



- 1 » Caracterização da morfologia externa de fetos de paca
- 2 » Análise comparativa do número de corpos de neurônios em área do córtex cerebral de diferentes raças de cães
- 3 » Estudo histológico da glândula pineal de *Nasua nasua* (Quati) empregando microscopia de luz
- 4 » Análise macroscópica do aparelho reprodutor masculino do ouriço-cacheiro (*Coendou villosus*)
- 5 » Características de células fibroblast-like derivados do cultivo do saco vitelino em diferentes períodos gestacionais
- 6 » Suspeita da produção de  $\beta$ -Lactamase de espectro estendido (ESBL) Enterobactérias isoladas em caso de mastite ambiental
- 7 » Qualidade do leite de acordo com a instrução normativa 51: Contagem de células somáticas em amostras de leite bovino
- 8 » Estudo da pluripotencialidade do fígado fetal canino nos diferentes períodos gestacionais
- 9 » Influência do estresse causado pela tosquia e aumento de peso ao nascer de cordeiros (*Ovis aries*) - Resultados parciais
- 10 » Morfologia e viabilidade de oócitos ovinos para produção de embriões em laboratório
- 11 » Avaliação do ganho de peso diário de cordeiros segundo o manejo de desmame
- 12 » Incidência de endoparasitoses em ovinos da raça Santa Inês em função do horário de pastejo
- 13 » Leucemia canina: Casos diagnosticados no período de 2003 a 2006
- 14 » Técnica para cateterização do espaço subaracnóideo em ovinos
- 15 » Avaliação da adaptação de ovelhas ao manejo de ordenha mecânica através do comportamento

### ESTUDO DA PLURIPOTENCIALIDADE DO FÍGADO FETAL CANINO NOS DIFERENTES PERÍODOS GESTACIONAIS<sup>1</sup>

EDUARDO VIEIRA<sup>2</sup>, DANIELE DOS SANTOS MARTINS<sup>3</sup>, CRISTIANE VALVERDE WENCESLAU<sup>3</sup>, CARLOS EDUARDO AMBRÓSIO<sup>4</sup>, ANA FLÁVIA DE CARVALHO<sup>4</sup>, RICARDO ALEXANDRE ROSA<sup>5</sup>, MARIA ANGÉLICA MIGLINO<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Projeto de Pesquisa – Bolsa de Iniciação Científica FAPESP

<sup>2</sup> Graduando do 3º ano de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

<sup>3</sup> Pós-graduando da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo/SP.

<sup>4</sup> Professores do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

<sup>5</sup> Apoio Técnico do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos. Av. Dr. Octávio da Silva Bastos, s/nº, São João da Boa Vista/SP, 13874-159.

<sup>6</sup> Professora Titular da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo/SP.

**RESUMO:** O estudo da capacidade de diferenciação de algumas células, denominadas células-tronco ou “stem cells”, representa uma importante ferramenta para o entendimento e desenvolvimento de novas pesquisas, assim como, um enorme potencial para a descoberta de tratamentos de inúmeras doenças. Estas células-tronco embrionárias são pluripotentes, capazes de multiplicação e diferenciação, podendo se proliferar em vários tipos celulares dependendo das condições de cultivo. A identificação de fatores que levam ao direcionamento do processo de diferenciação celular permitirá que, a partir de células-tronco embrionárias possibilite que o cultivo celular seja realizado sob forma controlada dentre os os mais diferentes tipos celulares, tornando viável a bioengenharia. Neste trabalho, foram estudadas células de fígado fetal canino. O fígado executa importante função hematopoiética durante o desenvolvimento fetal, enquanto no adulto, possui uma multiplicidade de funções como: excreção, secreção de bile, armazenamento, síntese e biotransformação. Os fígados, para estudo, foram obtidos a partir de fetos com idade gestacional média de 25, 35, 45 e 55 dias, oriundos de fêmeas de cães sem raça definida que sofreram ovariosalpingohisterectomia. Estas células de fígado fetal canino foram analisadas histologicamente, para a caracterização da diferenciação celular, mediante métodos histológicos previamente estabelecidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** fígado, embrião, células-tronco, pluripotencialidade

## INTRODUÇÃO

Phemister (1974) dividiu o desenvolvimento pré-natal dos cães em três períodos: período do ovo, este inicia-se com a fertilização do oócito e vai até o momento em que o blastocisto atinge o útero (2º ao 17º dia); período do embrião o qual começa com a implantação do blastocisto e engloba todo o período embrionário (18º ao 35º dia); e o período do feto, que é caracterizado pelo surgimento da aparência e característica do cão e quando ocorre a maior parte do crescimento (36º dia até o final da gestação).

A idade gestacional em cães pode ser estimada pelo método de Crown Rump (CR), baseando-se no comprimento crânio-caudal (NODEN & LAHUNTA, 1990).

No feto, o fígado é excepcionalmente volumoso, ocupando um amplo espaço da cavidade abdominal (KÖNIG & LIEBICH, 2004). Os hepatócitos compreendem aproximadamente 80% do total da massa do fígado sendo o restante composto principalmente por células epiteliais biliares e células de Kupffer (LAVON et al., 2005). Nos vertebrados, o fígado apresenta uma disposição primária baseada em hepatócitos, canalículos biliares e sinusóides. O arranjo do parênquima hepático consiste de uma veia central e de canalículos biliares envoltos por células hepáticas (ROSS et al., 2003).

O fígado em desenvolvimento é ricamente vascularizado por sinusóides venosos em torno dos cordões de hepatócitos. Estes vasos sanguíneos se formam a partir do mesênquima do *septum transversum*, das veias umbilicais e vitelinas que atravessam o *septum* alcançando o seio venoso do coração (NODEN & LAHUNTA, 1990).

Em um estudo histológico do desenvolvimento do fígado de rato durante o período embrionário realizado por GODLEWSKI et al. (1997), foi observado em embriões com 13 dias de idade, um fígado bem desenvolvido, contendo a tríade portal com os hepatócitos arranjados de forma compactada ao redor dos vasos sanguíneos. Também foram observados que os embriões com 14 dias de idade, apresentavam um parênquima compacto com hepatócitos densamente organizados e, aos 16 dias de idade, o fígado era composto por sinusóides venosos entre os cordões.

O fígado fetal é considerado um importante órgão hematopoiético durante o desenvolvimento embrionário e fetal, sendo que esta função é bem característica no final da gestação. Ao nascimento o fígado sofre mudanças morfológicas e funcionais, significativas; ocorre um aumento relativo na proporção de hepatócitos (número e volume) e há uma queda na população de células hematopoiéticas residentes no fígado. (BADYLAK, 2002).

Durante desenvolvimento hepático, o fígado é composto principalmente por um tipo celular o qual é comumente referido como, hepatoblastos (LEMAIGRE & ZARET, 2004). Há indícios que estas células são bipotenciais, com capacidade de se diferenciarem em hepatócitos ou células do ducto biliar (SHIOJIRI et al., 2001). Segundo SHIOJIRI et al. (1991), os hepatoblastos são descritos como a origem das células progenitoras do fígado durante o desenvolvimento, pois são responsáveis pela diferenciação durante a organogênese hepática. Em ratos os hepatoblastos sofrem uma maturação gradual em hepatócitos maduros, ou células dos ductos biliares intra e extrahepáticos. DUNCAN, (2003) menciona que esta diferenciação dos hepatoblastos em hepatócitos é um processo gradual, levando vários dias durante o desenvolvimento embrionário. Estas células ainda podem sofrer maturação tornando-se células ovais no fígado adulto.

O potencial de diferenciação de hepatócitos imaturos isolados de fígado embrionário e fetal, demonstrou que estas células são bipotenciais dependendo das condições de cultivo. Portanto, estes hepatócitos imaturos com alta capacidade proliferativa poderiam ser precursores de células-tronco hepáticas adultas (FIEGEL et al., 2003).

Segundo FIEGEL et al. (2003), com base nos seus estudos relacionados ao desenvolvimento primário do fígado, apontam que os hepatoblastos e ou hepatócitos imaturos possuem propriedades de células-tronco. Apesar de que, a grande maioria destas células se diferenciem em hepatócitos maduros e células do ducto biliar no organismo in vivo, há uma pequena proporção de células que atuam como célula-tronco.

Com base em todas as evidências relatadas em relação à pluripotencialidade do fígado tanto fetal como o adulto o presente trabalho objetiva investigar a morfologia do fígado fetal, acompanhando todo seu desenvolvimento; fornecendo subsídios morfológicos para as pesquisas de células-tronco.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A realização deste trabalho contou com a integração dos centros de pesquisas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do Departamento de Ciências Morfológicas da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB).

Foram utilizados, para o estudo histológico, 12 fetos de cães sem raça definida, sendo: 3 fetos com idade gestacional de 25 dias, 3 fetos com 35 dias, 3 fetos com 45 dias e 3 fetos com 55 dias. Os fetos foram coletados de animais submetidos a ovariossalpingohisterectomia no Hospital Veterinário da UNIFEOP, em São João da Boa Vista – SP, assim como oriundos de Centros de Controle de Zoonoses, localizados em São João da Boa Vista e cidades vizinhas.

De acordo com a idade gestacional encontrada, estabelecidas por meio do método de Crown-Rump (CR), os fetos foram retirados através de abertura cirúrgica do útero. Após a coleta, os fetos selecionados foram processados de acordo com as técnicas histológicas previamente determinadas. Para a investigação histológica, as células do fígado fetal foram separadas, por meio da secção do fígado, e os fragmentos foram submersos em solução aquosa de paraformaldeído a 4% em tampão sódio-fosfato (PBS). Os fragmentos foram desidratados com séries de álcoois em concentrações crescentes (70% a 100%) e diafanizados em xilol, seguido de inclusão em paraplast (Paraplast Embedding Media-Paraplast Plus, Oxford Lab., USA). Posteriormente, secções de 4-5 micrômetros foram realizadas em micrótomo. Os cortes provenientes foram corados com HE – Hematoxilina-Eosina, para análise celular.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estimativa da idade gestacional dos fígados fetais caninos foi realizada através do método de Crown Rump (CR), como descrito por EVANS E SACK (1973); entretanto em nossos resultados observamos uma grande variação no tamanho dos fetos com idades de 25 e 35 dias de gestação, sendo que os fetos apresentaram aproximadamente o dobro do tamanho estipulado nesta literatura estimadas. Todavia, para os períodos de 45 e 55 dias de gestação, o tamanho dos animais apresentou total confluência com nossos resultados. Os autores também não se especificaram no seu trabalho, o tamanho da mãe dos filhotes e o número de filhotes por ninhada, sendo esta mais uma variável para a estipulação exata da idade fetal, sendo estes dados conferidos por nós.

O período fetal caracteriza-se pelo surgimento da aparência e característica do animal, em nosso estudo essa fase deu-se a partir do 45º dia de gestação diferentemente do relatado por Phemister (1974), que descreve essa fase a partir do 36º dia de gestação em cães.

Os fígados fetais caninos se apresentaram extremamente volumosos assim como descrito por KÖNIG e LIEBICH (2004) em mamíferos, ocupando um amplo espaço da cavidade abdominal e altamente vascularizado por sinusóides venosos, como relatado por NODEN e LAHUNTA (1990).

Nas diferentes idades gestacionais estudadas, o fígado canino sofreu mudanças morfológicas e funcionais durante a fase fetal. Estas mudanças consistem em um proporcional aumento e hepatócitos e na organização e disposição dos hepatócitos, dados estes também como mencionados por BADYLAK et al. (2002) para cães e DUNCAN (2003) para mamíferos

Concordamos com LAVON et al. (2005), quando relatam uma grande quantidade de hepatócitos em todas as idades gestacionais, constituindo uma alta porcentagem da massa total do fígado.

Histologicamente, o fígado fetal canino com idade gestacional de 25 dias apresentou à tríade portal, assim como, a veia centrolobular com os hepatócitos desarranjados ao seu redor. Aos 35 e 45 dias, observamos a tríade portal, os sinusóides e a veia centrolobular, com a reorganização dos hepatócitos, como descrito por ROSS et al. (2003) em vertebrados. Com 55 dias notificamos a formação de cordões celulares ao redor da veia centrolobular como sugerido por Godlewski et al. (1997) em ratos com 16 dias de gestação.

Assim como sugerido por SHIOJIRI et al. (1991) GERMAIN et al. (1988), FIEGEL et al. (2003) para ratos, SHIOJIRI et al. (2001), WEISS et al. (2003), LEMAIGRE & ZARET (2004) para camundongos, DUNCAN (2003) para mamíferos, as células observadas no fígado fetal canino, referidas como hepatócitos podem ser consideradas como hepatoblastos ou hepatócitos imaturos, pois estas células são encontradas durante a fase de desenvolvimento embrionário e fetal, assim como descrita pelos autores.

## CONCLUSÕES

Os resultados parciais nos permitem concluir que o fígado canino sofre intensas mudanças morfológicas e funcionais durante a toda a fase fetal, esta característica está diretamente relacionada a pluripotencialidade das células hepáticas, o que indica a grande capacidade de replicação e crescimento celular, sendo este um novo modelo que fornecerá subsídios para os estudos de terapia celular e células-tronco.

## REFERÊNCIAS

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

- DUNCAN, S.A. Mechanisms controlling early development of the liver. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 1, p.19-33, 2003.
- FIEGEL, H.C.; KLUTH, J.; LIOZNOV, M.V.; HOLZHÜTER, S.; FEHSE, B.; ZANDER, A.R.; KLUTH, D. Hepatic lineages isolated from developing rat liver show different ways of maturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 305, p.46-53, 2003.
- GERMAIN, L.; BLOUIN, M.J.; MARCEAU, N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determinants by the differential expression of cytokeratins, alfa-fetoprotein, ALB, and cell surface-exposed components. **Cancer Research**, v. 48, p.4909-4918, 1988.
- GODLEWSKI, G.; GAUBERT-CRISTOL, R.; ROUY, S.; PRUDHOMME, M. Liver development in the rat and in man during the embryonic period (carnegie stages 11-23). **Microscopy Research and Technique**, v. 39, n. 4, 314-327, 1997.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. **Anatomia dos Animais Domésticos: texto e atlas colorido**. ARTMED, v.2, 2004.
- LAVON, N.; BENVENISTY, N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, p.1193-1202, 2005.
- LEMAIGRE, F.; ZARET, K.S. Liver development update: new embryo models, cell lineage control and morphogenesis. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 14, n. 15, p.582-590, 2004.
- NODEN, D.M.; LAHUNTA, A. **Embriologia de los Animales Domésticos**. Zaragoza: Acriba. cap.16, 1990.
- PHEMISTER, R.D. Nonneurogenic reproductive failure in the bitch. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 4, n. 3, p.573-586, 1974.
- ROSS, M.; KAYE, G.; PAWLINA, W. **Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular**. 4 ed. Buenos Aires: Panamericana, 2003.
- SHIOJIRI, N.; INUJIMA, S.; ISHIKAWA, K.; TERADA, K.; MORI, M. Cell lineage analysis during liver development using the spf(ash)-heterozygous mouse. **Laboratory Investigation**, v. 81, n. 1, p.17-25, 2001.
- SHIOJIRI, N.; LEMIRE, J.M.; FAUSTO, M. Cell lineages and oval cells progenitors in rat liver development. **Cancer Research**, v. 51, p. 2611-2620, 1991.
- WEISS, M.C.; STRICK-MARCHAND, H. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells in vitro. **Seminars in Liver Disease**, v. 23, n. 4, p.313-324, 2003.