

Marcelo Ribeiro dos Santos

**Neoplasia causada por injeção de células
mononucleares de medula óssea jovens
em camundongos idosos.**

Campinas

2010

**Neoplasia causada por injeção de células
mononucleares de medula óssea jovens
em camundongos idosos.**

Marcelo Ribeiro dos Santos

**Neoplasia causada por injeção de células
mononucleares de medula óssea jovens
em camundongos idosos.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Fisiopatologia Médica, área de
concentração em Neurociências,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Li Li Min

Campinas

Unicamp

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Santos, Marcelo Ribeiro dos	
Sa59n	Neoplasia causada por injeção de células mononucleares de medula óssea jovens em camundongos idosos / Marcelo Ribeiro dos Santos. Campinas, SP : [s.n.], 2010.
Orientador :Li Li Min	
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.	
1. Envelhecimento. 2. Células-tronco. 3. Camundongos. 4. Câncer. I. Li, Li Min. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.	

Título em inglês : Neoplasia caused by injection of young bone marrow mononuclear cells in aged mice

Keywords: • Aging
• Stem-cell
• Mouse
• Cancer

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Neurociências

Banca examinadora:

Profº. Drº. Li Li Min

Profª. Drª. Angela Cristina Malheiros Luzo

Profª. Drª. Maria Aparecida Barone Teixeira

Data da defesa: 28-06-2010

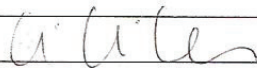
Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Marcelo Ribeiro dos Santos

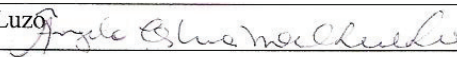
Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Li Li Min

Membros:

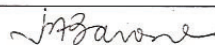
Professor(a) Doutor(a) Li Li Min



Professor(a) Doutor(a) Angela Cristina Malheiros Luzo



Professor(a) Doutor(a) Maria Aparecida Barone Teixeira



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/06/2010

Agradecimentos

Agradeço à coordenação do curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica e a meu orientador Prof. Dr. Li Li Min pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o apoio durante sua execução. Agradeço à CAPES/CNPQ pelo apoio financeiro.

Agradeço ao meu falecido avô, Prof. Dr. Silvio dos Santos Carvalho pelo exemplo de vida e competência profissional.

Agradeço a meu pai pelo incentivo e discussão no início do projeto e pela formação que me proporcionou, levando-me para trabalhar em seu laboratório quando eu tinha apenas dez anos de idade.

Agradeço a minha mãe por sua honestidade e firmeza, que me permitiram sempre discernir o caminho correto e ético em todas as situações.

Agradeço a meus irmãos por seu exemplo de dedicação e persistência em seus sonhos.

Agradeço a meus filhos por seu interesse em meu trabalho e por serem meus parceiros e amigos inseparáveis.

Agradeço à Tânia e Georgia pelo carinho, apoio, paciência e interlocução durante meus devaneios científicos.

Agradeço a meu grande amigo Prof. Dr. Marcus Alexandre Finzi Corat. Sem sua habilidade e competência como cientista este trabalho simplesmente não teria sido possível.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Augusto Correa Passos por proporcionar a estrutura física para manutenção dos animais experimentais e à toda equipe do CEMIB/Unicamp pela ajuda na manutenção destes.

Agradeço ao Prof. Dr. José Vassallo por sua maestria na análise histopatológica e à toda a equipe do Hemocentro/Unicamp pela prestatividade e colaboração.

Muito Obrigado!

Resumo

As injeções de células tronco de medula óssea, autólogas ou heterólogas, estão na vanguarda das terapias celulares bem sucedidas, apresentando resultados interessantes na cura de diversas patologias, incluindo aquelas usualmente associadas com o envelhecimento. Entretanto, nunca foram testadas injeções de células-tronco em modelos de envelhecimento natural, o que constitui uma séria lacuna de conhecimento que precisa ser preenchida. Neste trabalho caracterizamos e injetamos células mononucleares de medula óssea de camundongos transgênicos c57Bl/6 EGFP jovens em camundongos c57Bl/6 em meia-idade e velhice extrema. As células injetadas foram caracterizadas como diplóides e normais em citometria de fluxo de ciclo celular apresentando, no entanto, instabilidade genética quando submetidas ao cultivo para análise citogenética, com formação de células poliplóides anormais, indicando um possível fenótipo “mutator”. Foi feito o acompanhamento do estado geral e desempenho reprodutivo dos animais após as injeções, visualizando-se o comportamento das células-mononucleares injetadas através de análise histológica e citogenética após a morte natural ou sacrifício dos animais. Todos os animais injetados apresentaram a formação de neoplasia EGFP+ hemolinfóide indiferenciada de alto grau histológico ao atingirem a idade média de mortalidade para a linhagem c57Bl/6. Em um experimento paralelo de injeções heterólogas de células mononucleares de medula óssea em cães SRD (sem raça definida) com seqüelas neurológicas causadas por cinomose, houve remissão dos sintomas na maior parte dos indivíduos injetados e não houve formação de neoplasia após 8 meses de acompanhamento. Estes resultados enfatizam a correlação entre células-tronco, tumorigênese e envelhecimento, demonstrando que células jovens portadoras de instabilidade genética intrínseca podem permanecer normais e quiescentes em organismos jovens, desencadeando a formação de neoplasia quando submetidas ao ambiente celular de organismos velhos.

Abstract

Bone marrow mononuclear cell transplantation has been successfully used in the treatment of several pathologies. However, stem cell injections have not been examined in models of natural aging. In this study we derived bone marrow mononuclear cells from young c57Bl/6 EGFP mice and investigated the effects of transplantation into aged mice. EGFP transgenic mice have been an important tool in the study of stem cell behavior both *in vivo* and *in vitro* models. The bone marrow mononuclear fraction has been intensively used in animal experiments and human clinical trials and EGFP transgenic mice cells are the basis for many experiments involving bone marrow mononuclear cell transplantation. However, the EGFP mice mononuclear fraction has never been characterized concerning cellular content, stages in cell division and cytogenetic stability. We performed the cytometric characterization of EGFP transgenic mice bone marrow mononuclear cells, profiling cell proportions in stages of differentiation and cell division, as well as ploidy. We also make the cytogenetic control of these cells to determine chromosomal stability under cultivation. Aged c57Bl/6 mice were transplanted with young c57Bl/6 EGFP mice mononuclear cells. The general health and reproductive performance before and after transplantation was recorded, and histopathological analysis was performed after the death of the animals. All injected mice developed an hemolymphoid neoplasia of high histological degree originating from the transplanted cells upon reaching average death age for c57Bl/6. Neoplastic cells were found in the liver, spleen and lymph nodes, leading to death in a few weeks. Cytogenetic analysis showed abnormal karyotypes in cultured tumor cell lines obtained from these mice. The injected EGFP mononuclear cells have a normal cytometric profile, including normal ploidy, but upon cultivation for cytogenetic analysis loose stability, presenting polyploidy in many of the analyzed cells. These results suggest a mechanism of genetic instability innate to these cells. In a parallel experiment of heterologous bone marrow mononuclear cell injections in mixed breed dogs with neurologic canine distemper sequels, there was remission of symptoms in most patients and no neoplasia outcomes after an 8 months follow up. Our results highlight the relationship between stem cells, aging and tumorigenesis and suggest the need for careful investigation of the adverse effects of stem cell therapies due to their neoplastic potential.

Sumário

<u>Agradecimentos</u>	6
<u>Resumo</u>	7
<u>Abstract</u>	8
1 - <u>Introdução e Revisão Bibliográfica</u>	13
1.1 - Hipótese Inicial	15
2 - <u>Materiais e Métodos</u>	16
2.1 - Caracterização da Fração Mononuclear de Medula Óssea de camundongos e57Bl/6 EGFP	16
2.1.1 - Animais experimentais.....	16
2.1.2 - Extração e purificação da fração mononuclear de medula óssea.....	16
2.1.3 - Citogenética.....	16
2.1.4 - Citometria de fluxo.....	17
2.1.5 - Citometria de ciclo celular.....	17
2.2 - Injeção de células mononucleares em camundongos idosos	17
2.2.1 - Animais experimentais e controles.....	17
2.2.2 - Transplante de Células-Tronco.....	18
2.2.3 - Determinação de Desempenho Reprodutivo e Estado Geral	19
2.2.4 - Histopatologia.....	19
2.2.5 - Cultura de Células e Análise Citogenética.....	19
2.3 - Injeções de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães	20
2.3.1 - Animais experimentais.....	20
2.3.2 - Extração e purificação das células mononucleares.....	21

2.3.3 - Injeção das células mononucleares.....	21
2.4 - Tratamento Estatístico.....	21
2.4.1 - Tabulação dos dados do experimento com camundongos.....	21
2.5 - Laboratórios e Infra-Estrutura para Desenvolvimento do Projeto.....	21
3 - <u>Resultados</u>.....	22
3.1 - Caracterização da Fração Mononuclear de Medula Óssea de camundongos c57Bl/6 EGFP.....	22
3.1.1 - Citogenética.....	22
3.1.2 - Citometria de fluxo.....	23
3.1.3 - Citometria de ciclo celular.....	25
3.2 - Injeção de células mononucleares em camundongos idosos.....	25
3.2.1 - Análise do desempenho reprodutivo.....	25
3.2.2 - Análise de sobrevivência.....	26
3.2.3 - Transformação neoplásica das células mononucleares injetadas em camundongos idosos.....	27
3.3 - Injeção de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães.....	38
4 - <u>Discussão</u>.....	40
5 - <u>Conclusões</u>.....	43
<u>Bibliografia</u>.....	45

Lista de Abreviaturas, Figuras, Tabelas e Gráficos

Abreviaturas

c57Bl/6 – Linhagem de camundongo isogênico negro (Jackson Farms / EUA).

c57Bl6/Uni – Linhagem c57Bl/6 mantida no CEMIB/UNICAMP.

c57Bl6/EGFP – Linhagem isogênica c57Bl/6 com transgene expressando EGFP.

BalbC/Uni – Linhagem de camundongo isogênico branco mantida no CEMIB/UNICAMP.

GFP - proteína verde fluorescente derivada da água viva *Aequorea Victoria*.

EGFP – Enhanced Green Fluorescent Protein; GFP com fluorescência aumentada através de manipulação molecular.

SPF – Specific Pathogen Free; animal livre de organismos patogênicos.

Figuras

Fig.1 – Célula EGFP jovem poliplóide após 14 dias de cultivo.....	23
Fig.2 : baço com infiltração neoplásica.....	28
Fig.3: baço controle.....	29
Fig.4: fígado com infiltração neoplásica.....	30
Fig.5: fígado controle.....	31
Fig.6: linfonodo peri-renal neoplásico.....	32
Fig.7: linfonodo Peri-traqueal neoplásico.....	33
Fig.8: Metaplasia mielóide (controle).....	34
Fig.9: Metaplasia mielóide (injetado).....	35
Fig.10 – corte de fígado com células EGFP+ tumorais (verde), hepatócitos normais CK18+(vermelho), núcleos evidenciados em azul (DAPI).....	36

Fig.11 – células EGFP+ (verde) de linhagem tumoral extraída de fragmento do fígado de animal injetado. Núcleos evidenciados em azul (DAPI).....	37
Fig.12 e 13: Poliploidia, cromossomos circulares e quebras cromossômicas em células de linhagem tumoral EGFP+.....	38
Fig.14: Animal com seqüela recente de cinomose canina, apresentando paraplegia e incoodenação de membros pélvicos, com visível atrofia muscular.....	39
Fig.15: Animal mostrado na figura 12, duas semanas após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, no entanto, o animal apresentava ainda déficit proprioceptivo.....	39
Fig.16: Animal mostrado na figura 18, 42 dias após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, com recuperação completa da musculatura. O animal recuperou completamente a capacidade proprioceptiva.....	40

Tabelas

Tabela 1: Análise de metáfases de células mononucleares de medula óssea EGFP jovens.....	22
Tabela 2: Idades dos animais injetados no dia da injeção e no dia da morte.....	27

Gráficos

Gráfico 1 - Proporção de células CD 44.....	23
Gráfico 2 - Proporção de células CD 45.....	24
Gráfico 3 - Proporção de células SCA-1.....	24
Gráfico 4 - Proporção de células CD 14.....	25
Gráfico 5 - Ploidia e fases de divisão das células jovens EGFP mononucleares de medula óssea.....	25

1 - Introdução e Revisão Bibliográfica

O processo de envelhecimento, através do qual todos os organismos multicelulares devem passar, até suas mortes, vem desafiando definições. Algumas teorias enfatizam a acumulação de mutações ao longo da vida do organismo, como a principal causa dos sintomas associados com o envelhecimento (1,2). Outras destacam os efeitos de mutações deletérias em genes associados com mecanismos de reparo de DNA (3). As mitocôndrias certamente têm um papel preponderante no processo de envelhecimento e mutações em genes relacionados com a respiração celular, podem desencadear cascatas de mutações devido ao acúmulo de radicais livres do oxigênio (4). Existe também a abordagem de uma perspectiva evolucionista, de uma possível determinação genética para o envelhecimento e a extensão da vida dos organismos (5,6,7,8). O debate sobre a imortalidade das linhagens de células germinativas, inter relacionado com a mortalidade das células somáticas (1,9), também levanta questões interessantes quanto ao potencial regenerativo de reservas celulares indiferenciadas, constituídas pelas células-tronco. No entanto, não é possível furtar-se ao fato de que o envelhecimento é um fenômeno multifatorial (4).

Apesar de serem conhecidas por seu potencial de regeneração, algumas vezes ilimitado, as células tronco também envelhecem (9,10). A perda de mecanismos de sinalização e reparo (11) e o encurtamento dos telômeros podem diminuir ou extinguir o potencial de regeneração de células progenitoras indiferenciadas, as quais cumpriram sua função regenerativa quando o organismo e as células eram mais jovens (12). Obviamente, não somente as células envelhecem, mas também o organismo no qual residem, o que implica em influência alterada do nicho celular em células já danificadas pelo envelhecimento (11,13).

As terapias que utilizam células-tronco adultas e de cordão umbilical, estão entre as mais testadas em organismos vivos e bons resultados tem sido alcançados contra as mais variadas patologias, incluindo-se aquelas normalmente associadas com o envelhecimento, tal como a diabetes dependente de insulina (14). A recuperação de processos inflamatórios crônicos (15), a regeneração de lesões musculares e neuronais (16,17,18,19) bem como a prevenção de doenças auto-imunes (20,21) também sinalizam para o potencial das células-tronco adultas e de cordão umbilical como

ferramentas para uma possível reversão dos sintomas do envelhecimento. Ainda assim, injeções de células-tronco em modelos de envelhecimento natural ainda não foram testadas, sendo que este fato constitui um importante desconhecimento sobre o comportamento de células-tronco jovens em nichos envelhecidos.

A fração mononuclear de medula óssea constitui-se de um “pool” de células, com uma grande porcentagem de células precursoras linfóides, que dão origem aos linfócitos, NKC (Natural Killer Cells) e células precursoras mielóides, as quais dão origem às demais células sanguíneas, além de uma pequena porcentagem de células tronco mesenquimais. A opção predominante de utilização da fração mononuclear na terapêutica com utilização de células tronco deve-se ao fato de que esta fração pode ser utilizada sem a necessidade de cultivo para expansão, como ocorre no caso das células tronco mesenquimais puras. Como as células tronco mesenquimais ocorrem em pequena porcentagem na fração mononuclear total, para obter-se concentrações terapêuticas destas células torna-se necessário expandi-las em cultivo. Esta expansão traz o inconveniente de submeter as células a condições de stress inerentes ao cultivo, as quais podem ocasionar instabilidade genética, que pode acarretar o surgimento de células neoplásicas. Além disso, está demonstrado que as células “acessórias”, aquelas que não são mesenquimais indiferenciadas, possuem um papel relevante nos processos de sinalização e modulação da inflamação em terapias celulares bem sucedidas (24).

A proteína GFP (Green Fluorescent Protein) derivada da água viva *Aequorea victoria* é uma ferramenta fundamental na criação de diversos modelos experimentais importantes, na medida em que sua utilização permite a marcação do sujeito experimental, tornando fácil o acompanhamento e identificação deste ao longo de um experimento devido à fluorescência intrínseca da proteína. Esta fluorescência pode ocorrer no espectro da luz ultra violeta visível ou invisível, devendo-se à transferência de elétrons que ocorre em um sítio da molécula designado cromóforo. Esta transferência de elétrons faz com que a proteína entre em um estado ionizado (22), fato que pode ter implicações para sua utilização em bioexperimentação.

Incontáveis modelos transgênicos foram gerados a partir da clonagem do gene GFP e, entre estes, destaca-se o camundongo transgênico EGFP. O gene inserido neste camundongo possui um promotor de actina, o qual faz com que a proteína GFP em sua

forma realçada (Enhanced Green Fluorescent Protein) seja expressa em todas as células e tecidos do organismo, exceto eritrócitos e pelos (23). É interessante notar que estes camundongos apresentam uma síndrome renal glomerular que não ocorre na linhagem c57Bl/6 não transgênica, ficando evidente o fato de que algum fator ligado à transgênese causa modificações fisiológicas epigenéticas, cujas causas ainda não foram desvendadas (25).

Trabalhos que enfocam o processo regenerativo mediado por células tronco em organismos vivos tornam-se simplificados e mais precisos com a utilização desta importante ferramenta, já que a proteína GFP não apresenta efeito citotóxico significativo *in vivo*, ainda que experimentos *in vitro* tenham detectado que ela pode ter efeito deletério em células cultivadas. Estes efeitos estão relacionados com uma produção aumentada de agentes oxidativos devido à fluorescência intrínseca à proteína, sendo que células em cultivo sofrem efeitos deletérios relacionados com o stress oxidativo (26).

Durante o processo de aperfeiçoamento da purificação de células mononucleares de medula óssea, utilizamos medula de cães devido à sua maior disponibilidade e quantidade para ensaios técnicos. A partir dos resultados obtidos, paralelamente ao experimento com camundongos, executamos um experimento de injeção terapêutica de células alogeneicas mononucleares de medula óssea em cães com seqüelas neurológicas de cinomose, visando testar a eficácia terapêutica e segurança do procedimento no que concerne a formação de neoplasia nos animais injetados (27).

1.1 - Hipótese Inicial

A injeção de células mononucleares de medula óssea jovens em camundongos idosos pode prolongar a sobrevida destes.

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Caracterização da Fração Mononuclear de Medula Óssea de camundongos c57Bl/6 EGFP

2.1.1 - Animais experimentais

Para efetuarmos esta caracterização, foi mantida uma colônia reprodutiva de camundongos transgênicos c57Bl6/EGFP nas dependências do CEMIB/Unicamp, tendo sido realizada histerectomia das primeiras matrizes para limpeza dos embriões. As matrizes limpas derivadas da histerectomia foram mantidas em condições SPF (Specific Pathogen Free) sendo os camundongos sempre manipulados dentro de isoladores de pressão positiva (ALESCO, Monte-Mor,SP), sem nenhum contato com o ambiente externo.

Foi oferecida ração para roedores e água *ad libitum* aos animais, sendo estes mantidos em perfeita condição sanitária, atestada por verificações periódicas efetuadas pelo Laboratório de Controle Sanitário do CEMIB/Unicamp.

2.1.2 - Extração e purificação da fração mononuclear de medula óssea

As células mononucleares a serem caracterizadas foram obtidas da medula de ossos longos de camundongos c57Bl6/EGFP de 4 a 6 semanas de idade através da extração asséptica em fluxo, sendo purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque 1119 and 1017, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) a 1000xG por 15 minutos. Após duas lavagens em meio RPMI (Sigma), as células foram ressuspensas em salina, filtradas sobre lã de nylon e contadas em câmara de Neubauer.

2.1.3 - Citogenética

Para a análise citogenética as células mononucleares de medula óssea foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino (Gibco), glutamina 1% (200mM) (Gibco), gentamicina 1% (Gibco).

As células em divisão ativa foram bloqueadas na metáfase com a utilização de Colcemid (0,1µg/mL) (Gibco), destacadas da superfície de cultivo com tripsina (0,25%) (Gibco) e intumescidas pela exposição à solução hipotônica de KCl (0,057M) (Merck).

As células foram então fixadas em solução de etanol/ácido acético para preparação de lâminas.

A análise citogenética dos cromossomos em metáfase foi feita por bandeamento GTG (GTG-banding) (28). As imagens foram capturadas com microscópio BX60 e software Image Pro Plus.

As células foram analisadas aos 14 e 27 dias de cultivo.

2.1.4 - Citometria de fluxo

Foi efetuada a citometria de fluxo para caracterizar os tipos celulares presentes na fração mononuclear de medula óssea dos camundongos c57Bl/6 EGFP, determinando suas porcentagens na fração mononuclear total. Para isso foram utilizados os seguintes marcadores de superfície de membrana:

CD 44, CD 45, SCA – 1 e CD 14.

2.1.5 - Citometria de ciclo celular

A citometria de ciclo celular caracteriza a fração mononuclear quanto a fases de divisão celular e ploidia

2.2 - Injeção de células mononucleares em camundongos idosos

2.2.1 - Animais experimentais e controles

Foi mantido, em condições SPF, um grupo de 24 camundongos C57Bl6/Uni machos, isolados individualmente em caixas, cada um com uma fêmea BalbC/Uni jovem, trocada periodicamente para assegurar máxima fertilidade, sendo acompanhado o desempenho reprodutivo desses animais até a idade determinada para o experimento. Os animais experimentais foram divididos em dois grupos:

-Idade limite de mortalidade (velhice extrema). Definida pela morte natural de 50% do total de animais considerado (29). 4 experimentais / 3 controles

-Meia-idade. Definida pela metade aproximada da média de idade de mortalidade para a linhagem C57Bl/6. 5 experimentais / 2 controles

Todos os animais foram mantidos nas dependências do CEMIB/Unicamp, sendo sempre manipulados dentro de isoladores de pressão positiva (ALESCO, Monte-Mor,SP), sem nenhum contato com o ambiente externo durante todo o experimento.

Foi oferecida ração para roedores e água *ad libitum* aos animais, sendo estes mantidos em perfeita condição sanitária, atestada por verificações periódicas efetuadas pelo Laboratório de Controle Sanitário do CEMIB/Unicamp.

2.2.2 -Transplante de Células-Tronco

As células-tronco foram obtidas da medula de ossos longos de camundongos c57Bl6/EGFP de 4 a 6 semanas de idade através da extração asséptica em fluxo, sendo purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque 1119 and 1017, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) a 1000xG por 15 minutos. Após duas lavagens em meio RPMI (Sigma), as células foram re suspendidas em salina, filtradas sobre lã de nylon e contadas em câmara de Neubauer para ajustes de concentração.

Após atingida a idade experimental dos animais, as injeções foram inicialmente programadas para ocorrerem mensalmente, sendo no entanto esta programação interrompida após o aparecimento dos primeiros sinais de neoplasia no grupo de velhice extrema. Foram portanto realizadas ao todo duas injeções com intervalo de um mês entre elas. Todos os animais experimentais foram injetados nos mesmos dias e com células oriundas das mesmas amostras.

As injeções ocorreram de acordo com o seguinte protocolo:

1ª injeção: Ambos os grupos (velhice extrema e meia-idade) receberam, para cada animal, 2×10^7 células-tronco em suspensão em 200µl de salina, através de injeção via plexo orbital. Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitonal de Avertim (0,3 ml) antes do procedimento. Os controles também foram anestesiados com Avertim e passaram pelos mesmos procedimentos que os animais experimentais, exceto que as injeções via plexo orbital foram feitas com 200µl de salina pura.

2ª injeção: Ambos os grupos (velhice extrema e meia-idade) receberam, para cada animal, 2×10^6 células-tronco em suspensão em 200µl de salina, através de injeção intraperitonal, feita sem anestésico com contenção manual dos animais. Os controles

passaram pelos mesmos procedimentos que os animais experimentais, exceto que as injeções foram feitas com 200µl de salina pura.

2.2.3 - Determinação de Desempenho Reprodutivo e Estado Geral

Foram feitos registros sobre o desempenho reprodutivo de todos os animais, desde 6 meses antes das injeções até o final do experimento, com a morte do último animal injetado ou controle. Todos os camundongos receberam fêmeas jovens adultas BalbC/Uni SPF, as quais foram trocadas periodicamente para assegurar sua aptidão reprodutiva.

2.2.4 - Histopatologia

Após a morte dos animais experimentais e controles, foram coletados seus órgãos, que foram fixados em formaldeído a 4%, desidratados em fenol e emblocados em parafina.

Foram preparadas secções de 5µm e fixadas com acetona gelado. Para detectar-se a presença de células-tronco EGFP transplantadas nos tecidos fixados, as secções foram incubadas com anticorpo anti-EGFP conjugado com isotiocianato (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) e duplamente corado com anti-miosina conjugado com biotina (American Qualex, San Clemente, CA), sendo efetuada a revelação com streptavidina cicromo 3 (streptavidin cychrome 3 -PharMingen). A contracoloração foi feita com DAPI, para visualização dos núcleos.

A presença de células fluorescentes foi determinada por observação em microscópio AX 70, com sistema de epifluorescência, utilizando-se filtros apropriados (Olympus).

A caracterização das células foi feita através de exame morfológico e citogenético. A análise morfológica foi realizada através da coloração com Hematoxilina-Eosina e visualização em microscopia óptica com registro fotográfico dos cortes histológicos.

2.2.5 - Cultura de Células e Análise Citogenética

Foram derivadas duas linhagens celulares tumorais do fígado de 2 animais experimentais sacrificados, as quais foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco),

suplementado com 10% de soro bovino (Gibco), glutamina 1% (200mM) (Gibco), gentamicina 1% (Gibco).

As células em divisão ativa foram bloqueadas na metáfase com a utilização de Colcemid (0,1µg/mL) (Gibco), destacadas da superfície de cultivo com tripsina (0,25%) (Gibco) e intumescidas pela exposição à solução hipotônica de KCl (0,057M) (Merck). As células foram então fixadas em solução de etanol/ácido acético para preparação de lâminas.

A análise citogenética dos cromossomos em metáfase foi feita por bandejamento GTG (GTG-banding) (28). As imagens foram capturadas com microscópio BX60 e software Image Pro Plus.

2.3 - Injeções de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães

Foram realizadas injeções alogeneicas de células mononucleares de medula óssea em cães com seqüelas neurológicas de cinomose, visando estabelecer o potencial terapêutico destas células e testar a segurança de injeções alogeneicas, visto que alguns doadores poderiam apresentar instabilidade genômica não detectada, favorecendo o surgimento de eventuais neoplasias.

2.3.1 - Animais experimentais

Foram utilizados como receptores 11 cães com seqüelas neurológicas com pré-diagnóstico de cinomose e 5 animais saudáveis como doadores da medula óssea.

Dos 11 cães tratados, 7 apresentavam manifestações clínicas agudas ou recentes da doença, dos quais 2 manifestavam paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, com diminuição ou ausência de resposta proprioceptiva (Figuras 1 e 2), 1 além destes sinais, pneumonia, conjuntivite e convulsões parciais, 1 gastroenterite, conjuntivite, pneumonia, convulsão e desidratação, 1 paraplegia e déficit de coordenação de membros pélvicos, com diminuição da resposta proprioceptiva e convulsões parciais com vocalização constante, 1 paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, sem nenhuma resposta proprioceptiva e convulsões parciais e 1 apenas mioclonias e anemia ferropriva. Quatro animais manifestavam sinais crônicos, há pelo menos 3 meses e por até 4 anos. Destes, 2 apresentavam paraplegia e incoordenação motora em membros pélvicos, 1 déficit de coordenação, ablesia e andar em círculos e 1 mioclonia.

2.3.2 - Extração e purificação das células mononucleares

As células mononucleares foram obtidas da medula óssea extraída por punção do escudo ilíaco dos cães doadores, após anestesia com a combinação do cloridrato de xilazina (Rompum – Bayer®) com a associação de cloridrato de tiletamina e zolazepam (Zoletil – Virbac®), sendo purificadas por centrifugação em gradiente de Ficoll (Histopaque 1119 e 1017, 1:1; Sigma, St. Louis, MO) a 1000xG por 15 minutos. Após duas lavagens em meio RPMI (Sigma), as células foram re-suspendidas em salina, filtradas sobre lã de nylon e contadas em câmara de Neubauer para ajustes de concentração.

2.3.3 - Injeção das células mononucleares

Doses entre $1,00 \times 10^8$ e $2,50 \times 10^8$ de células mononucleares de medula óssea foram injetadas, por via intravenosa, nos pacientes selecionados para o tratamento.

2.4 - Tratamento Estatístico

2.4.1 - Tabulação dos dados do experimento com camundongos

Foi feito o registro das idades em que os animais receberam a injeção e a idade de morte para ambos os grupos e seus controles, efetuando-se a média e desvio padrão das idades. Foi também determinado o intervalo de tempo entre a injeção e a morte dos animais para ambos os grupos e seus controles, efetuando-se a média e desvio padrão dos intervalos de mortalidade. Dessa forma foi traçada a curva de sobrevivência para ambos os grupos e seus controles.

Também foram registrados os nascimentos e número de filhotes para ambos os grupos e seus controles, fazendo-se a média e desvio padrão do número de filhotes por grupo e do intervalo entre partos. Foi feita a tabulação comparativa entre os dados reprodutivos dos animais experimentais e seus controles antes e depois das injeções.

2.5 - Laboratórios e Infra-Estrutura para Desenvolvimento do Projeto

- Manutenção e manuseio dos camundongos, extração e injeção de células tronco: Laboratório de Genética do CEMIB/Unicamp – Responsável: Prof. Dr. Luiz Augusto Correa Passos

- Inspeção sanitária: laboratório de Inspeção Sanitária do CEMIB/Unicamp – Responsável: Prof. Dr. Rovilson Giliolli.
- Histopatologia: Laboratório do Departamento de Anatomia Patológica / FCM / Unicamp. Responsável: Prof. Dr. José Vassallo
- Citogenética: USC/FAMEMA – Laboratório de Citogenética – Responsável: Prof. Dr. Spencer Luiz Marques Payão.

3 - Resultados

3.1 - Caracterização da Fração Mononuclear de Medula Óssea de camundongos c57Bl/6 EGFP

3.1.1 - Citogenética

As células foram analisadas aos 14 e 27 dias de cultivo, mostrando uma proporção anormal de células geneticamente alteradas no total de metáfases analisadas.

Tabela 1: Análise de metáfases de células mononucleares de medula óssea EGFP jovens.

CULTIVO	RESULTADO NORMAL	RESULTADO ALTERADO	Total
14 DIAS	11	02	13
27 DIAS	04	03	7

Observou-se poliploidia nas células alteradas.

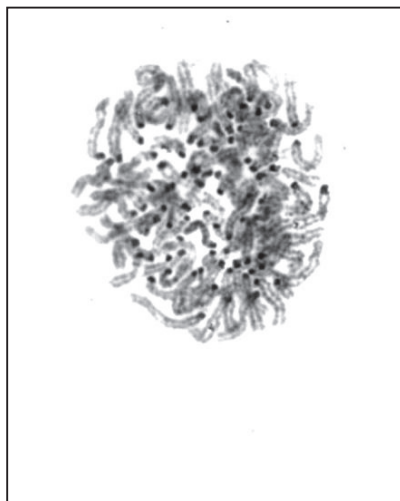


Fig.1 – Célula EGFP jovem poliplóide após 14 dias de cultivo

3.1.2 - Citometria de fluxo

O marcador CD 44 determina a população de células estromais que possuem esta glicoproteína de superfície de membrana relacionada com adesão celular (Graf. 1).

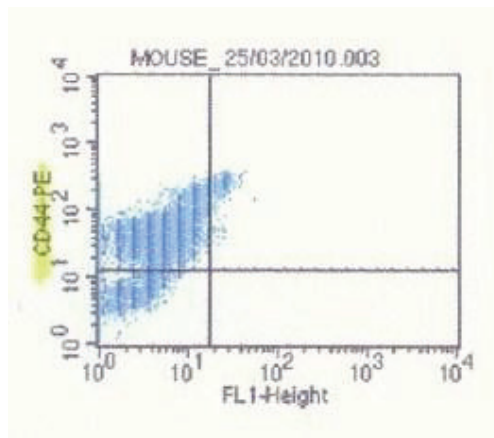


Gráfico 1 - Proporção de células CD 44: 79,73%

O marcador CD 45 caracteriza as células hematopoiéticas, sendo uma tirosina quinase que se expressa em precursores linfóides ou mielóides (Graf.2).

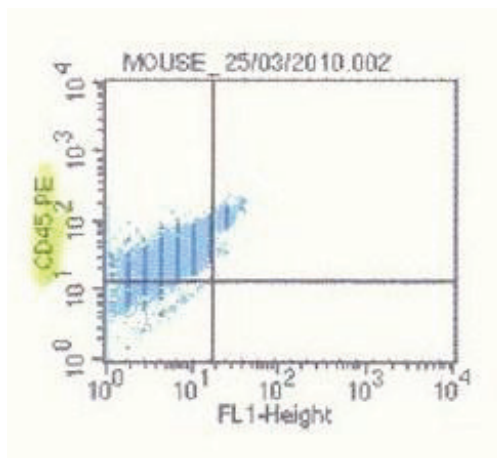


Gráfico 2 -Proporção de células CD 45: 69,37%

O marcador SCA – 1 caracteriza a população de células propriamente designadas como células tronco mesenquimais. Esta é a população de células precursoras mais indiferenciadas e que demonstram capacidade de diferenciação em todos os tipos celulares (Graf.3).

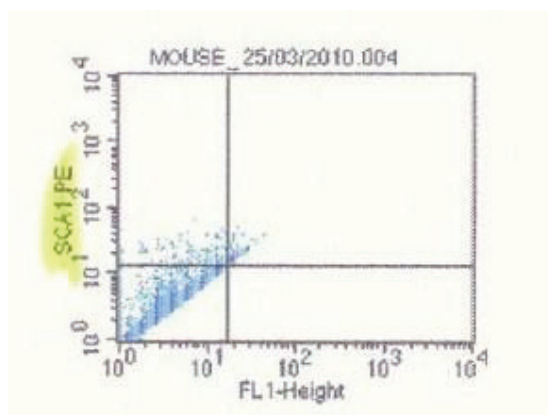


Gráfico 3- Proporção de células SCA-1: 1,53%

O marcador CD 14 caracteriza os monócitos presentes na fração mononuclear. São uma população de células já diferenciadas, mas que exercem um importante papel nos processos regenerativos mediados por células tronco (Fig 5).

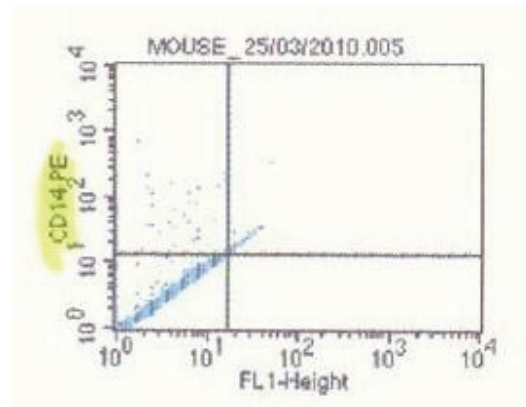
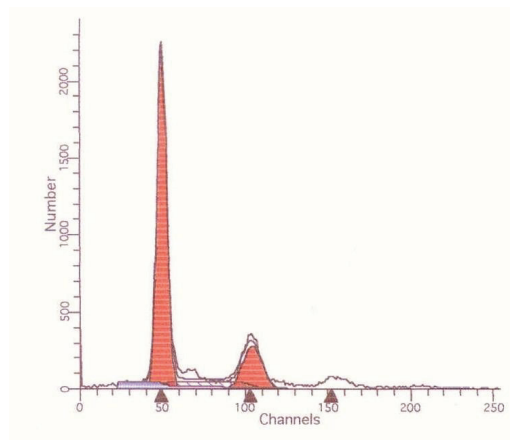


Gráfico 4- Proporção de células CD 14: 1,64%

As proporções encontradas na citometria de fluxo estão dentro do esperado para a fração mononuclear de medula óssea, contendo uma maioria de precursores hematopoiéticos e uma pequena porcentagem de células tronco mesenquimais e monócitos.

3.1.3 - Citometria de ciclo celular

A citometria de ciclo celular não detectou nenhuma anormalidade na proporção de células em cada fase de divisão celular e ploidia (Graf.5).



100% células diplóides: G0-G1: 70% G2-M: 17,58% S: 12,42%

Gráfico 5 – Ploidia e fases de divisão das células jovens EGFP mononucleares de medula óssea.

3.2 - Injeção de células mononucleares em camundongos idosos:

3.2.1 -Análise do desempenho reprodutivo

Após a injeção com as células mononucleares de medula óssea, o grupo G1 retomou a atividade reprodutiva. Três dos cinco camundongos injetados reproduziram-se após um período de 4 meses sem reprodução anterior à injeção. Um dos animais injetados reproduziu consistentemente até os 31 meses de idade e sua última fecundação produziu 10 neonatos, sendo que todos sobreviveram até a idade adulta (Graf.6). Nenhum dos camundongos controle retomou a atividade reprodutiva.

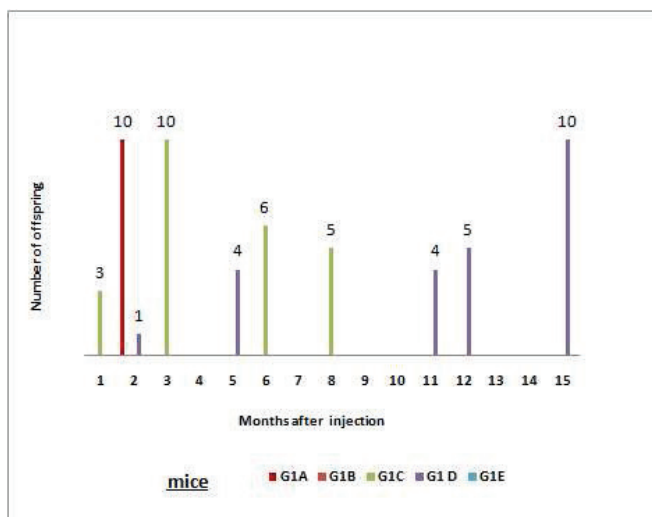


Gráfico 6 - Análise do desempenho reprodutivo dos camundongos receptores do grupo G1.

3.2.2 - Análise de sobrevivência

Os camundongos do grupo G1 que receberam a injeção de células mononucleares de medula óssea permaneceram visivelmente mais saudáveis que os camundongos controle durante o experimento, sem apresentarem curvatura acentuada da espinha ou queda de pelos até que atingiram a idade de sobrevivência média para a linhagem c57Bl/6 (), quando repentinamente desenvolveram hepatomegalia visível, que demonstrou ser consequência de formação neoplásica, aproximadamente um ano após as injeções. O grupo G2 não apresentou recuperação reprodutiva e todos os animais injetados desenvolveram hepatomegalia e neoplasia, morrendo pouco tempo após as injeções (Tabela 2). A média de dias entre a constatação de hepatomegalia e a morte dos animais foi de 16 (± 14).

Tabela 2 : Idade dos animais injetados e controles no dia da injeção e no dia da morte (Média ± S.D.)

G1, G2: experimental / CG1, CG2: controle

	Idade na injeção			Idade na morte			Inj./Morte	
	Dias	Meses		Dias	Meses		Dias	Meses
G1	418±54	13.9±1.8		803±167	26.8±5.6		381±122	12.7±4.1
CG1	428±0	14.3±0		740±224	24.7±7.5		312±224	10.4±7.5
G2	787±25	26.2±0.8		837±31	27.9±1		51±15	1.7±0.5
CG2	760±49	25.3±1.6		818±17	27.2±0.4		58±51	1.8±1.6

3.2.3 - Transformação neoplásica das células mononucleares injetadas em camundongos idosos

Todos os camundongos injetados desenvolveram uma neoplasia caracterizada por análise histológica como: neoplasia hemolinfóide de alto grau histológico, morrendo alguns dias após os primeiros sintomas visíveis de hepatomegalia. Tanto o grupo G1 como o G2 e seus respectivos controles morreram dentro da faixa esperada de sobrevida média para a linhagem c57Bl/6. No entanto, nenhum dos animais controle desenvolveu hepatomegalia ou a típica neoplasia observada nos animais injetados.

Análise histopatológica dos tecidos dos camundongos receptores revelou que as células neoplásicas eram EGFP+, sendo derivadas das células injetadas, atingindo os linfonodos, baço e fígado. Todos os animais injetados apresentaram o mesmo tipo de neoplasia hemolinfóide de alto grau histológico. A neoplasia foi caracterizada por análise morfológica, ficando evidente a perda de arquitetura celular, a cromatina evidente e o número aumentado de meioses, denotando alta atividade proliferativa. Pode-se observar também a presença de plasmócitos, que sugerem a possibilidade de um linfoma tipo B.

Observou-se também metaplasia mielóide no baço e no fígado tanto dos camundongos injetados como dos controles. A metaplasia mielóide é um evento normal nestes órgãos de camundongos, visto que possuem função hematopoiética durante a fase embrionária. Entretanto, nos camundongos injetados a metaplasia foi potencializada, com formação de células mielóides EGFP+ e um aumento de ocorrência em relação aos controles.

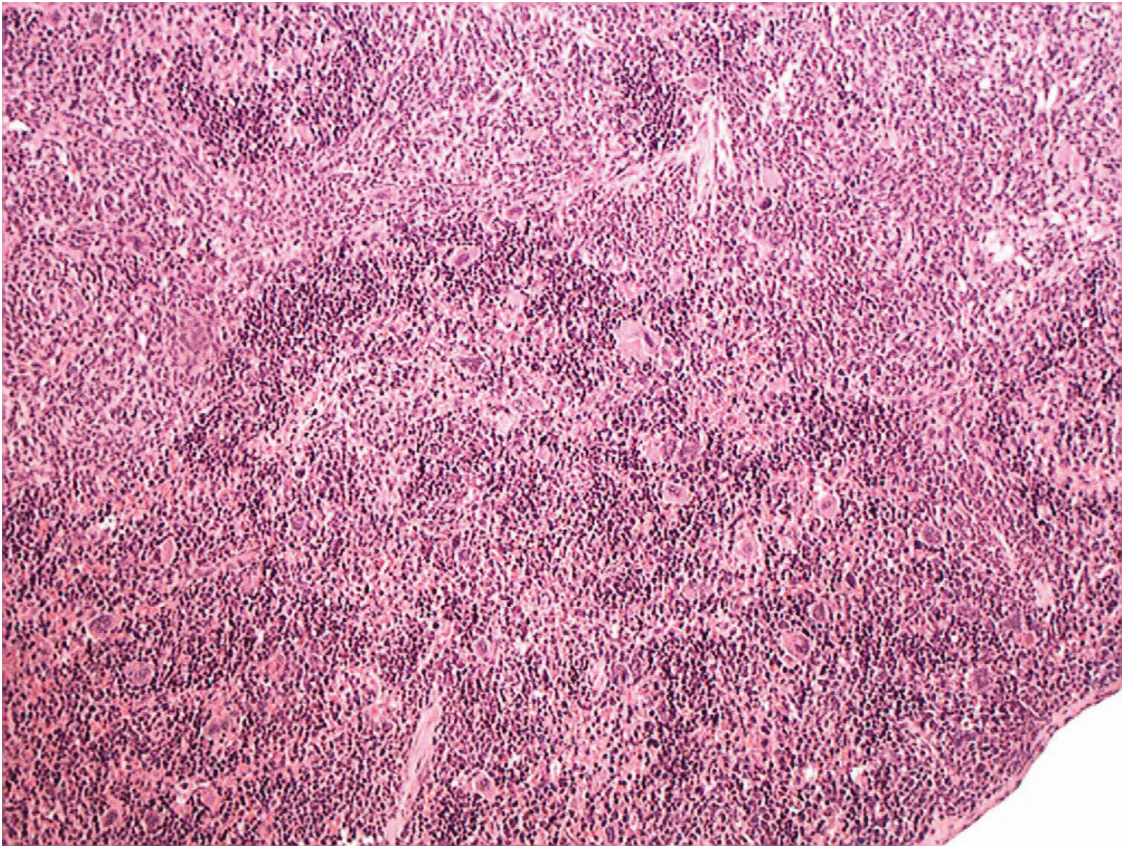


Fig.2 : baço com infiltração neoplásica (200X)

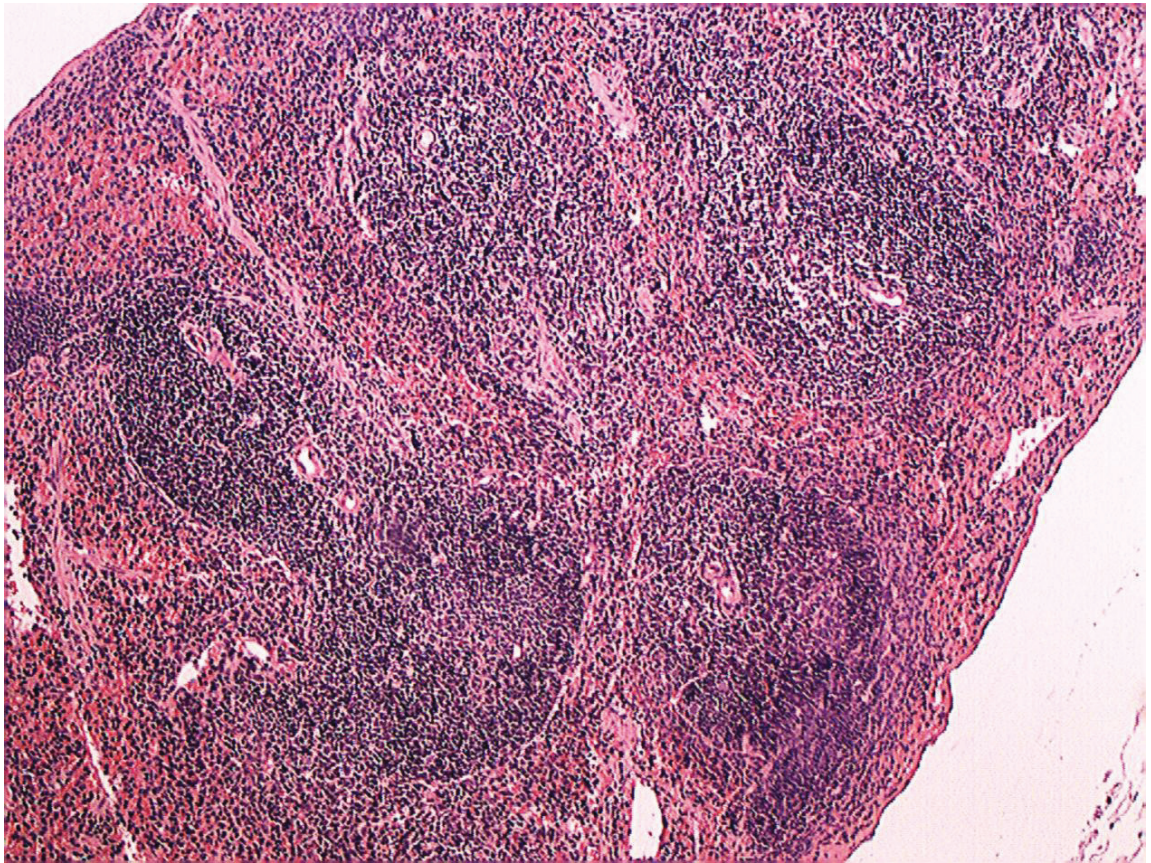


Fig 3 : baço controle (200 X)

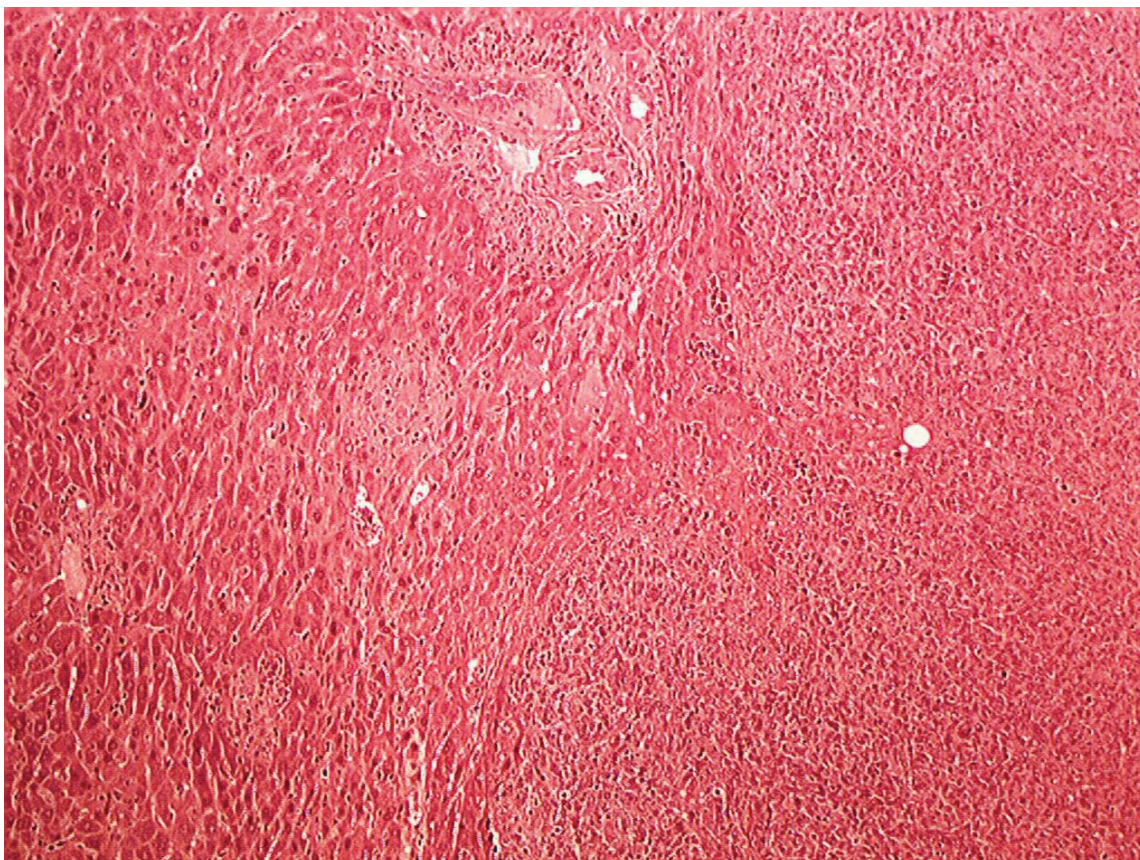


Fig.4: figado com infiltração neoplásica (400X)

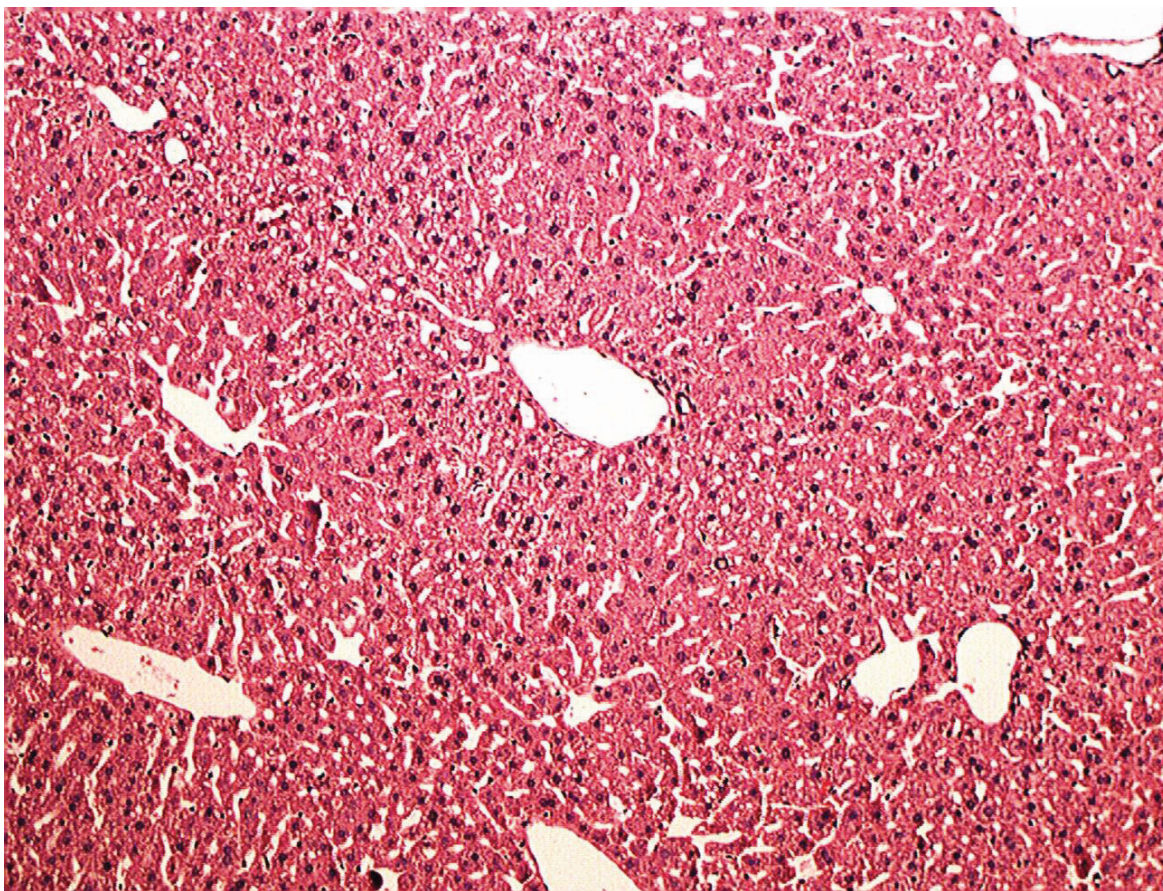


Fig.5: figado controle (400X)

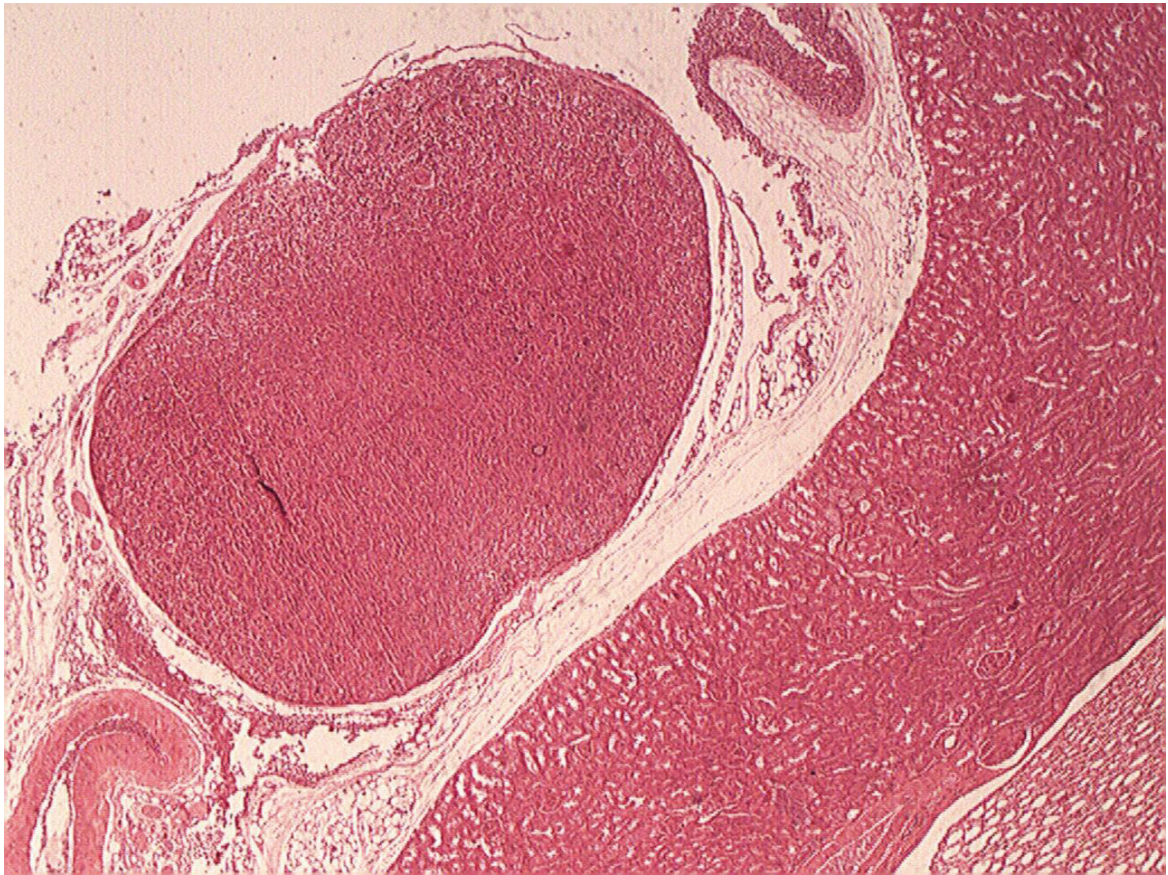


Fig.6: linfonodo peri-renal neoplásico (100X)

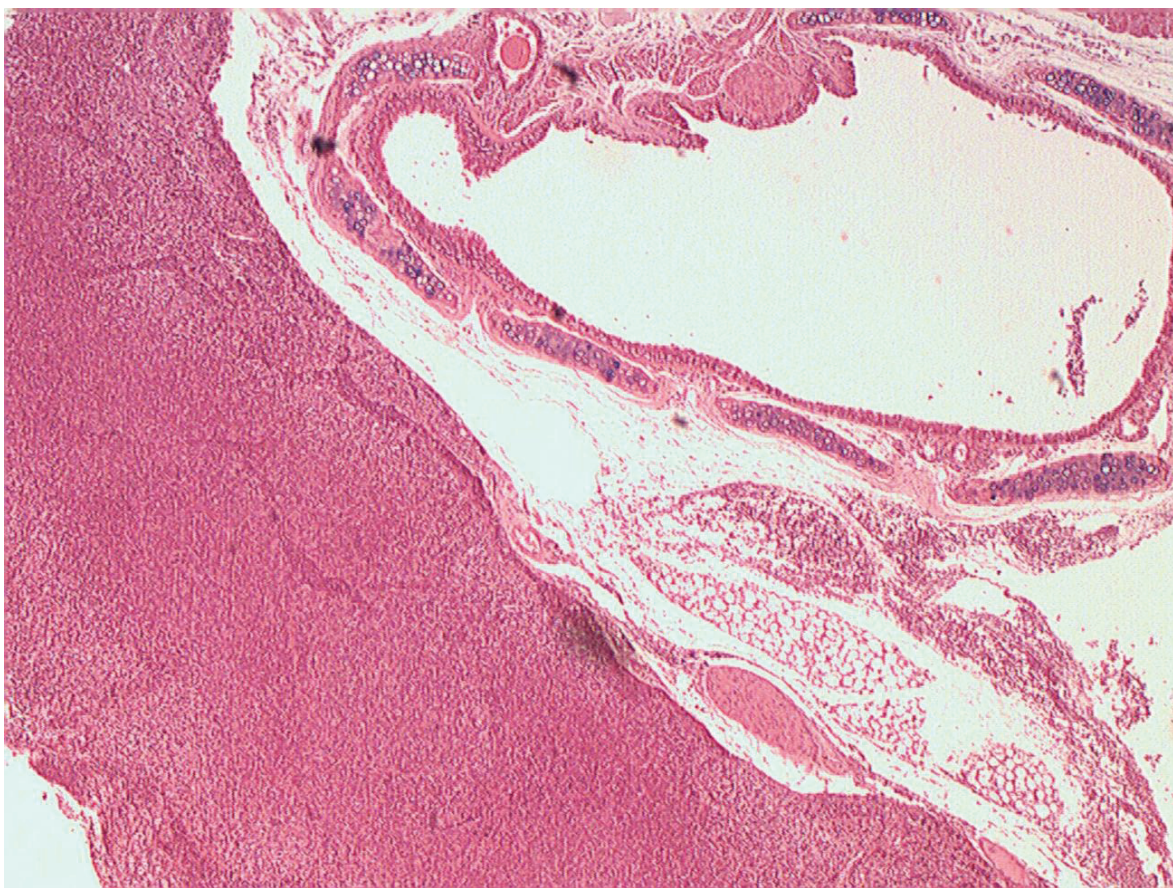


Fig.7: linfonodo Peri-traqueal neoplásico (100X)

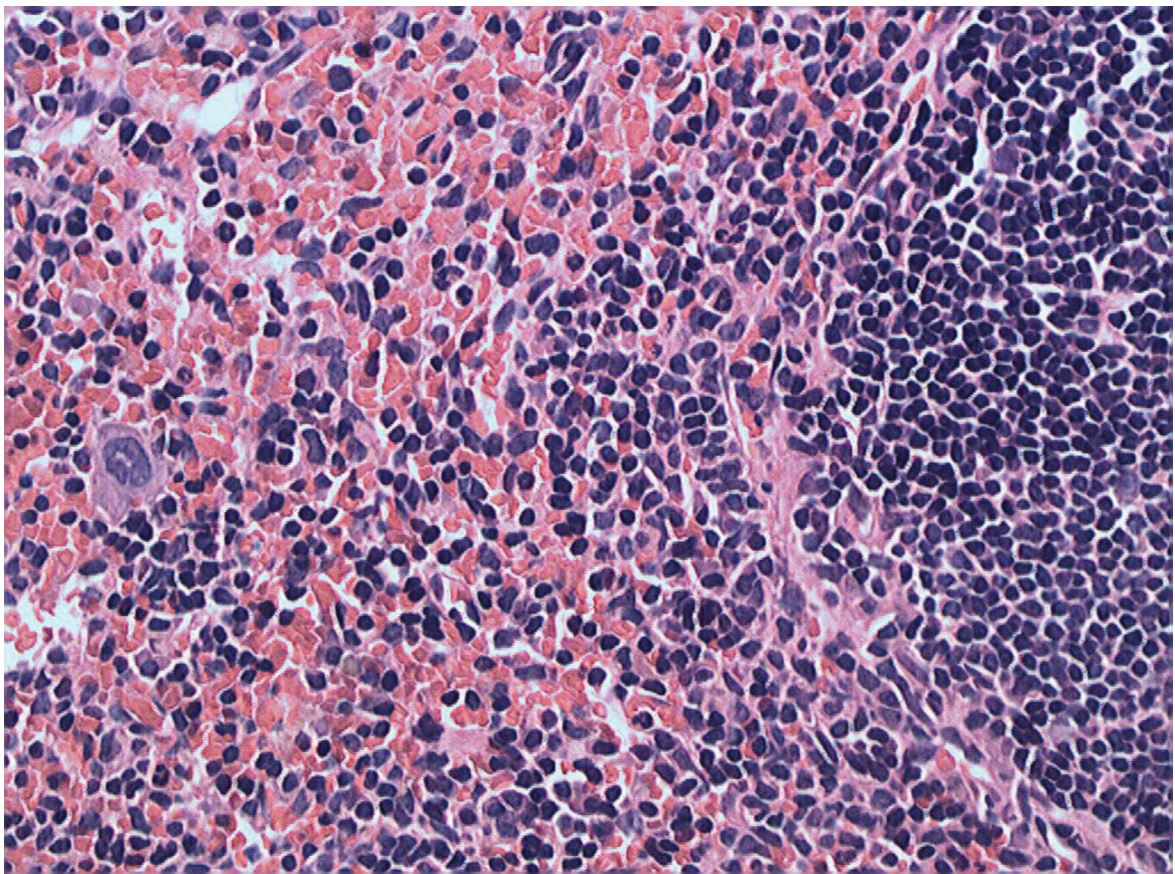


Fig.8: Metaplasia mielóide (controle) (1000X)

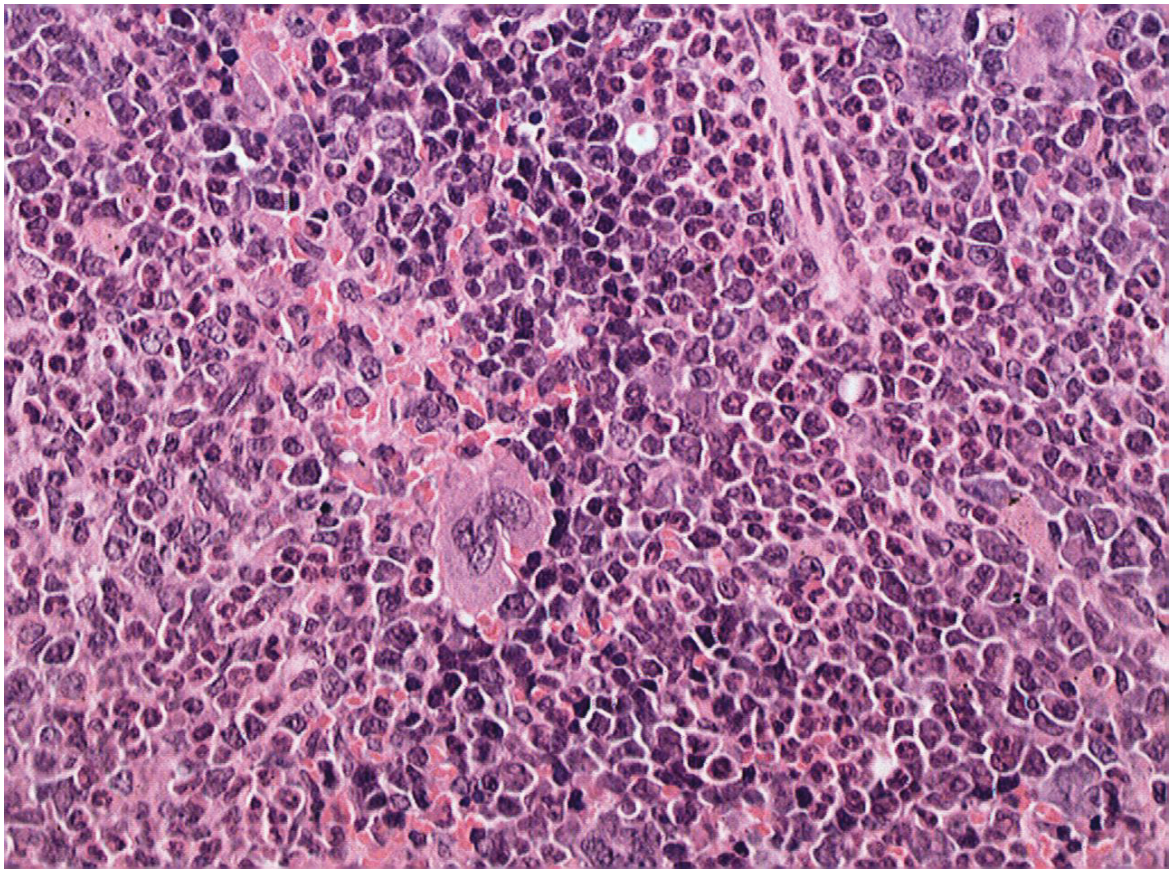


Fig.9: Metaplasia mielóide (injetado) (1000 X)

Após marcação imunohistoquímica para a proteína EGFP e o marcador CK18 (caracterização de hepatócitos) de um corte da massa tumoral do fígado, ficou evidente que a neoplasia é formada por células EGFP+, portanto oriundas dos doadores (Fig).

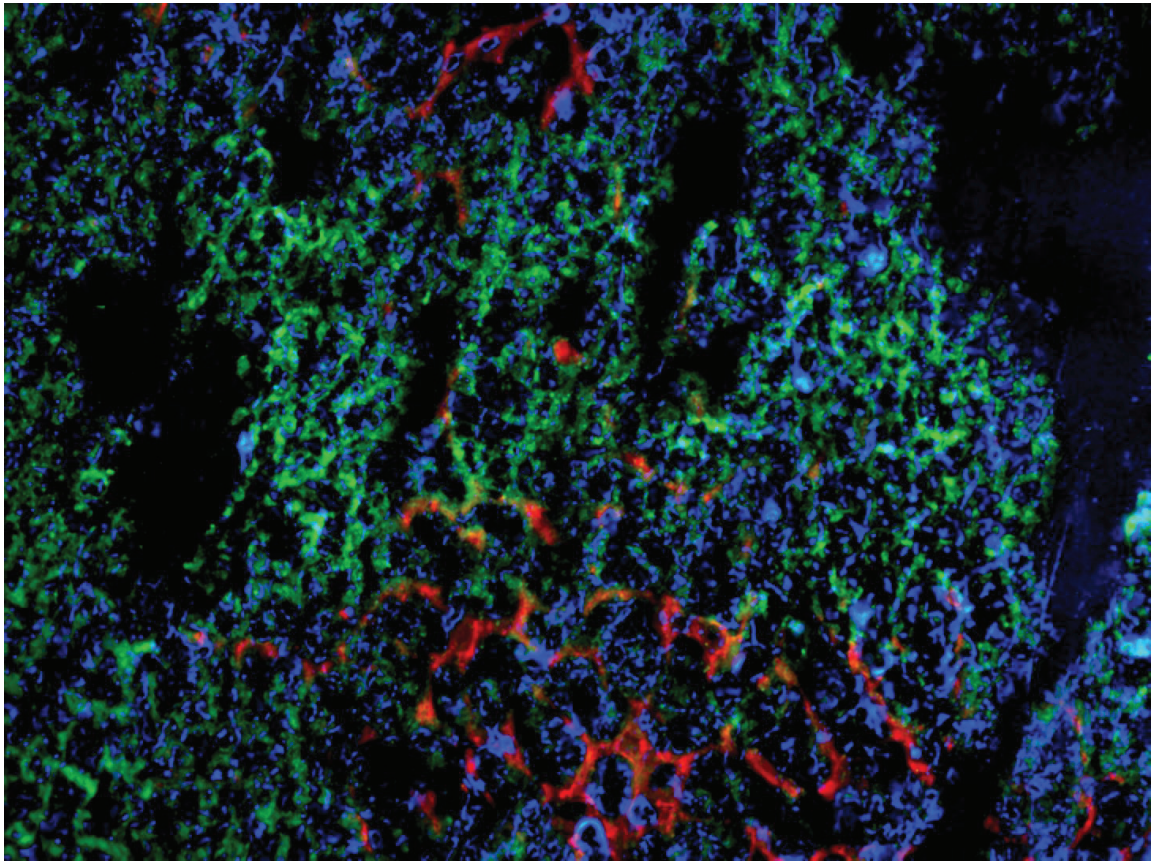


Fig.10 – corte de fígado com células EGFP+ tumorais (verde), hepatócitos normais CK18+(vermelho), núcleos evidenciados em azul (DAPI) (400X).

Os seguintes órgãos analisados não apresentaram sinais de transformação neoplásica:

testículo - cérebro – coração - rins - pulmão - vesícula seminal

Duas linhagens diferentes de células neoplásicas foram derivadas de fragmentos do fígado de dois animais do grupo G2.

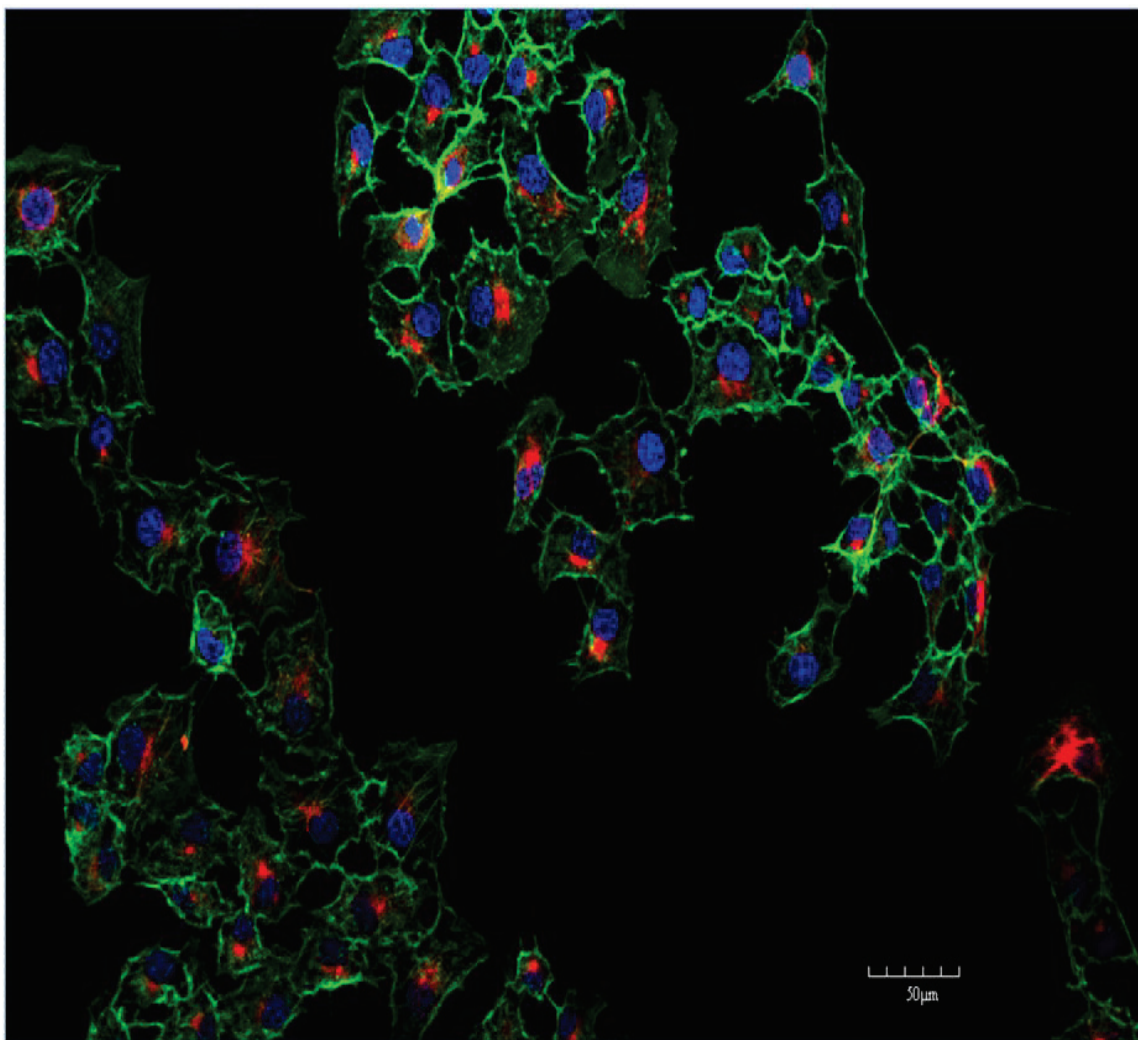


Fig.11 – células EGFP+ (verde) de linhagem tumoral extraída de fragmento do fígado de animal injetado. Núcleos evidenciados em azul (DAPI) (1000 X).

Foram analisadas 20 metáfases, todas anormais, com ocorrência de poliploidia, cromossomos circulares e cromossomos acêntricos nestas linhagens (Figs. 12 e 13).

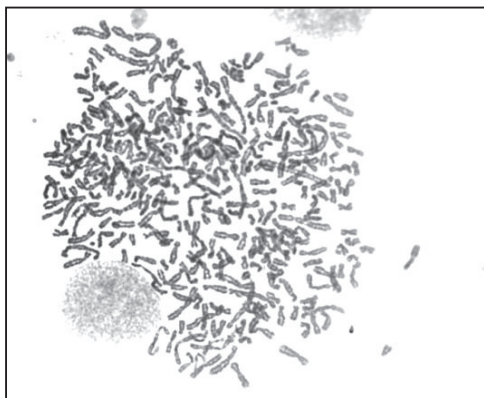


Fig:12

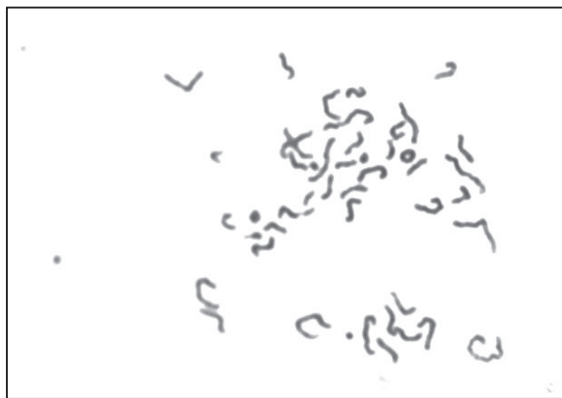


Fig:13

Fig.12 e 13: Poliploidia, cromossomos circulares e quebras cromossômicas em células de linhagem tumoral EGFP+.

3.3 - Injeção de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães

Dos 7 animais com cinomose aguda ou recente, 5 apresentaram remissão completa dos sinais clínicos (Figuras 3, 4 e 5). Destes, apenas 2 não tiveram melhora completa, tendo seus responsáveis optado por eutanásia, um deles menos de 1 mês após o transplante e o outro, 2 semanas após um segundo transplante, sendo que este último apresentava ainda sinais associados a fase virêmica da doença, com pneumonia e conjuntivite severas. Dos animais com sinais crônicos, 3 apresentaram melhora visível na primeira semana após o transplante, contudo, 2 deles, após curto período de estabilidade, apresentaram novamente os mesmos sinais clínicos vistos antes do transplante. O animal que apresentava ablepsia teve melhora dos outros sinais, mas não recuperou a visão. Nenhum dos animais apresentou neoplasia após 8 meses de acompanhamento.

Correção adicionada à Dissertação em 3 de maio de 2012:

A descrição da seção 2.3 “Injeções de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães” e 3.3 “Injeção de células mononucleares de medula óssea alogeneicas em cães” incluindo as figuras 14, 15 e 16 são provenientes do estudo de número 27 (Brito HFV, Corat MAF, Santos MR, Gilioli R, Passos LAC, Lancelloti M, Ferreira F, Li LM. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. Medvet 2010; 8(24): 26-29) da lista de referências desta dissertação.



Fig.14: Animal com seqüela recente de cinomose canina, apresentando paraplegia e incoordenação de membros pélvicos, com visível atrofia muscular.



Fig.15: Animal mostrado na figura 14, duas semanas após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, no entanto, o animal apresentava ainda déficit proprioceptivo.



Fig.16: Animal mostrado na figura 14, 42 dias após o transplante de células mononucleares. Nota-se visível recuperação, com recuperação completa da musculatura. O animal recuperou completamente a capacidade proprioceptiva.

4 - Discussão

É conhecido o fato de que as células-tronco adultas injetadas tendem a se acumular no fígado e baço dos receptores, permanecendo quiescentes, sem interferir com a função normal destes órgãos (30,31,32). Não se sabe se estas células exercem funções regenerativas de longo prazo no organismo injetado, funcionando como reserva celular, ou se, quando submetidas à longa maturação no organismo do hospedeiro, passam por modificações que poderiam afetar sua estabilidade genômica, ocasionando a formação de linhagens tumorais.

Estes dois processos antagônicos somente poderiam ser testados em modelos de envelhecimento, permitindo-se que as células injetadas sofram a ação de um nicho envelhecido e determinando as modificações recíprocas envolvidas. Em nosso modelo, ficou evidente que células jovens com predisposição à instabilidade, como é o caso de células com fenótipo “mutator” (33), podem ser afetadas pelo nicho envelhecido sofrendo transformação neoplásica mesmo após longo tempo de quiescência sem prejuízo aparente ao organismo receptor.

Diversas teorias sobre o impacto da instabilidade genômica na formação de neoplasias foram propostas. Entre as questões mais prementes suscitadas por este

contexto, estão as seguintes: a instabilidade genômica é um evento que ocorre antes ou após a formação de neoplasias? A instabilidade genômica é a força motriz da tumorigenese? Um genoma instável é necessário para a evolução das neoplasias?

Deve-se também destacar que, na última década, o conceito de “célula câncer” surgiu do reconhecimento do fato de que apenas uma pequena fração de células tumorais parecem reter a capacidade de auto-regeneração e proliferação ilimitada (34). Ao mesmo tempo, sabe-se que o câncer é uma doença relacionada com o envelhecimento, desenvolvendo-se no limite de senescência das células proliferativas (35).

Uma outra perspectiva sobre a relação entre envelhecimento e tumorigenese é fornecida pela hipótese do fenótipo “mutator” (33), que considera que mutações relacionadas com a perda de estabilidade genética da célula precedem as mutações propriamente tumorigênicas, sendo que seriam necessárias condições ambientais determinadas para que se deflagre o efeito desestabilizador dos genes “mutator” (36). Estas mutações podem ocorrer na linhagem germinativa de células-tronco, originando síndromes tumorais hereditárias. Uma questão muito pertinente levantada pela existência destas síndromes é a da interação entre as células portadoras do gene “mutator” e seu nicho, o qual pode determinar o tipo de tumor apresentado devido à seleção clonal de linhagens de células transformadas (37).

A comparação de células mesenquimais de medula óssea e de tecido adiposo de camundongo c57Bl/6 EGFP e c57Bl/6 não detectou nenhuma diferença significativa em termos de potencial de diferenciação, bem como nenhuma morfologia ou comportamento anormal destas células (38), o que está de acordo com o perfil citométrico normal encontrado em nosso estudo.

Os estudos de citogenética realizados com células tronco de medula óssea de camundongos c57Bl/6 normais não detectaram nenhuma anormalidade cromossômica destas células em cultivo (39). No entanto, visto que realizamos pela primeira vez a caracterização citogenética de células mononucleares de medula óssea da variedade transgênica EGFP do camundongo c57Bl/6, encontramos alterações significativas, as quais poderiam ser determinadas por fatores definidos.

A inserção do transgene poderia causar uma alteração posicional no ADN receptor (deleção ou “frame-shift”), sendo que se esta alteração atingir genes relacionados com a estabilidade celular, teríamos o fenótipo geneticamente instável observado. Entretanto há evidências de que o camundongo transgênico c57Bl6/EGFP não possui tais alterações em seu genoma (25).

Outra possibilidade seria a indução de stress oxidativo pela proteína GFP, na medida em que mesmo no espectro de luz ultravioleta visível, esta proteína emite fluorescência, sendo este processo dependente da ionização da molécula. Foi demonstrado que a proteína GFP pode ter efeitos citotóxicos em culturas de células, devido aos resíduos oxidativos da fluorescência (26)

Quando ocorre desequilíbrio entre produção de agentes oxidativos e mecanismos endógenos de metabolização, aumenta a taxa de mutações pontuais aleatórias, as quais podem eventualmente atingir genes relacionados com o próprio metabolismo dos agentes oxidativos ou outros genes relacionados com a estabilidade genética da célula. Esta característica de aumento de stress oxidativo da célula devido à ação da proteína GFP pode estar determinando um fenótipo “mutator” nestas células, de acordo com a hipótese proposta por Loeb (33), manifestando-se como a instabilidade citogenética em cultivo detectada em nosso estudo e a transformação neoplásica ocorrida nos organismos de idade extrema.

É interessante notar que a sub regulação de mecanismos endógenos de destoxificação de agentes oxidativos é uma das características de um organismo envelhecido (4). A produção de agentes oxidativos pelas células jovens injetadas pode ser potencializada por seu predomínio reprodutivo em relação às células envelhecidas do próprio organismo (40), sendo que ao ser ultrapassado determinado ponto de sub-regulação de mecanismos destoxificantes, o fenótipo mutator será agravado, favorecendo o surgimento de linhagens tumorais que sofrerão seleção clonal pelo ambiente do organismo. Neste experimento, a seleção clonal de uma determinada linhagem tumoral ficou evidente no fato de que todos os animais injetados apresentaram o mesmo tipo de tumor, sugerindo que as células contribuíram apenas com sua instabilidade genômica e maior incidência de mutações pontuais aleatórias, enquanto

que o ambiente celular determinado pelo organismo envelhecido dos camundongos isogênicos c57Bl/6 foi o responsável pela seleção da linhagem tumoral detectada.

O sistema imunológico em organismos velhos é significativamente menos funcional que em organismos jovens (41), fato que poderia definir uma maior propensão a formação de neoplasia devido à ausência de mecanismos de detecção de células defeituosas e indução à apoptose, entretanto, realizamos a injeção de células jovens EGFP em linhagens de camundongos imunodeprimidos (Corat et al. resultados não publicados) sendo que estes não apresentaram evidências de neoplasia mediante análise histológica após 8 meses de acompanhamento, sugerindo não ser o sistema imunológico sub funcional o mecanismo envolvido com a transformação neoplásica detectada neste trabalho.

Os resultados do experimento com injeções alogeneicas em cães sugerem o grande potencial terapêutico deste procedimento, sendo que a formação de neoplasia parece estar restrita às condições prévias detectadas no experimento com camundongos, quais sejam: células jovens geneticamente instáveis injetadas em organismos que atingiram envelhecimento extremo.

5 - Conclusões

A hipótese inicial não se confirmou neste experimento, sendo que não houve aumento de sobrevida dos camundongos velhos injetados, porém deve-se levar em consideração que foi detectada instabilidade intrínseca nas células jovens injetadas, havendo indícios de que a neoplasia observada pode ter sido deflagrada pelas condições de ambiente celular dos organismos velhos receptores.

As células mononucleares de medula óssea de camundongos transgênicos c57Bl/6 EGFP apresentaram perfil citométrico normal quanto a tipos celulares, fases de divisão celular e ploidia. Entretanto, após cultivo para análise citogenética estas mesmas células demonstraram instabilidade genética, apresentando uma proporção significativa de células poliplóides alteradas, mediante fixação das metáfases e visualização de seus cromossomos. Há evidências de que esta instabilidade deve-se ao excesso de agentes oxidativos produzidos no fenômeno de fluorescência da proteína GFP, os quais podem

causar quebra na homeostase da célula, produzindo um aumento nas mutações aleatórias passíveis de causarem as alterações cromossômicas observadas no cultivo.

Esta característica das células dos camundongos transgênicos EGFP deve ser levada em conta em futuros experimentos que utilizem este modelo, sendo fundamental a utilização concomitante de outro modelo com células passíveis de serem marcadas sem a utilização da proteína fluorescente GFP, como controle.

No entanto, se a instabilidade genética intrínseca das células EGFP for levada em consideração, pode-se pensar na utilização destas células injetadas em organismos velhos como modelos controlados de tumorigênese, determinando-se quais as condições fisiológicas *in vitro* e *in vivo* que poderiam deflagrar a instabilidade celular. Além disso, células aleatoriamente mutadas irão sofrer seleção clonal diferenciada em cada organismo, sendo que a interação entre ambiente e célula potencialmente instável poderá determinar o tipo de tumor em cada indivíduo.

As condições de seleção clonal frente a um mesmo padrão de instabilidade genética, poderiam ser desvendadas mediante a utilização destas células, as quais além de possuírem um mecanismo intrínseco de instabilidade, possuem marcação por fluorescência, permitindo que se acompanhe seu comportamento *in vivo*.

Não obstante os resultados positivos indicando regeneração detectados nas injeções realizadas em cães com seqüelas neurológicas de cinomose, nossos resultados também levantam questões importantes no que concerne a terapêutica com utilização de células tronco, visto que sugerem a necessidade de detecção de um possível fenótipo “mutator” em células a serem utilizadas em injeções terapêuticas, visando evitar a formação de neoplasia causada pelas células injetadas, principalmente quando os pacientes forem indivíduos de idade avançada.

Referências

- 1- Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 2006; 441(29):1080-1086
- 2- Vijg J, Calder RB. Transcripts of aging. *Trends in Genetics* 2004; 20(6):221-224
- 3- de Boer J, Andressoo JO, de Wit J, Huijmans J, Beems RB, van Steeg H, Weeda G, van der Horst GT, van Leeuwen W, Themmen AP, Meradji M, Hoeijmakers JH. Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. *Science* 2002; 296(5571): 1276-1279
- 4- Tosato M, Zamboni V, Ferrini A, Cesari M. The aging process and potential interventions to extend life expectancy. *Clin Interv in Aging* 2007; 2(3) 401–412
- 5- Hamilton WD. The molding of senescence by natural selection. *J Theor Biol* 1996; 12:12–45
- 6- Partridge L, Barton NH. Optimality, mutation and the evolution of ageing. *Nature* 1993; 362:305–311
- 7- Williams GC. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* 1957; 11: 398–411
- 8- Partridge L, Gems D. The evolution of longevity. *Curr Biol* 2002; 12(16): 544-546
- 9- Pan L, Xie T. Stem cell aging is controlled both intrinsically and extrinsically in the drosophila ovary. *Stem Cell* 2007; 1(4): 458-669

- 10- Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102(26): 9194-9199
- 11- Kenyon J, Gerson SL. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Research* 2007; 1–9
- 12- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-352
- 13- Martinez-Agosto JA, Mikkola HKA, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes & Dev* 2007; 21:3044-3060
- 14- Lojudice FH and Sogayar MC. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. *Ciênc Saúde Colet* 2008; 13(1): 19-22
- 15- Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, Takyia CM, Carvalho LP, Carvalho ACC, Santos RR. Transplanted bone marrow stem cell repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am. J. Path.* 2004; 164(2): 441-447
- 16- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV et al. Intracoronary human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2001; 126: 932-938
- 17- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang G et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 2001; 7:430-436

- 18- Fukada S, Miyagoe-Suzuki Y, Tsukihara H, Yuasa K, Higuchi S, Ono S, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H. Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *Journ Cell Sci* 2002; 115: 1285-1293

- 19- Yamakawa T, Kakinoki R, Ikeguchi R, Nakayama K, Morimoto Y, Nakamura T. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. *Cell Transp* 2007; 16: 811-822

- 20- El-Badri NS, Wang BY, Steele A, Cherry, Marikar Y, Mizobe K, good RA. Successful prevention of auto-immune disease by transplantation of adequate number of fully allogeneic hematopoietic stem cells. *Transplantation* 2000; 70:870-877

- 21- Traynor AE, Barr WG, Rosa RM, Rodriguez J, Oyama Y, Baker S et al. Hematopoietic stem cell transplantation for severe and refractory lupus. Analisis after five years and fifteen patients. *Arthr Rheum* 2002; 46:2917-2923

- 22- Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotech* 1996; 14: 1246-1251

- 23- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters* 1997; 407: 313-319

- 24- Riordan NH, Ichim TE, Min WP, Wang H, Solano F, Lara F, Alfaro M, Rodriguez JP, Harman RJ, Patel AN, Murphy MP, Lee RR, Minev B. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *Journ Transl Med* 2009; 7:29

- 25- Guo JK, Cheng EC, Wang L, Swenson ES, Ardito AT, Kashgarian M, Cantley LG, Krause DS. The commonly used b-actin-GFP transgenic mouse strain develops a distinct type of glomerulosclerosis. *Transg Res* 2007; 16:829–834

- 26- Goto H, Yang B, Petersen D, Pepper KA, Alfaro PA, Kohn DB, Reynolds CP. Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines. *Mol Canc Ther* 2003; 2: 911-917
- 27- Brito HFV, Corat MAF, Santos MR, Gilioli R, Passos LAC, Lancelloti M, Ferreira F, Li LM. Tratamento de sequelas neurológicas em cães, causadas por infecção pelo vírus da cinomose, através do transplante alogênico de células mononucleares de medula óssea. *Medvep* 2010; 8(24); 26-29
- 28- Sanchez O, Escobar JI, Yunis JJ. A simple G-banding technique. *Lancet* 1973 2(7823):269
- 29- Blackwell BN, Bucci TJ, Hart RW, Turturro A. Longevity, body weight and neoplasia in ad libitum fed and diet restricted C57Bl6 mice fed NIH open formula diet. *Toxicol Pathol* 1995; 23(5):570-582
- 30- Kurpisz M, Czepczyński R, Grygielska B, Majewski M, Fiszer D, Jerzykowska O, Sowiński J, Siminiak T. Bone marrow stem cell imaging after intracoronary administration. *Int Journ Cardiol*; 121(2):194-195
- 31- Srour EF, Jetmore A, Wolber FM, Plett PA, Abonour R, Yoder MC. Orschell-Traycoff. Homing, cell cycle kinetics and fate of transplanted hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2001; 15(11): 1681-1684
- 32- Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH, Drexler H. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111:2198-220
- 33- Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *PNAS* 2006; (103) 48:18238–18242

- 34- Erenpreisa J, Cragg MS Cancer: a matter of life cycle? *Cell Biol Int* 2007; 31: 1507 – 1510
- 35- Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IP. Genomic instability-the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 701 – 708
- 36- Burt R, Zhang H, Phear G, Meuth M. Conditional Mutator Phenotypes in hMSH2-Deficient Tumor Cell Lines. *Science* 1997; (277) 1523-1526
- 37- van Boxtel R, Toonem PW, van Roekel HS, Verheul M, Smits BMG, Korving J, de Bruin A, Cuppen E. Lack of DNA mismatch repair protein MSH6 in the rat results in hereditary non-polyposis colorectal cancer-like tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2008; (29):6 – 1290 –1297
- 38- Ripoll CB., Bunnell BA. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from eGFP transgenic and non-transgenic mice. *BMC Cell Biol* 2009; 10:3
- 39- Xie LN, Wang JM., Qiu HY., Gao L, Zhou H, Gong SL. Enrichment and biological characteristics of murine mesenchymal stem cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2007; 15(3):542-6
- 40- Drummond-Barbosa D. Stem Cells, Their Niches and the Systemic Environment: An Aging Network. *Genetics* 2008; 180: 1787–1797
- 41- Geiger H, Rennebeck G, Van Zant G. Regulation of hematopoietic stem cell aging in vivo by a distinct genetic element. *PNAS* 2005; 102 (14): 5102–5107