **Key words:** mesenchymal stem cells, stem cells-based therapy, retinal damage, retinal  
11                  regeneration, DAPI, Quantum Dot

12  
13  
14                  <sup>1</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Biological Sciences Institute, Federal University  
15                  of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

16                  <sup>2</sup> Department of Ophthalmology, Medicine Faculty, São Geraldo Eye Hospital, Federal  
17                  University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

18  
19                  Adress correspondence to: Alfredo M. Goes, Department of Biochemistry and Immunology,  
20                  Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Ave. Antonio Carlos, 6627  
21                  ICB, Q4 -167 zip code 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Telephone: 55 (31)  
22                  34092632 E-mail: [goes@mono.icb.ufmg.br](mailto:goes@mono.icb.ufmg.br)

23  
24                  **Disclosure of potential conflicts of Interest:** the authors indicate no potential conflicts of  
25                  interest.



26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

**ABSTRACT**

Title: DAPI DIFFUSION AFTER INTRAVITREAL INJECTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE INJURED RETINA OF RATS

**Authors: Paula Castanheira, Leonardo Torquetti, Débora Rodrigues Soares Magalhaes, Márcio Bittar Nehemy, Alfredo Miranda de Goes**

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 retina 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.

**Key words:** mesenchymal stem cells, stem cells-based therapy, retinal regeneration, DAPI labeling, Quantum Dot

54

## 55 INTRODUCTION

---

56

57 To label cells without affecting their morphology or function is a critical issue for  
58 investigating cell behavior, growth, migration and differentiation at a single-cell level. For all  
59 these purposes, researchers are always searching for a stable, nontoxic labeling that also won't  
60 leak, or be transferred from cell to cell either *in vivo*, in tracing experiments or *in vitro*.

61 The blue-fluorescent DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) nucleic acid stain  
62 preferentially binds to double-stranded DNA (31) to form a stable fluorescent complex which  
63 fluoresces approximately 20 times greater than DAPI alone. DAPI exhibits a preference for  
64 repetitive A-T base pairs in the minor groove (6,9). Although the dye is cell impairment, higher  
65 concentrations will enter a live cell. DAPI is a popular nuclear counter stain for use in multicolor  
66 fluorescent techniques, mRNA *in situ* hybridization, and *in vivo* cell tracking experiments.

67 Since stem cells can easily self-replicate and differentiate into lineage-specific cells,  
68 such characteristics provides several and important challenges for cell labeling. To date,  
69 thymidine analogs, such as 5-bromo-2-deoxyuridine, iododeoxyuridine, and tritiated thymidine,  
70 and DAPI have been extensively used to label stem cells prior to transplantation. These dyes  
71 are used in order to allow the fate of the labeled cells into damaged areas to be determined  
72 (5,21,26).

73 Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from bone marrow of adult organisms are  
74 characterized as plastic adherent, fibroblastoid cells, which are able to differentiate into  
75 distinctive end-stage cell cycles such as osteoblasts, chondroblasts and adipocytes. Cultured  
76 MSCs can be induced *in vitro* and *in vivo* to differentiate into non-mesenchymal derivatives such  
77 as neural cells, in a process called stem cell plasticity or transdifferentiation (19,22,32). Several  
78 reports have shown that bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) differentiate into

79 retinal neural cells *in vivo* and *in vitro* (11), and when implanted at a site of injury in experimental  
80 animal models, as they demonstrate the ability to migrate to the injury site, initiate tissue repair,  
81 differentiate into retinal cells and restore function. Some of these studies used DAPI or  
82 thymidine analogs as nuclear markers to follow the migration of BM-MSCs and confirm their  
83 differentiation into retinal neurons after transplantation into injured retina (4,20). However, the  
84 specific mechanism responsible for the MSCs capacity of transdifferentiation *in vivo* remains  
85 unclear and recent reports shows that this “differentiation process” might be due to the fusion of  
86 the transplanted cells with resident cells (8) or even a false positive caused by DAPI up take by  
87 the resident cells when this marker is released from dying transplanted stem cells.

88 In this study we took advantage of DAPI labeled BM- MSCs transplantation model into  
89 the vitreous cavity of eyes with retinal injury to evaluate DAPI diffusion from labeled BM-MSCs  
90 that die in the transplantation process, releasing its chemical marker into the neighbouring  
91 microenviroment and making possible it's up take by host cells, such as retinal neurons. Double  
92 labeled BM-MSCs using DAPI and Quantum Dot, a cytoplasm marker with intense stable  
93 fluorescence that is only delivered into live cells by a custom targeting peptide that cannot be  
94 transferred to adjacent cells, were also used to confirm the fate of the transplanted cells.

## 95 **MATERIALS AND METHODS**

---

### 96 **Isolation and Culture of BM-MSCs**

97 Bone marrow was collected from two 2-month -old isogenic Wistar rats by flushing their femurs and tibias  
98 with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco). Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for  
99 48 h and nonadherent cells were removed. The cells, fibroblast-like in shape, were grown and expanded  
100 in flasks for several weeks, and exhibited typical characteristics of MSCs.

101 **Establishment of a laser-injured model**

102 All experiments were performed according to the Ethical Principles in Animal Experimentation  
103 (CETEA/UFMG) and approved under the certificate number 3/2006.

104 Wistar rats (n=18) were anesthetized with a dilution of ketamine (40 mg/mL) and xylazine (60 mg/mL),  
105 injected intramuscularly. Mydriasis was induced by anesthesia; no eyedrops were used for pupillary  
106 dilation. The retinal lesion was induced by an Nd-YAG laser, using an average of 0.5 mJ energy. A  
107 Goldman three mirror lens was used to produce approximately 15 to 20 YAG laser shots around the optic  
108 disc. The lesions were all full-thickness retina and choroid disruptions, as observed by deep subretinal  
109 hemorrhage and sometimes mild vitreous hemorrhage after the spot was produced. Animals in which the  
110 laser caused massive vitreous hemorrhage (n=3) were not used in the study.

111 **Phenotypic characterization of BM-MSC**

112 The adherent cells were detached with 0.25% trypsin/EDTA, centrifuged for 5 min at 1200×g, and  
113 resuspended in PBS. Aliquots containing  $5 \times 10^5$  cells were incubated with monoclonal primary antibodies  
114 specific for CD45, CD73, CD54 and CD90 (table 1) for 30 min at 4 °C. The cells were washed and  
115 incubated with secondary antibody, IgG anti mouse Alexa 488 conjugated (Invitrogen), for an additional  
116 30 min at 4 °C. Alexa 488-conjugated isotype-identical IgG served as negative controls. Finally, the cells  
117 were fixed in 10% formalin and analyzed using a FACScan. For each sample, 20,000 events were  
118 acquired and analyzed using the CELL QUEST software. Cell surface marker expression was determined  
119 by comparison with isotype control on a histogram plot and data analysis was performed using WinMid  
120 2.8 analysis software.

121 **BM-MSC labeling and viability**

122

123 - DAPI

124 After three passages, bone marrow-derived adherent cells were incubated with 50 µg/mL 4',6-  
125 diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 2h.  
126 BM-MSCs were treated with trypsin (Gibco) for 3 min to generate a single-cell suspension, washed three

127 times with DMEM, resuspended in serum - free DMEM, counted, and stored on ice until transplantation.  
128 Fluorescence from DAPI labeling on BM-MSCs and cell viability were evaluated for 1, 2, 3, 4, and 8 wk  
129 after cell labeling.

130

131 - Quantum Trackers

132 Quantum trackers (Invitrogen, Invitrogen, Carlsbad, CA)) are microcapsules that express  
133 fluorescent nanocrystal called quantum dots (Qdots), that are delivered by a custom targeting peptide into  
134 the cytoplasm of live cells. Once inside the cells these nanocrystal emit a stable and intense fluorescence,  
135 which can be tracked for several cells generations, and do not leak out to be taken up by host cells in the  
136 tissue. Also, Qdots don't interfere with the self-replication process of stem cells. For BM-MSC (already  
137 labeled with DAPI) labeling with Qdot 655 we prepared a 10nM solution containing 1 $\mu$ l of the reagent A  
138 (Qdot crystals) and 1 $\mu$ l of the reagent B (targeting peptide). This solution was kept at room temperature  
139 for 5 minutes, and then DMEM and a suspension of 1x10<sup>6</sup> BM-MSC was added and incubated at 37°C for  
140 60 minutes. The cells were washed three times with DMEM and stored on ice until transplantation.

#### 141 **Intravitreal transplantation of MSCs**

142 Rats (10 - 12 wk -old Wistar SHR rats; n=18) were anesthetized by intramuscular injection with a dilution  
143 of ketamine (40 mg/mL) and xylazine (60 mg/mL). A cell suspension (20  $\mu$ l) containing approximately  
144 4x10<sup>5</sup> DAPI - labeled BM-MSCs or double labeled (DAPI and Qdot) BM-MSCs was slowly injected into  
145 the vitreous cavity via the pars plana using a 30 gauge needle 24 h after the retinal lesion was induced by  
146 the laser in 9 animals (both eyes). Therefore, two groups of animals were studied: 1) Rats with retinal  
147 injury and injection of BM-MSCs (n=9); 2) Rats with retinal injury without injection of BM-MSCs (n=9)

#### 148 **Tissue Sectioning**

149 The animals were sacrificed 8 wk following transplantation. The eyeball was enucleated by performing a  
150 360° limbal peritomy, isolating the extraocular muscles, and dissecting the optic nerve at the apex of the  
151 orbit. The eyes were fixed in Omnifix (FR Chemical Inc, Mount Vernon, NY). The slides were stained with  
152 hematoxylin/eosin, and visualized under a compound microscope to evaluate retina morphology.

153 **Immunohistochemical detection**

154 All Paraplast-Plus embedded blocks were cut, deparaffinized, rehydrated, and subjected to  
155 immunostaining with several antibodies specific for the retinal cells. Following blocking for 1 h at room  
156 temperature in phosphate buffered saline (0.15 M PBS), 1% bovine serum albumin, and 2% normal  
157 bovine serum, ocular tissue sections were exposed to primary antibodies (Table 1) overnight at 4°C in a  
158 moist chamber. Control sections were treated identically, but the primary antibody was omitted. Sections  
159 were then washed three times for 5 min each in 0.15 M PBS. Secondary antibody (goat anti-rabbit and  
160 anti-mouse labeled with Alexa Fluor 488 (1:500, Molecular Probes, Invitrogen) was then applied for 1 h at  
161 room temperature. Sections were washed three times for 5 min each in 0.15 M PBS. The slides were  
162 viewed under a fluorescence microscope (Olympus®, Optical sectioning microscope attached to an  
163 Axioplan imaging Apotome® apparatus, Zeiss®, Germany). Colocalization of Alexa 488 - labeled primary  
164 antibodies and DAPI was assessed by superimposing separate digital images of each fluorochrome.

165 **RESULTS**

---

166

167 **BM-MSCs characteristics and labeling**

168 After three passages in culture, the isolated cell population became homogeneous, showing a  
169 monolayer consisting of adherent cells displaying further traits of MSCs, including a typical  
170 fibroblast-like morphology and increased proliferation (Figs. 1A). Adhesion to the culture dish  
171 also served as a criterion to distinguish MSCs from free-floating hematopoietic cells. Figure 1B  
172 and 1C shows BM-MSCs nuclear labeling with DAPI (blue) and double labeling with DAPI and  
173 Quantum dot (red), respectively.

174 **Phenotypic characterization of BM-MSCs**

175 After the third passage, BM-MSCs were also phenotypically characterized by flow cytometry  
176 using panels of antibodies and were defined as CD90<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD54<sup>+</sup> and CD45<sup>-</sup>. These could

177 be concluded since that from the cell population examined, 96.94% do not express CD45 and  
178 86.77%, 93.99% and 95.10% of cells that expressed CD90, CD73 and CD54, respectively  
179 (figure 2).

### 180 **Incorporation and distribution of the grafted cells**

181 To verify the fate of DAPI labeled BM-MSCs grafted in the laser-injured rat retina, the cells were  
182 injected into the vitreous space and evaluated 8 weeks after the grafting procedure. Retinal  
183 damage has an important role concerning the homing of transplanted cells in the retina, due to  
184 the high expression of chemoattractants by injured retinal pigment epithelium (RPE). Survival of  
185 the grafted cells was substantial in all transplanted eyes at the 8th week. At this point it was also  
186 observed that all cells in the neural retinal layers presented blue nuclei, characterized by DAPI  
187 labeling (figure 3). These findings could lead to the conclusion that the grafted DAPI labeled  
188 BM-MSCs were able to fully integrate the laser injured neural retina in only 8 weeks.

189

### 190 **Immunohistochemical analysis and fluorescence microscopy**

191 Immunohistochemical analysis was then performed on sections in which DAPI labeled BM-  
192 MSCs were presumed incorporated in the injured retina at 8 wk after transplantation and in the  
193 control group to examine whether the grafted cells distributed into the retinal layers expressed  
194 retinal cell type-specific markers. The cell-type markers used were rhodopsin for rod  
195 photoreceptor cells, glial fibrillary acidic protein (GFAP) for Muller cells and astrocytes,  
196 parvalbumin for bipolar and amacrine cells, and pan-cytokeratin for RPE (Table 1).

197 Most of the DAPI-labeled cells in the neural retina, which could be presumed to be the  
198 grafted BM-MSCs, incorporated into the outer nuclear layer (ONL) and expressed rhodopsin  
199 (Fig. 3A right panel), and parvalbumin (Fig. 3B right panel), suggesting their potential to  
200 differentiate into rod photoreceptors and amacrine or bipolar cells, respectively. A small subset  
201 of labeled cells in the inner retina was also labeled for the glial marker GFAP (Fig. 3C right

202 panel), suggesting that these cells could possess the ability to differentiate into astrocytes and  
203 Muller cells. Some DAPI-labeled cells were also observed in the subretinal space, but they did  
204 not express any retina-associated markers at any point (Fig. 3 right panel). In the control group  
205 sections (where the injured retina did not receive DAPI labeled BM-MSc transplants), the retina-  
206 specific markers were evident and no DAPI-labeled cells were observed, ruling out the  
207 possibility of auto-fluorescence of the retinal cells (Fig. 3A,B, C and D left panel). There was  
208 also no co-localization of DAPI-labeled cells with the RPE-specific marker (Fig. 3D right panel),  
209 suggesting that the grafted cells did not reach the RPE layer.

210 The fact that most of DAPI-labeled cells in neural retinal tissue were able to co- express  
211 it's blue fluorescence in the nuclei with retinal markers, such as rhodopsin, parvalbumin and  
212 GFAP could suggest a possible differentiation of the grafted cells into retinal neurons. However,  
213 further experiments are needed to confirm this possibility, since it's not likely that the grafted  
214 cells would re-populate the entire retinal tissue, as the immunohistochemical images shows  
215 most of the cells in the neural retina labeled with DAPI. Also, it doesn't seem possible that all  
216 mesenchymal stem cells grafted would incorporate into neural retina and differentiate into retinal  
217 neurons-very specialized cells- in only 8 weeks.

218 To check the possibility of DAPI leaking or cellular fusion, we double labeled BM-MSCs  
219 with DAPI and Quantum Dot, which due to the need of a targeting peptide cannot be transferred  
220 to host cells *in vivo*, and transplanted these cells into the vitreous space of injured retinas in the  
221 same condition as the DAPI labeled cells only. Eight weeks after the grafting procedure,  
222 fluorescence images showed that most of the double labeled BM-MSCs were still into the  
223 vitreous cavity, migrating towards the injury site, while the adjacent retinal cells in all layers  
224 presented a blue fluorescent label very similar to DAPI, but did not present any red labeling in  
225 their cytoplasm, characteristic from Qdot marker. (Fig 4A, B) These experiments suggest that a  
226 large diffusion of DAPI occurred probably during the grafting procedure, when some of the  
227 labeled BM-MSCs die and release its chemical marker. After this procedure, we could also rule



228 out the possibility of cell fusion between the grafted cells and retinal host cells, since all retinal  
229 cells presented only the blue DAPI labeling and no trace of Qdot fluorescence.

## 230 **DISCUSSION**

---

231  
232 Mesenchymal stem cells (MSCs) represent a stem cell population present in adult  
233 tissues that can be isolated, expanded in culture, and characterized *in vitro* and *in vivo*. Several  
234 researches continues to support the desirable traits of MSCs for development of cellular  
235 therapeutics for many tissues as they can be used for a broad spectrum of indications including  
236 cardiovascular repair, treatment of lung fibrosis and spinal cord injury (15). However,  
237 transplantation of BM-MSCs has generated unexpected phenotypes *in vivo*, including muscle  
238 cells (3), liver cells (16,25,30), brain cells (2,22) and others (14). This fact can be partially  
239 explained by several hypotheses.

240 One of them is the property exert by MSCs of transdifferentiation or plasticity, however,  
241 the phenomenon of fusion between transplanted and host cells has been proposed as an  
242 explanation for the apparent plasticity of stem cells. Terada *et al* 2002, (29) demonstrated that  
243 mouse BM-MSCs can fuse spontaneously with other cells and subsequently adopt the  
244 phenotype of the recipient cells. This data should be considered as an explanation for the  
245 differentiation of grafted BM-MSCs into unexpected cell types *in vivo*, reported by several  
246 studies. The fact that in various studies MSCs shows a strong propensity to ameliorate tissue  
247 damage in response to injuries or diseases can also be explained by the fusion of these cell  
248 with host adjacent cell, since 'fused cells' can become a dominant population as they have a  
249 growth or survival advantage over their host cells by supplementing deficient genes. It is also  
250 assumed that the transplanted cells improve the functionally deficient cells as they act as a local  
251 cell delivery system for diffusible trophic factors.

252 Another aspect to be considered for the generation of unexpected phenotypes when  
253 BM-MSCs are transplanted into injured tissues, could be the widely use of DAPI, organic dyes,  
254 BrdU or other thymidine analogs as a unique marker of MSCs. These markers are often used  
255 solely as an approach to track the transplanted stem cells *in vivo*, distinguish the host cells from  
256 labeled cells and assess their potential to integrate and differentiate in the developing or injured  
257 tissues. This is the case of a large amount of studies in which stem cells were transplanted into  
258 neural tissues and it's differentiation into neural lineage cells were evidenced by the presence  
259 of these markers. These observations could suggest that MSCs may possess significantly  
260 greater plasticity than was previously realized, with the potential to differentiate into tissues from  
261 unrelated embryonic germ layers (11,12,13,18,24,34). This is a common procedure not only for  
262 ectodermic lineages differentiation process, several studies also take advantage of DAPI  
263 labeling to trace stem cell *in vivo* or to verify differentiation into mesoderm or endoderm lineages  
264 (7,17,23,28,35).

265 However, according to recent studies some fluorescent dyes seems to leak from the  
266 cells and 'contaminates' surrounding cells. To test DAPI leakage or transfer from cell to cell we  
267 used a strategy of stem cell therapy in injured retina. Several studies suggest that the retina is  
268 accessible to regenerative medicine strategies, including tissue repair using cell replacement.  
269 Specialized literature shows, in animal models, that visual function can be preserved or possibly  
270 improved after transplantation mesenchymal stem cells to injured or diseased retina. Regarding  
271 this possibility we injected BM-MSCs intravitreally into the rat eye 24 h after an Nd-YAG laser  
272 injury in the retina and observed that, eight weeks after the procedure, the grafted cells  
273 dispersed into the host retina and assumed different patterns of distribution. Prior to  
274 transplantation cells were labeled with DAPI or double labeled with DAPI and Quantum dots.  
275 Specific antibodies were used to determine the ability of grafted MSCs to morphologically  
276 differentiate within the environment of transplanted eyes. Co-localization of DAPI with one of the  
277 specific phenotypic antibody markers was used to evaluate neural differentiation of the grafted

278 cells.

279           Immunohistochemical analysis with several retinal specific markers, revealed that the  
280 majority of the cells that presented DAPI labeling, were also able to express rhodopsin, a rod  
281 photoreceptor marker, parvalbumin, a marker for bipolar and amacrine cells and GFAP a glial  
282 marker. It was also observed that most of the resident cells in retinal tissue present a  
283 fluorescent blue nucleus, which could suggest that all grafted cells not only re-populated the  
284 entire neural retina but also differentiated into highly specialized neural cells in only 8 weeks.

285           According to Kicic *et al* 2003 (10), BM-MSCs are able to differentiate into photoreceptors  
286 *in vitro* and *in vivo*. Under specific culture conditions, BM-MSCs differentiated into  
287 photoreceptors in 8 to 10 days *in vitro*. However, the differentiation of BM-MSCs into  
288 photoreceptor *in vivo*, after transplantation into dystrophic rat retina, was observed in 12 weeks.  
289 With this, it's doubtful that most of the grafted cell differentiated into photoreceptors, and were  
290 able to produce rhodopsin in 8 weeks. It's also questionable that the grafted cells could re-  
291 populate the entire neural retina. It is known that most of the cells die during the grafting  
292 procedure, so it's not likely that the subset of grafted cells that survived would re-populate most  
293 of neural retinal tissue in 8 weeks.

294           To test these hypotheses we double labeled BM-MSCs with DAPI and Quantum dot, a  
295 nano crystal that labels the cytoplasm, with a red fluorescence that cannot be transferred to host  
296 cells *in vivo*, due to the need of a targeting peptide. Eight weeks after the grafting procedure,  
297 fluorescent images showed that most of the resident cells in neural retina exhibited a blue  
298 fluorescence corresponding to DAPI in the nucleus but did not show any red fluorescence  
299 characteristic by Qdot labeling. Also, most of the double labeled cells were found in vitreous  
300 cavity initiating a process of homing and migration towards the injury site, characterized by  
301 unorganized retinal layers. These results suggest that DAPI diffusion is responsible for the  
302 fluorescence exhibited by the host cells in neural retinal and any kind of stem cell differentiation  
303 can be proved by the use of this marker only.

304 To date although DAPI have been extensively used to track transplanted cells, false  
305 labeling of host cells is an issue when it comes to the use of this marker. Several dyes such as  
306 thymidine analogs and organic dyes also appears to have limitations. Recent studies, are  
307 taking advantage of genetically encoded fluorescent proteins, such as GFP (*green fluorescent*  
308 *protein*) to track stem cells *in vivo* (33). Also, several reports are using various MR (magnetic  
309 resonance) contrast agents, such as ferumoxides (Feridex®) –protamine sulfate complexes to  
310 label stem cells for monitoring their temporal and spatial migration *in vivo* by magnetic  
311 resonance imaging (MRI) (1,11,27). Those approaches have proved to be very effective so far,  
312 but still a reliable and long-term additional marker is necessary to validate any cell based  
313 therapy when it comes to migration or differentiation properties.

314

#### **(4) Acknowledgments**

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

---

Financial Support: This investigation received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil).

All experiments were performed according to the Ethical Principles in Animal Experimentation (CETEA/UFMG) and approved under the certificate number 3/2006.

The authors would like to thank Gregory Thomas Kitten, PhD from the Morphology Department for assisting in the immunohistochemical studies and Marco Antônio Máximo Prado, PhD from the Pharmacology Department of the Biological Sciences Institute of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil for assisting with data acquisition.

---

## (5) References

### REFERENCES

---

1- Arbab, A. S.; Yocum, G. T.; Kalish, H.; Jordan, E. K.; Anderson, S. A.; Khakoo, A. Y.; Read, E. J.; Frank, J. A. Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* 104:1217-1223; 2004.

2- Brazelton, T. R.; Rossi, F. M. V.; Keshet, G. I.; Blau, H. M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779; 2000.

3- Ferrari, G.; Cusella-De Angelis, G.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530; 1998.

4- Flax, J. D.; Aurora, S.; Yang, C.; Simonin, C.; Wills, A. M.; Billingham, L. L.; Jendoubi, M.; Sidman, R. L.; Wolfe, J. H.; Kim, S. U.; Snyder, E. Y. Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* 16:1033-1039; 1998.

5- Gage, F. H.; Coates, P. W.; Palmer, T. D.; Kuhn, H. G.; Fisher, L. J.; Suhonen, J. O.; Peterson, D. A.; Suhr, S. T.; Ray, J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:11879 - 11883; 1995.

6- Hajduk, S. L. Demonstration of kinetoplast DNA in dyskinetoplastic strains of *Trypanosoma equiperdum*. *Science* 191:858-859; 1976.

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

8- Kallis, Y. N.; Alison, M. R.; Forbes, S. J. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut* 56:716-724; 2007.

9- Kania, J.; Fanning, T. G. Use of a sequence-specific DNA-binding ligand to probe the environments of EcoRI restriction endonuclease cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* 67:367-371; 1976.

10- Kicic, A.; Shen, W. Y.; Wilson, A. S.; Constable, I. J.; Robertson, T.; Rakoczy, P. E. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J. Neurosci.* 23:7742-7749; 2003.

11- Kim, D.; Chun, B. G.; Kim, Y. K.; Lee, Y. H.; Park, C. S.; Jeon, I.; Cheong, C.; Hwang, T. S.; Chung, H.; Gwag, B. J.; Hong, K. S.; Song, J. In vivo tracking of human mesenchymal stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant.* 16:1007-1012; 2007.

12- Klassen, H.; Kiilgaard, J. F.; Zahir, T.; Ziaeiian, B.; Kirov, I.; Scherfig, E.; Warfvinge, K.; Young, M. J. Progenitor cells from the porcine neural retina express photoreceptor markers after transplantation to the subretinal space of allorecipients. *Stem Cells* 25:1222-1230; 2007.

13- Kopen, G. C.; Prockop, D. J.; Phinney, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:10711-10716; 1999.

14- Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R.; Neutzel, S.; Sharkis, S. J. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377; 2001.

15- Laflamme, M. A.; Murry, C. E. Regenerating the heart. *Nat. Biotechnol.* 23:845-856; 2005.

16- Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I. L.; Grompe, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* 6:1229-1234; 2000.

17- Li, H.; Fu, X.; Zhang, L.; Sun, T.; Wang, J. In vivo dedifferentiation of human epidermal cells. *Cell Biol. Int.* 31:1436-1441; 2007.



18- Li, Y.; Chen, J.; Chopp, M. Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant.* 10:31-40; 2001.

19- Lu, D.; Li, Y.; Wang, L.; Chen, J.; Mahmood, A.; Chopp, M. Intra-arterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 18:813-819; 2001.

20- Lundberg, C.; Martinez-Serrano, A.; Cattaneo, E.; McKay, R. D.; Björklund, A. Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp. Neurol.* 145:342-360; 1997.

21- McConnell, S. K. Migration and differentiation of cerebral cortical neurons after transplantation into the brains of ferrets. *Science* 229:1268-1271; 1985.

22- Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G.; Maki, R. A.; McKecher, S. R. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290:1779-1782; 2000.

23- Müller-Ehmsen, J.; Krausgrill, B.; Burst, V.; Schenk, K.; Neisen, U. C.; Fries, J. W.; Fleischmann, B. K.; Hescheler, J.; Schwinger, R. H. 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.* 41:876-884; 2006.

24- Munoz-Elias, G.; Marcus, A. J.; Coyne, T. M.; Woodbury, D.; Black, I. B. Adult bone marrow stromal cells in the embryonic brain: Engraftment, migration, differentiation, and long-term survival. *J. Neurosci.* 24:4585-4595; 2004.

25- Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N.; Boggs, S. S.; Greenberger, J. S.; Goff, J. P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284:1168-1170; 1999.

26- Shihabuddin, L. S.; Horner, P. J.; Ray, J.; Gage, F. H. Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 20:8727-8735; 2000.

27- Sun, J. H.; Teng, G. J.; Ju, S. H.; Ma, Z. L.; Mai, X. L.; Ma, M. MR tracking of magnetically labeled mesenchymal stem cells in rat kidneys with acute renal failure. *Cell Transplant.* 17:279-290; 2008.

28- 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.

29- Terada, N.; Hamazaki, T.; Oka, M.; Hoki, M.; Mastalerz, D. M.; Nakano, Y.; Meyer, E. M.; Morel, L.; Petersen, B. E.; Scott, E. W. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545; 2002.

30- Theise, N. D.; Nimmakayalu, M.; Gardner, R.; Illei, P. B.; Morgan, G.; Teperman, L.; Henegariu, O.; Krause, D. S. Liver from bone marrow in human. *Hepatology* 32:11-16; 2000.

31- Williamson, D. H.; Fennell, D. J. Apparent dispersive replication of yeast mitochondrial DNA as revealed by density labelling experiments. *Mol. Gen. Genet.* 131:193-207; 1974.

32- Woodbury, D.; Reynolds, K.; Black, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 69:908-917; 2002.

33- Wu, J.; Sun, Z.; Sun, H. S.; Wu, J.; Weisel, R. D.; Keating, A.; Li, Z. H.; Feng, Z. P.; Li, R. K. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant.* 16:993-1005; 2007.

34- 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.* 47:241-250; 2004.

35- Zhao, F.; Zhang, Y. F.; Liu, Y. G.; Zhou, J. J.; Li, Z. K.; Wu, C. G.; Qi, H. W. Therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraftment on bleomycin-induced lung injury in rats. *Transplant. Proc.* 40:1700-1705; 2008.

## **(6) Figure Legends**

### **Figure 1- Morphologic analysis of cultivated and DAPI- labeled and double labeled (DAPI and QDot) rat bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs).**

Fig 1A shows phase contrast microscopy of rat BM-MSCs in the cell culture dish at passage 3, showing a stretched fibroblastic phenotype. Arrows shows the presence of round-shaped erythrocytes and nonadherent cells. After expansion to the third passage, a monolayer of adherent, fibroblast-like cells were labeled with DAPI. Fluorescence microscopy of adherent, fibroblast-like cells labeled with DAPI (Fig. 1B) or double labeled with DAPI (nucleous) and Qdot (cytoplasm) (Fig. 1C) Original Magnification  $\times 150$ , Scale bars, 70  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2- Phenotypical characterization of BM-MSCs.** The panel of histograms shows the expression profile of BM-MSC surface markers CD45 (Fig. 2B), CD90 (Fig. 2C), CD73 (Fig. 2D) and CD54 (Fig. 2E). Figure 2A shows the characteristic of the cell population evaluated, defined at the size *versus* granularity graph.

**Figure 3- Immunohistochemical detection of DAPI-labeled BM-MSCs in injured retinal sections 8 weeks after intravitreal transplantation.** The left panel of each row shows immunoreactivity for a particular marker in retinal sections with laser-induced injury without BM-MSC treatment (control). The right panel of each row shows immunoreactivity for a particular marker (green) in retinal sections with laser-induced injury and BM-MSC treatment. Eight weeks after transplantation, the grafted cells labeled with DAPI (blue) co-expressed the rod photoreceptor marker (green) (Fig. 3A- right panel) rhodopsin, the bipolar and amacrine cell marker (green) (Fig. 3B- right panel) parvalbumin and the Muller cell and astrocyte marker (green) (Fig. 3C- right panel) GFAP. No grafted cells co-expressed the RPE marker (green)

(Fig. 3D- right panel) pan-cytokeratin. Note that only a small subset of grafted cells was GFAP-immunoreactive (dashed arrows). Arrowheads in the right panel of (Fig.3A and 3C) indicate the presence of grafted cells (blue) in the subretinal space. Micrographs of the control group did not show any nonspecific labeling or fluorescence expression. Scale bars, 20  $\mu$ m. Abbreviations: RPE, retinal pigment epithelium; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

**Figure 4 – Migration of BM-MSc Qdot and DAPI-labeled BM-MSCs eight weeks after transplantation.** It can be noted a tissue disorganization (Fig. 4B – Hematoxylin-eosin) caused by the induced lesion (arrows). Some cells are migrating to the lesion (asterisks). The cells are doubled labeled (QDot - red and DAPI - blue), confirming its origin (the transplanted cells) (Fig. 4A). Most of host cells are shown in blue but not in red – because of transference of DAPI from died transplanted cells to host cells. Original Magnification  $\times$ 100, Scale bars 40  $\mu$ m.

**(7) Tables**

**Table 1- Primary antibodies for immunohistochemistry (IHC) and flow cytometry (FC)**

	<b>Antigen</b>	<b>Clone</b>	<b>Assay</b>	<b>Species</b>	<b>Supplier</b>	<b>Dilution</b>
<b>Immunohistochemistry and Flow Cytometry</b>	Rhodopsin	[RET-P1]	IHC	Mouse monoclonal	Abcam	1:16
	GFAP (Glial fibrillary acidic protein)		IHC	Rabbit	Abcam	1:1000
	Parvalbumin		IHC	Rabbit	Abcam	1:1000
	Pan-Cytokeratin	[C-11]	IHC	Mouse monoclonal	Abcam	1:250
	CD45	69	FC	Mouse Monoclonal	BD Biosciences	1:25
	CD54	1A29	FC	Mouse Monoclonal	BD Biosciences	1:50
	CD73	5F/B9	FC	Mouse Monoclonal	BD Biosciences	1:50
	CD90	OX-7	FC	Mouse Monoclonal	BD Biosciences	1:50

**(8) Figures**

**Attached**