



**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
FIOCRUZ**

Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - Rua Waldemar Falcão, 121- Brotas
40.295-001 Salvador-BA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Microquimerismo fetal em fêmeas de camundongos
infectadas por *Trypanosoma cruzi*.**

ADRIANA LIMA DE OLIVEIRA

Salvador - BA
2008



Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

FIOCRUZ

Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz - Rua Waldemar Falcão, 121- Brotas
40.295-001 Salvador-BA

Microquimerismo fetal em fêmeas de camundongos infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

ADRIANA LIMA DE OLIVEIRA

Orientadora: Dr^a MILENA BOTELHO PEREIRA SOARES

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz
com objetivo de obtenção do título de
mestre em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

Salvador - BA
2008

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ
Salvador-Bahia



**Microquimerismo fetal em fêmeas de camundongos infectadas
por *Trypanosoma cruzi*.**

Microquimerismo fetal em fêmeas de camundongos infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

Adriana Lima de Oliveira

Comissão Examinadora

Dr.

Dr

Dra. Milena Botelho Pereira Soares
CPqGM - FIOCRUZ

Aos meus pais, meus alicerces

AGRADECIMENTOS

Deus

Amor e fonte de toda inspiração.

Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Pela orientação, dedicação e paciência, contribuindo de forma significativa na minha formação profissional.

Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos

Pela oportunidade, confiança e orientações sugeridas para realização deste trabalho.

Dra. Cristiane Monteiro

Pela infinita ajuda, paciência e dedicação na elaboração deste trabalho.

Minha família

Pelas palavras de conforto e incentivo.

Raimundo Coutinho Júnior

Eterno companheiro nos momentos de alegria e tristeza

Meus amigos Gisele, André, Marcos, Carine e Nice

Pelos momentos de descontração e por toda ajuda prestada na elaboração deste trabalho.

Aos colegas do LETI, em especial Liu, Juliana e Ricardo

Por toda ajuda prestada, pra execução deste trabalho.

CPqGM – FIOCRUZ/BA

Pela estrutura e recursos prestados que possibilitam a formação de novos profissionais.

CAPES/FIOCRUZ

Pela bolsa concedida

RESUMO

O papel da persistência de células fetais no organismo materno pós-gestação (microquimerismo materno-fetal) é ainda pouco estudado. Para investigar o potencial de reparo tecidual destas células em lesões de coração e músculo esquelético, avaliamos a presença de células fetais nestes órgãos durante a infecção aguda por *T. cruzi* de fêmeas parturientes que tiveram filhotes GFP⁺. Fêmeas C57Bl/6 foram infectadas com tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* no oitavo dia pós-parto e sacrificadas no 30º dia pós-infecção. A presença de células fetais GFP⁺ foi avaliada por citometria de fluxo (sete dias pós-parto), por imunofluorescência utilizando anticorpos anti-GFP e por PCR em tempo real usando sondas específicas para o gene GFP de origem fetal. Células fetais GFP⁺ foram detectadas na circulação de 20% das fêmeas analisadas. Em secções de corações e de músculo esquelético de fêmeas infectadas, detectaram-se células fetais GFP⁺, algumas das quais expressando miosina, um marcador de células de músculo estriado. No fígado a presença de células GFP⁺ também foi detectada, porém estas não apresentaram expressão de albumina. Já em secções de coração, músculo esquelético e fígado de fêmeas saudáveis com fetos fluorescentes não foram encontradas células GFP⁺. A presença do transgene *gfp* de origem fetal, avaliada pela metodologia de PCR em tempo real, é aumentada pela infecção por *T. cruzi* no coração e músculo esquelético, em comparação com fêmeas parturientes saudáveis. A presença do transgene *gfp* de origem fetal é mais elevada no coração do que no músculo esquelético de fêmeas infectadas. Em conclusão, os resultados sugerem que células fetais participam do processo de reparo de lesões do coração e do músculo esquelético, pelo menos no modelo de infecção aguda por *T. cruzi*.

ABSTRACT

The role of fetal cells persistence in maternal organism after gestation (fetal-maternal microchimerism) is poorly understood. To investigate the regenerative potential of these cells in heart and muscle lesions, we evaluated the presence of fetal cells in these organs during the acute infection by *T. cruzi* of parturient female mice which had GFP⁺ puppies. C57Bl/6 female mice were infected with trypomastigotes of Colombian strain *T. cruzi* on the 8th day post-partum, and sacrificed on the 30^o day post-infection. The presence of GFP⁺ fetal cells was evaluated by flow cytometry (7 days post-partum) and by immunofluorescence using anti-GFP specific antibodies and by real time PCR using specific probes for GFP gene of fetal origin 30 days post-partum. GFP⁺ fetal cells were detected in the circulation in 20% of the analyzed females. GFP⁺ cells were also detected in heart and striated muscle section of *T. cruzi*-infected mice, some of which expressed myosin, a marker of striated muscle cells. In the liver, GFP⁺ cells were also found, but none co-expressing albumin. In sections of heart, striated muscle and liver of healthy chimeric females, we did not find GFP⁺ cells. The presence of *gfp* transgene of fetal origin, evaluated by real time PCR, was increased by infection with *T. cruzi* in the heart and skeletal muscle, compared to healthy parturient females. The presence of *gfp* transgene of fetal origin is higher in the heart than in the striated muscle of infected females. In conclusion, our results suggest that fetal cells participate in the regenerative process in the heart and striated muscle, at least in the model of acute *T. cruzi* infection.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| CCl₄ | Tetracloroeto de carbono |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| FISH | Técnica de hibridização in situ |
| GFP | Proteína verde fluorescente |
| LLCMK2 | Células epiteliais de rim de <i>Macacca Mulata</i> |
| MI | Mãe infectada |
| MN | Mãe não infectada |
| mL | Mililitros |
| O.C.T | Optima cutting temperature |
| pb | Pares de Base |
| PCR | Reação de polimerase em cadeia |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| µg | Microgramas |
| µL | Microlitros |
| VI | Virgem infectada |

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 REVISÃO DA LITERATURA

| | | |
|-----|---|--|
| 1.1 | CÉLULAS-TRONCO | |
| 1.2 | CÉLULAS TRONCO E MEDICINA REGENERATIVA | |
| 1.3 | MICROQUIMERISMO FETAL | |
| 1.4 | IMPLICAÇÕES DO MICROQUIMERISMO FETAL | |
| 1.5 | ESTUDO DO MICROQUIMERISMO EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO | |
| 1.6 | MODELO MURINO NA INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> | |

2 JUSTIFICATIVAS

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

3 OBJETIVOS

| | | |
|-----|-----------------------|--|
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | |

4 MATERIAL E MÉTODOS

| | | |
|------|---|--|
| 4.1 | ANIMAIS | |
| 4.2 | ACASALAMENTO | |
| 4.3 | QUANTIFICAÇÃO DE FILHOTES GFP+ | |
| 4.4 | COLETA DE SANGUE | |
| 4.5 | OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO | |
| 4.6 | INFECÇÃO POR <i>T. cruzi</i> | |
| 4.7 | PARASITEMIA | |
| 4.8 | GRUPOS EXPERIMENTAIS | |
| 4.9 | DESENHO EXPERIMENTAL | |
| 4.10 | SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS | |
| 4.11 | ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA | |
| 4.12 | IMUNOFLUORESCÊNCIA | |
| 4.13 | EXTRAÇÃO DE DNA | |
| 4.14 | PCR EM TEMPO REAL | |
| 4.15 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | |

5 RESULTADOS

| | | |
|--|------------------|--|
| | TABELA 1 | |
| | FIGURA 1 | |
| | FIGURA 2 | |
| | FIGURA 3 | |
| | FIGURA 4 | |
| | FIGURA 5 | |
| | FIGURA 6 | |
| | FIGURA 7 | |
| | FIGURA 8 | |
| | FIGURA 9 | |
| | FIGURA 10 | |
| | FIGURA 11 | |
| | FIGURA 12 | |
| | FIGURA 13 | |
| | FIGURA 14 | |

6 DISCUSSÃO

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

7 CONCLUSÃO

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

8 REFERÊNCIAS

| | | |
|--|--|--|
| | | |
|--|--|--|

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CÉLULAS-TRONCO

As principais características que definem uma célula-tronco é a capacidade de se auto-renovar, de gerar células filhas com características semelhantes à célula mãe, e diferenciar-se em diversos tipos celulares (VERFAILLIE, 2002).

Quanto à sua natureza, as células-tronco podem ser embrionárias (derivadas da massa interna do blastocisto no estágio de pré-implantação) e células-tronco adultas que residem em tecidos diferenciados (STOCUM, 2001). Células-tronco adultas podem ser extraídas de diversos tecidos, tais como: medula óssea, sangue, fígado, sistema nervoso, epitélio, cordão umbilical, placenta, etc. Estas células são consideradas células-tronco pela sua capacidade de diferenciação, embora esta seja mais limitada do que a das embrionárias, não tendo, por tanto, capacidade de formar todos os tipos de tecido de um indivíduo (FRISCH *et al.* 2007).

As células-tronco apresentam potencial de diferenciação variável, permitindo desta forma serem classificadas em três tipos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Células-tronco totipotentes estão presentes no zigoto nas duas primeiras divisões mitóticas e são capazes de formar todos os tecidos do embrião e a placenta. Células-tronco pluripotentes são originadas da massa celular interna do blastocisto e podem originar os três folhetos germinativos, exceto os anexos embrionários. Células-tronco com potencial de diferenciação restrita são designadas multipotentes (células-tronco adultas ou progenitoras) e estão presentes nos diversos tecidos do indivíduo adulto (ALISSON *et al.*, 2002; SERAKINCI & KEITH, 2006).

A medula óssea é fonte de células-tronco hematopoiéticas que podem originar qualquer tipo celular do tecido sanguíneo, e de células-tronco mesenquimais que estão presentes também em muitos tecidos humanos e são capazes de originar tipos celulares de diversos tecidos, incluindo medula, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo (POUNTOS & GIANNOUDIS., 2005).

1.2 CÉLULA-TRONCO E A MEDICINA REGENERATIVA

A medicina regenerativa está associada à terapia celular, à engenharia de tecidos e à utilização de órgãos bioartificiais que visam à regeneração ou remodelamento de tecidos na tentativa de reparar, substituir, manter ou melhorar o funcionamento de tecidos ou órgãos (MURACA *et al.*, 2007).

A terapia celular está ligada a processos de substituição e reparo de tecidos e órgãos, e sua eficácia é dependente da seleção, identificação, expansão e manipulação de células *in vitro* (IKADA, 2006). As células-tronco são candidatas ideais para uso nesta terapia, devido ao seu potencial de diferenciação ou plasticidade em produzir progênes que expressam fenótipos maduros, tendo como exemplo as células-tronco adultas mesenquimais que podem originar células ósseas, adipócitos, células musculares e cartilagens. (SERAKINCI & KEITH, 2006).

1.3 MICROQUIMERISMO FETAL

A quimera é um organismo que apresenta duas ou mais populações de células geneticamente diferentes originadas de zigotos distintos. O termo quimera foi originado da criatura mitológica *Chimera*, a qual é descrita como uma criatura com cabeça de leão, corpo de capricórnio e cauda de serpente. Na medicina, o termo quimerismo é utilizado quando um

indivíduo contém populações de células originadas a partir de outros indivíduos, ou seja, células não-próprias. O quimerismo é herdado ou adquirido através da infusão de células hematopoiéticas alogênicas durante o transplante ou transfusão sanguínea (BARCELOS & ANDRADE, 2004).

O termo microquimerismo refere-se à presença em baixos níveis de células fetais em tecidos maternos durante e após a gestação, em consequência do tráfico bi-direcional de células maternas e fetais através da placenta (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2005a). O tráfico de células fetais na circulação materna inicia-se aproximadamente na 4ª semana de gestação. A frequência com que as células fetais podem ser detectadas no sangue de mulheres grávidas aumenta com a idade gestacional. No sexto mês de gestação o número de células fetais na circulação materna é cerca de 1-6 células/mL de sangue venoso materno. Após trinta e seis semanas de gestação, 100% das mulheres grávidas apresentam células fetais circulantes e, após o parto, este número decresce rapidamente (KHOSROTEHRANI & BIANCHI, 2005b).

A transferência de células fetais no final da gravidez encontra-se aumentada, e alguns pesquisadores têm demonstrado que mulheres com histórico de aborto apresentam alta frequência de microquimerismo de células fetais (PERTL & BIANCHI, 2001).

1.4 IMPLICAÇÕES DO MICROQUIMERISMO FETAL

Células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais e progenitoras de origem fetal têm sido descritas na placenta e na circulação de mulheres gestantes. Estudos recentes indicam que as células fetais progenitoras persistem após a gestação e residem em tecidos maternos lesados, adotando vários fenótipos (HUU *et al.*, 2006).

O papel das células fetais no organismo materno ainda é desconhecido e diversos trabalhos têm sido realizados visando entender as implicações da presença destas células nos mecanismos de reparo tecidual materno e no desenvolvimento de doenças autoimunes.

A possibilidade de células-tronco circulantes estarem envolvidas nos mecanismos de reparo tecidual tem sido abordada. Estas podem aparentemente encontrar um nicho apropriado no organismo do novo hospedeiro (mãe ou feto). O nicho apropriado destas células nos tecidos maternos parece depender do tipo celular – células-tronco epiteliais necessitam de um nicho epitelial, células-tronco linfóides necessitam de um nicho imunológico (HALL; 2007). As células-tronco podem, ao longo do tempo, sofrer mitose no hospedeiro no qual residem e produzir o que é conhecido como microquimerismo na circulação ou nos tecidos (HALL; 2007).

Em mulheres com histórico de filhos, células fetais masculinas podem expressar marcadores específicos de células epiteliais, leucócitos ou hepatócitos. Em um estudo foi examinado o fenótipo de células fetais microquiméricas em pacientes do sexo feminino que apresentaram alto número de células fetais pelas técnicas de hibridização *in situ* utilizando sondas específicas para o cromossomo Y e imunomarcadores para identificar o fenótipo destas células. Todas as mulheres incluídas no estudo apresentavam determinada patologia no tecido avaliado. Em tecidos epiteliais, tais como a tireóide, a vesícula, o cérvix e o intestino, 14-60% das células fetais apresentaram citoqueratina. Outras células fetais microquiméricas

nestes tecidos expressaram CD45, um antígeno pan-leucocitário, indicando uma provável origem hematopoiética. Além disso, 90% das células fetais detectadas nos tecidos maternos hematopoiéticos, como baço e linfonodo, expressaram CD45. Em adição, em seções contendo tecido da tireóide lesado e sadio, as células fetais expressavam citoqueratina mais freqüentemente se elas estavam em áreas lesadas da tireóide, sugerindo que células fetais, possivelmente de origem hematopoiética, colonizam locais de lesão em tecido maternos (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2004a).

Johnson e colaboradores (2002), estudando o microquimerismo fetal em uma mulher parturiente com hepatite C que não foi submetida à transfusão sanguínea, observaram um alto número de células masculinas fetais no fígado pelos métodos de FISH e PCR, o que sugere que essas células masculinas foram originadas de uma das gestações.

Enquanto que algumas evidências sugerem um potencial de reparo tecidual das células fetais no organismo materno, a alta freqüência de certas doenças autoimunes em mulheres comparadas aos homens levou à geração da hipótese do “microquimerismo maligno”. Esta hipótese sugere que a persistência de células fetais no organismo materno após a gravidez leva a uma resposta semelhante à doença do hospedeiro *versus* enxerto em que a resposta imune materna a essas células pode contribuir para a maior incidência de doenças autoimunes em mulheres (JOHNSON & BIANCHI; 2004).

O primeiro estudo que investigou o microquimerismo fetal em doenças autoimunes foi realizado em mulheres com esclerose sistêmica. Este estudo foi baseado inicialmente nas observações incluindo semelhanças clínicas entre a esclerose sistêmica e a doença do enxerto *versus* hospedeiro e a incidência aumentada de esclerose em mulheres pós-idade reprodutiva. Neste ensaio, a presença de DNA fetal masculino foi avaliada no sangue periférico de mulheres saudáveis e com esclerose sistêmica, ambas com histórico de filhos do sexo masculino. A concentração de DNA masculino foi significativamente mais alta em mulheres

com esclerose, comparadas com as de mulheres sadias (NELSON *et al.*, 1998). Na autópsia de cinco mulheres com esclerose sistêmica deste estudo, células de cariótipo masculino foram detectadas no pulmão, rim, fígado, adrenal e linfonodos de algumas pacientes com altos números de células fetais, e principalmente no baço, sendo estas pacientes com esclerose sistêmica parturientes. Em oposição, nenhuma célula masculina foi encontrada em amostras de tecidos de mulheres sadias (ARLETT *et al.*, 1998). Em um estudo experimental, fêmeas de camundongos paridas tratadas com cloreto de vinil, um agente associado à esclerose sistêmica apresentaram números elevados de células fetais correlacionados ao grau de fibrose dérmica e esplenomegalia acentuada (CHRISTNER *et al.*, 2000).

A partir desta hipótese, diversos pesquisadores estudaram a participação de células fetais nos órgãos de mulheres acometidas de doenças autoimunes. Através da técnica de FISH utilizando sondas específicas para detecção do cromossomo Y ou antígenos leucocitários humanos de origem paterna, células fetais foram detectadas em pacientes com histórico de fetos masculinos, portadoras da síndrome de Sjogren (KUROKI *et al.*, 2002; TODA *et al.*, 2001), lúpus eritematoso sistêmico, cirrose biliar primária (INVERNIZZI *et al.*, 2000), tireoidite de Hashimoto (KLINTSCHAR *et al.*, 2006) e esclerose sistêmica (LAMBERT *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 1999).

1.5 ESTUDO DO MICROQUIMERISMO EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Animais de laboratório, tais como ratos e camundongos, apresentam placentação diferente dos seres humanos. No entanto, estes animais têm sido muito utilizados na avaliação do microquimerismo por serem pequenos, de fácil manuseio, ciclo reprodutivo curto, com tempo de gestação de 19 a 21 dias, o que permite a rápida obtenção de resultados experimentais (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2004b). Nos animais de laboratório, o histórico da gravidez pode ser monitorado através do acasalamento e os casais podem ser selecionados

baseados no background genético. Nos modelos experimentais, todos os tecidos maternos podem ser avaliados, permitindo a utilização de diversos testes analíticos na pesquisa do microquimerismo (JOHNSON & BIANCHI; 2004).

Nos últimos anos, camundongos transgênicos para genes repórter têm sido utilizados por diversos pesquisadores; e estes roedores têm sido uma poderosa ferramenta no estudo do microquimerismo fetal. Nos acasalamentos de machos transgênicos com fêmeas do tipo selvagem (não transgênica), as células de fetos transgênicos podem ser facilmente rastreadas como um marcador fetal na circulação e órgãos maternos (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2004b).

Ratos e camundongos modificados geneticamente para expressar a proteína verde fluorescente “aumentada” (*enhanced green fluorescent protein* - EGFP) têm sido utilizados no principal modelo experimental transgênico para avaliação do tráfico de células fetais no organismo materno. A transcrição do gene da EGFP está sob o controle do promotor de β actina de galinha ligado ao *enhancer* do citomegalovirus. Todos os tecidos desta linhagem transgênica, com exceção dos pêlos e eritrócitos, são fluorescentes verdes sob excitação da luz ultravioleta. A utilização do EGFP como gene repórter dispensa a introdução de substrato na revelação do transgene, constituindo uma vantagem, visto que outros genes repórter comumente necessitam de substrato para visualização do produto dos transgenes como genes da beta-galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, cloranfenicol acetiltransferase e beta glucoranidase (OKABE *et al.*, 1997).

O uso de ratos e camundongos transgênicos para GFP elimina a limitação do gênero fetal encontrada em humanos e macacos Rhesus no estudo do microquimerismo fetal, devido à facilidade na distinção entre as células fetais e maternas (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2004b).

Um estudo de células fetais durante e após a gestação foi realizado em fêmeas de camundongos por Khosrotehrani e colaboradores (2005a). Estes autores estudaram o microquimerismo fetal em acasalamentos congênicos e alogênicos utilizando fêmeas de

camundongos C57Bl/6 e DBA/2J, acasaladas com machos C57Bl/6 EGFP⁺. Estas fêmeas foram sacrificadas durante a gestação e em intervalos diferentes pós-parto. A pesquisa de células fetais GFP⁺ foi avaliada por PCR em tempo real e por imunofluorescência. Durante a gestação, células fetais foram detectadas em todos os órgãos de mães que tiveram fetos GFP⁺, ocorrendo maior frequência de células fetais no pulmão, comparado com outros órgãos. Depois do parto, a frequência de células fetais decresceu e o microquimerismo fetal não foi observado no período de dois a três semanas pós-parto.

A presença de DNA fetal no plasma de camundongos foi detectada nas três semanas de gestação, ocorrendo um aumento na última semana. Após o parto, o DNA fetal não foi detectado pela técnica de PCR em tempo real. Estes achados demonstram que o microquimerismo fetal também se encontra na circulação de fêmeas de camundongos, semelhantemente aos que ocorrem em humanos (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2004b).

A presença de células fetais de cariótipo XY no fígado de mulheres com hepatite C levou alguns pesquisadores a estudar o microquimerismo fetal em diferentes modelos de lesão hepática (Jhonson *et al.*, 2002).

Em um dos estudos, o microquimerismo fetal foi avaliado em um modelo de lesão renal e hepática. Neste modelo, ratas acasaladas com ratos transgênicos para GFP foram tratadas com tetracloreto de carbono e gentamicina pós-parto, induzindo lesões hepática e renal. Estes autores demonstraram a presença de células fetais GFP⁺ no fígado e rim pelas técnicas de imunofluorescência e PCR em tempo real, mas células fetais GFP não foram encontradas no fígado e rim saudáveis de ratas paridas, sugerindo que células fetais podem estar envolvidas no processo de reparo tecidual materno (WANG *et al.*, 2004).

Em outro estudo, fêmeas de camundongos C57Bl/6, acasaladas com machos transgênicos para EGFP, foram induzidas à lesão hepática pós-parto por tetracloreto de carbono (CCl₄) ou hepatectomia parcial. As fêmeas foram sacrificadas com quatro ou oito

semanas pós-lesão e células fetais foram detectadas em maior proporção no fígado lesado por CCl₄ após oito semanas. E também detectadas por imunofluorescência. Estes resultados sugerem que estas células podem participar no processo de reparo tecidual (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2007).

Durante a gestação de camundongos, células fetais podem ser recrutadas em áreas de inflamação no organismo materno além de participar na formação do endotélio de vasos sanguíneos. A utilização de técnicas sensíveis como PCR em tempo real demonstrou em um estudo que células fetais são detectadas em quantidades elevadas nos tecidos inflamados de fêmeas gestantes comparadas com tecidos saudáveis, onde ocasionalmente estas células também podem estar presentes. A localização e a morfologia destas células foram determinadas por hibridização *in situ* (FISH) com sondas específicas para o cromossomo Y e imunofluorescência com anticorpos anti-GFP. Ambas as técnicas demonstraram que células fetais podem colonizar áreas de infiltrado inflamatório ou paredes do vaso sanguíneo (HUU *et al.*, 2007).

A capacidade das células fetais em atravessar a barreira hematoencefálica foi estudada por Tan e colaboradores (2005). Estes autores demonstraram que as células fetais podem entrar na circulação materna e no cérebro, e quando este é lesado, essas células preferencialmente migram para a região lesionada e algumas destas células podem expressar marcadores imunistoquímicos característicos de células nervosas.

O estudo do microquimerismo fetal em modelos experimentais de doenças infecciosas não foi realizado até o momento, e o papel destas células em tecidos lesados por patógenos constitui uma poderosa ferramenta no estudo destas células.

1.6 MODELO MURINO DA INFECÇÃO POR *T. CRUZI*

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma zoonose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (POWELL & WASSOM, 1993). Em termos de saúde pública, e impacto econômico, a doença de Chagas é a doença parasitária mais importante na América Latina (MILES, FELICIANGELI & ARIAS, 2003), afetando cerca de 16 a 18 milhões de pessoas no mundo e estima-se que cerca de 25% esteja sob o risco de adquirir a doença (WHO, 2005).

O camundongo tem sido o modelo experimental mais utilizado em estudos dos mecanismos patológicos da doença de Chagas. No modelo murino o desenvolvimento da doença é influenciado pelo *background* genético do hospedeiro e pela cepa do parasito. O modelo murino permite o controle de fatores ambientais como status do parasito, dose e rota de infecção (FORTIN *et al.*, 2001).

O estudo sistemático realizado em diferentes linhagens de camundongos infectados pelo *T. cruzi* demonstrou a presença de lesões inflamatórias e degenerativas no músculo cardíaco bem semelhante aquelas encontradas na doença humana (ANDRADE, 2000). Desta forma, este estudo tem como objetivo investigar a presença de células fetais e sua possível contribuição no reparo de lesões de coração e músculo esquelético de fêmeas de camundongos paridas infectadas por *T. cruzi*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar a presença de células fetais no coração e no músculo esquelético e sua possível contribuição no reparo de lesões desses órgãos em fêmeas de camundongos paridas infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a presença de células fetais fluorescentes circulantes no organismo materno por citometria de fluxo;
 - Detectar a presença de células fetais fluorescentes no miocárdio, fígado e músculo esquelético das fêmeas infectadas após a gestação por *T. cruzi*;
 - Avaliar a parasitemia, a intensidade da miocardite e o grau de fibrose no coração e músculo esquelético na infecção aguda por *T. cruzi* em fêmeas paridas; comparando com o que ocorre em fêmeas virgens.
 - Quantificar a presença de DNA fetal pela metodologia de PCR em tempo real no coração e músculo esquelético de fêmeas paridas, sadias e infectadas por *T. cruzi*.
-

3 JUSTIFICATIVA

As circulações materna e fetal são separadas pelas vilosidades trofoblásticas da placenta. Entretanto, a passagem transplacentária de um pequeno número de células fetais nucleadas, incluindo células-tronco, é um fenômeno comum, denominado microquimerismo que às vezes resulta na persistência dessas células fetais no organismo materno ou vice-versa. Alguns trabalhos têm demonstrado que as células que entram na circulação materna são de origem hematopoiética, como eritrócitos, linfócitos e células-tronco. Estudos recentes demonstraram a presença de células fetais de cariótipo macho em 30-50% de mulheres saudáveis que tiveram fetos machos na primeira gravidez.

O potencial das células-tronco fetais no reparo de tecidos maternos lesados tem sido avaliado em modelos experimentais utilizando fêmeas de camundongos gestantes submetidas a lesões em diversos órgãos, tais como rim, fígado e cérebro. Células fetais foram detectadas nestes órgãos, inclusive no cérebro, demonstrando a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. O estudo do microquimerismo fetal em modelos experimentais de lesão tecidual por patógenos, como o *T. cruzi* ainda não tem sido realizado, o que pode contribuir para o melhor esclarecimento do papel destas células no organismo materno.

O objetivo deste projeto é investigar a presença de células fetais no coração e músculo esquelético e sua possível contribuição no reparo de lesões desses órgãos em fêmeas de camundongos paridas infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 e machos da linhagem C57Bl/6 transgênico para proteína verde fluorescente (GFP⁺) sob a regulação do promotor do gene da β -actina de galinha (Okabe *et al.*; 1997) de 3 a 4 meses de vida, foram fornecidos pelo Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA, CPqGM-Fiocruz).

4.2 ACASALAMENTO

Camundongos machos GFP⁺ foram acasalados com fêmeas C57Bl/6 virgens. Cada macho permaneceu durante 72 horas em uma gaiola com duas fêmeas (acasalamento 2:1). A cópula foi confirmada através da presença de tampão no período de 24 a 48 horas após o acasalamento. A gestação foi confirmada 15 dias após o acasalamento, através da avaliação do aumento da região abdominal, sendo as fêmeas não gestantes excluídas do estudo.

4.3 COLETA DE SANGUE

Uma semana pós-parto foi realizada a coleta de amostras de sangue de cada fêmea parida. As fêmeas foram anestesiadas pela via inalatória, com gases embebidas em halotano (TANOHALO, Cristália, SP). Após a anestesia as fêmeas foram mantidas em decúbito lateral para coleta de 400 μ L de sangue pelo plexo orbital, com auxílio de pipeta Pasteur. O material foi acondicionado em microtubo com 100 μ L de solução ácida de etilenodiaminotetra cético a 1% (EDTA; SIGMA-ALDRICH, EUA). A coleta de sangue de fêmeas virgens GFP⁻ e GFP⁺ foi também realizada para utilização como controle negativo e positivo, respectivamente, nas

análises de células fetais GFP⁺ por citometria de fluxo. A identificação de filhotes GFP⁺ foi realizada quinze dias após o parto, e as fêmeas que não tiveram filhotes GFP⁺ foram excluídas dos estudos posteriores.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE FILHOTES GFP⁺

Após o parto foi contado o número de filhotes por ninhada. No 15º dia foi coletada uma gota de sangue da cauda dos filhotes, para montagem em lâmina histológica e visualização do material em microscópio de epifluorescência para detecção dos filhotes GFP⁺ e GFP⁻. A ocorrência de canibalismo, óbito da ninhada ou ausência de fetos fluorescentes foram critérios de exclusão de algumas fêmeas do estudo.

4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por centrifugação do sangue, diluído 1:2 em salina, em solução de Ficoll (1:2 das concentrações 1117 e 1119; Histopaque, SIGMA). O anel contendo as células mononucleares foi coletado e lavado por centrifugação a 10.58 xg, por 10 minutos a 10º C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1% de paraformaldeído (PFA, VETEC, Química fina LTDA, SP) para posterior leitura no citômetro de fluxo (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems).

Para a aquisição de eventos, inicialmente foi realizada a análise de células mononucleares de fêmeas GFP⁻ e GFP⁺. Na análise foram adquiridos de 50.000 a 100.000 eventos por amostra e a porcentagem de células positivas fluorescentes foi calculada utilizando o software CELLQuest (versão 3.1F, BDIS).

4.6 INFECCÃO POR *T. cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi*, da cepa Colombiana (FEDERICI *et al.*, 1964), foram obtidos a partir da infecção de cultura de células epiteliais LLCMK2. Os parasitos foram contados segundo método descrito por Melo e Brener (1978) e a concentração de parasitos foi ajustada para 100 ou 1000 tripomastigotas/0,1 mL, utilizando como diluente salina. Cada animal recebeu 0,1 mL da solução contendo os parasitos, por via intraperitoneal.

4.7 PARASITEMIA

A parasitemia foi avaliada por contagem, em microscópio óptico, dos parasitos presentes em 50 campos microscópicos aleatórios (aumento de 400x) em uma lâmina contendo 5 µl de sangue periférico obtido da cauda do animal, segundo o método descrito por Melo e Brener em 1978. A parasitemia foi avaliada nos dias 15, 21, 25 e 30 pós-infecção.

4.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS

1º experimento (infecção com 100 tripomastigotas)

Grupo I - 12 fêmeas C57Bl/6

Subgrupo 1A – 4 fêmeas infectadas 1 semana pós-parto.

Subgrupo 1B- 4 fêmeas virgens infectadas.

Subgrupo 1C - 4 fêmeas paridas não infectadas (foram utilizadas como controle do microquimerismo).

2º experimento (infecção com 1000 tripomastigotas)

Grupo 2 - 28 fêmeas C57Bl/6.

Subgrupo 2A – 12 fêmeas infectadas 1 semana pós-parto.

Subgrupo 2B – 8 fêmeas virgens infectadas.

Subgrupo 2C - 8 fêmeas paridas não infectadas (foram utilizadas como controle do microquimerismo).

4.9 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental dos experimentos 1 e 2 está representado na figura 1. Fêmeas GFP⁻ foram acasaladas com machos GFP⁺. Uma semana pós-parto foram coletadas amostras de sangue de cada animal, com posterior separação de células mononucleares para realização de citometria; as fêmeas foram infectadas com um inóculo de 100 ou 1000 formas de tripomastigotas por animal após uma semana pós-parto. As fêmeas foram sacrificadas após 30 dias de infecção e, em seguida foram coletados o coração, fígado e músculo esquelético. Parte dos tecidos foi submetida a congelamento rápido em nitrogênio líquido para extração de DNA, com posterior técnica de PCR em tempo real, os demais fragmentos foram processados para análise de imunofluorescência e histopatologia.

Figura 1

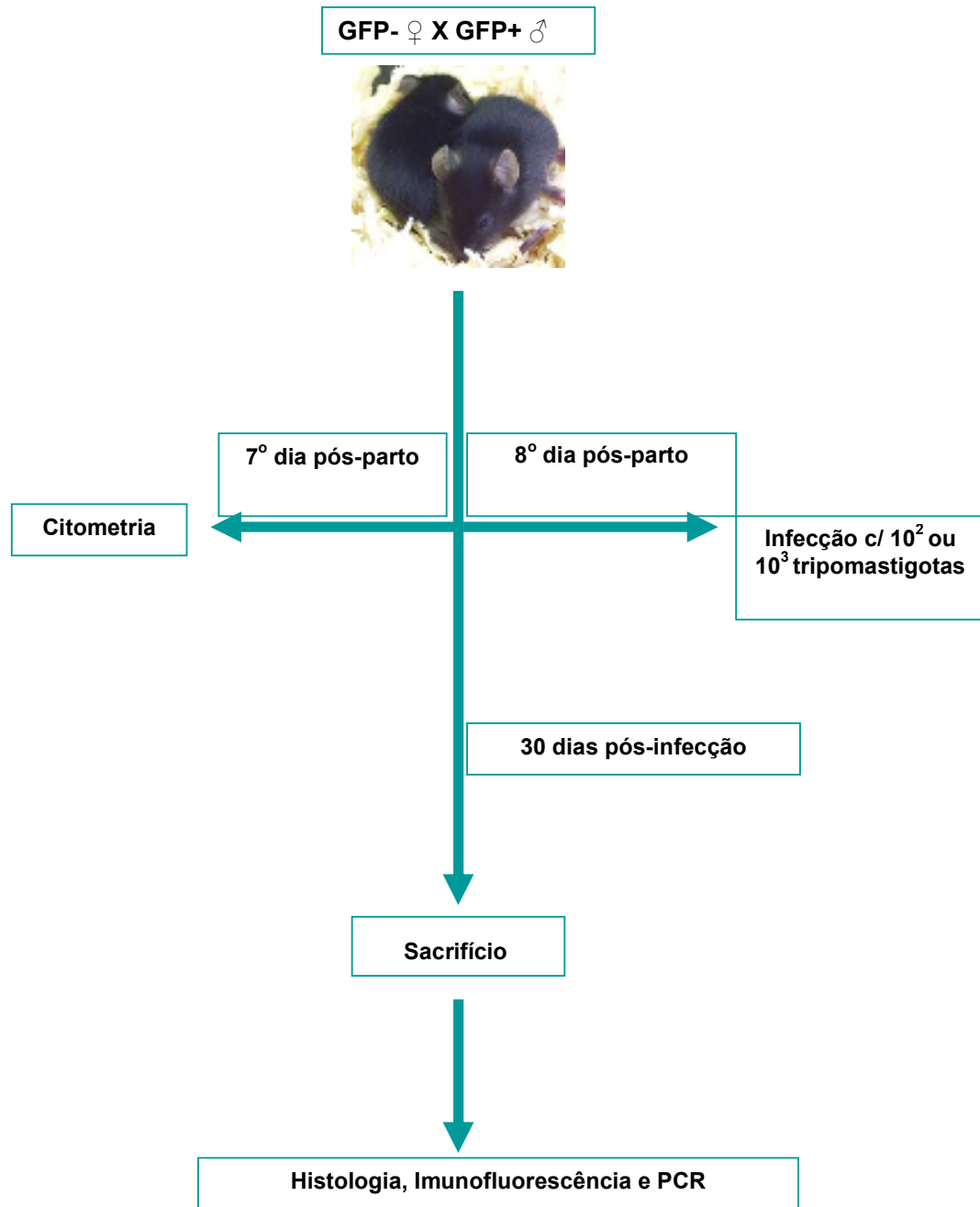


Fig. 1: Desenho experimental utilizado para a investigação do microquimerismo fetal na fase aguda da infecção por *T. cruzi* em fêmeas de camundongos paridas.

4. 10 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

1º experimento (infecção com 100 tripomastigotas)

Trinta dias pós-infecção os animais foram submetidos à técnica de perfusão com posterior remoção do coração, fígado e músculo esquelético. Os animais foram profundamente anestesiados com 200 µl de tionembutal; uma incisão cirúrgica foi realizada com início na região peritoneal seguindo até a última costela e durante o processo de abertura foi realizado rapidamente um corte no diafragma do animal para garantir a parada respiratória. Com a incisão da agulha no ventrículo esquerdo e posterior pique com uma tesoura cirúrgica no átrio direito, a bomba de perfusão foi ligada em velocidade média passando 100 mL de salina 0,9%, a 4°C. Após o tempo necessário (em média 5 minutos), a solução de salina foi trocada por uma solução de 300 mL de paraformaldeído a 4% que foi passada por 20 minutos. Durante todo o procedimento a solução salina e de paraformaldeído foram mantidas no gelo. Após o término os órgãos foram desidratados em sacarose a 30% por um período de 12 h e em seguida congelados em meio Optimal Cutting Temperature (O.C.T. compound; Tissue Tek, Sakura fine tech, Europe) a -70° C para análise por imunofluorescência.

2º experimento (infecção com 1000 tripomastigotas)

Trinta dias pós-infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, com posterior remoção dos órgãos (coração, fígado e músculo esquelético). Os órgãos foram lavados em solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% e seccionados. Parte dos fragmentos foi estocado em microtubos estéreis e submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido e estocagem em freezer -80° C para posterior extração de DNA. Os demais fragmentos foram fixados em formaldeído a 10% (VETEC, Química fina LTDA, SP) para posterior análise histológica.

4. 11 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA

Fragmentos de coração, fígado e músculo esquelético fixados em formol 10% foram incluídos em parafina e os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (H&E), para quantificação do número de células inflamatórias, e com picrossírius, para quantificação da área de fibrose. As secções de tecido muscular cardíaco e esquelético foram analisadas por morfometria em estudo cego. As células inflamatórias e a área de fibrose foram determinadas ao microscópio com auxílio do programa Image Pro Plus versão 4.0 (Media Cybernetics Inc. EUA) e integradas por área. O número de ninhos de parasitos também foi obtido através de contagem dos mesmos em 100 campos por secção; foram avaliadas de 5 a 10 secções por coração e músculo esquelético (400x) de cada animal.

4.12 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cortes de 5 µm de espessura dos fragmentos congelados em O.C.T do coração, músculo esquelético e fígado de fêmeas infectadas com 100 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* foram obtidos em um criostato (Leica, CM 1800 - Germany) e colocados em lâminas cobertas com poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH, USA). A presença de células fetais GFP⁺ no coração, músculo esquelético e fígado foi avaliada por imunofluorescência indireta. O material foi incubado com anticorpos anti-GFP biotinizados (Santa Cruz Biotechnologies, USA), seguido por estreptavidina conjugada com Alexa 488 (Molecular Probes) para detecção de células GFP⁺ de origem fetal. Marcações específicas para tecido cardíaco, hepático e esquelético também foram realizadas. Os tecidos cardíaco e esquelético foram incubados com anticorpos produzidos em coelho anti-miosina esquelética (SIGMA) e revelados com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados com Alexa Fluor 568 (Molécula Probes). O tecido hepático foi marcado com anticorpo policlonal produzido em coelho anti-albumina (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Os núcleos foram marcados com 4,6-dismidino-2-phenylindole (DAPI H-1500, VectaShield Hard, Vector Laboratories,

Burlingame, CA). A fluorescência foi analisada pela observação das lâminas em um microscópio BX61 utilizando filtros apropriados (Olympus, Tokio, Japan). As imagens foram capturadas usando uma câmera SPOT flex (Versão 15.2, 64 Mp, Shifting Pixel, Diagnostic Instruments inc, USA).

4.13 EXTRAÇÃO DE DNA

Fêmeas C57Bl/6 infectadas com 1000 tripomastigotas foram sacrificadas em câmara de CO₂ e cerca de 50% do coração e do músculo esquelético (aproximadamente 125 mg) foi submetido a congelamento rápido em nitrogênio líquido para posterior extração de DNA. Esta foi realizada com mini-kit QIAamp DNA (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Os fragmentos do coração e músculo foram macerados individualmente em graus estéreis, tratados com 20 mg/mL de proteinase K (INVITROGEN) e tampão de lise, seguido de incubação em banho seco sob agitação à temperatura de 56° C por 3 horas. Em seguida o DNA foi precipitado em etanol absoluto (SIGMA-ALDRICH, EUA) e coletado em coluna de sílica QIAamp Spin. A eluição do DNA foi realizada com tampão tris-EDTA (TE) e a quantificação e a determinação do grau de pureza do DNA foram feitas por espectrofotometria de massa (ND-1000, NanoDrop Technologies, EUA).

4.14 PCR EM TEMPO REAL

Vinte nanogramas por microlitro do DNA eluído foram utilizados para a análise da expressão gênica por reação de PCR em tempo real. A amplificação foi realizada pelo método Taqman utilizando sistema de detecção ABI 7700 com o software SDS versão 1.9 (Applied Biosystems, Foster) com pré-aquecimento de 10 minutos a 95° C e 50 ciclos de 95° C por 25 segundos; 60° C e 70° C por 40 segundos. O gene amplificado foi da proteína verde fluorescente (GFP) senso: 5' ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCA-3', antisenso: 5' GGCGGATCTTGAAGTTCACC-3' e sonda Taqman 5'-FAM

CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA-TAMRA-3', onde FAM é 6-carboxifluoresceína e TAMRA é 6-carboxitetrametilrhodamina. O gene GAPDH foi utilizado como controle interno do experimento, utilizando primers da Applied Biosystems (ID: Mm99999915g1). Todas as amostras foram testadas em triplicatas. As diferenças nas quantidades de DNA do transgene *gfp* foi obtida a partir da comparação relativa entre o controle (fêmeas paridas não infectadas) com o experimental (fêmeas paridas infectadas) pelo método de normalização $\Delta\Delta Ct$ (Yuan *et al.*, 2006).

4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas dos grupos de fêmeas virgens e paridas infectadas foram realizadas utilizando os testes *t* de Student não pareado, one-way ANOVA e teste de Newman Keuls, com o auxílio do programa GraphPad Prism 3. As diferenças foram consideradas significantes quando o valor de P foi $< 0,05$.

5 RESULTADOS

Número de filhotes fluorescentes por mãe C57Bl/6

A determinação do número de filhotes fluorescentes por mães C57Bl/6 foi realizada quinze dias pós-parto, através da análise do sangue periférico de cada filhote em microscopia de fluorescência. Cada fêmea utilizada no experimento teve, pelo menos, um filhote GFP⁺. Mães que tiveram óbito de ninhadas, ausência de filhotes GFP⁻ foram excluídas do experimento. A tabela 1 e 2 demonstra o número de filhotes GFP⁺ e GFP⁻ por fêmea C57Bl/6. Fêmeas da tabela 1 foram infectadas com 100 tripomastigotas e da tabela 2 com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* no 8º dia pós-parto.

Tabela 1: Número de filhotes GFP⁺ e GFP⁻ por fêmea C57Bl/6.

| Fêmea | GFP⁺ | GFP⁻ |
|--------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 2 | 5 |
| 2 | 2 | 5 |
| 3 | 4 | 3 |
| 4 | 2 | 2 |

Tabela 2: Número de filhotes GFP⁺ e GFP⁻ por fêmea C57BL/6.

| Fêmea | GFP⁺ | GFP⁻ |
|--------------|------------------------|------------------------|
| 1 | 4 | 0 |
| 2 | 2 | 2 |
| 3 | 2 | 1 |
| 4 | 8 | 0 |
| 5 | 6 | 0 |
| 6 | 8 | 0 |
| 7 | 2 | 2 |
| 8 | 7 | 0 |
| 9 | 5 | 0 |
| 10 | 5 | 3 |
| 11 | 4 | 2 |
| 12 | 8 | 0 |
| 13 | 6 | 2 |
| 14 | 6 | 0 |
| 15 | 4 | 3 |
| 16 | 1 | 2 |
| 17 | 3 | 0 |
| 18 | 3 | 0 |

Presença de células fetais GFP⁺ no sangue materno

Células fetais GFP⁺ foram detectadas por citometria de fluxo em frações de células mononucleares do sangue materno coletado sete dias após o parto de mães C57Bl/6 ($n=18$). Foram analisadas células mononucleares do sangue periférico de fêmeas GFP⁻ (Figura 1A) e fêmeas GFP⁺ (Figura 1B) como controles negativo e positivo, respectivamente. Células fetais GFP⁺ foram detectadas no sangue periférico de três fêmeas do total de 18 fêmeas analisadas (Figuras 1C-E). O número de células fetais GFP⁺ detectadas variou de 0,01% a 0,6%.

Figura 1

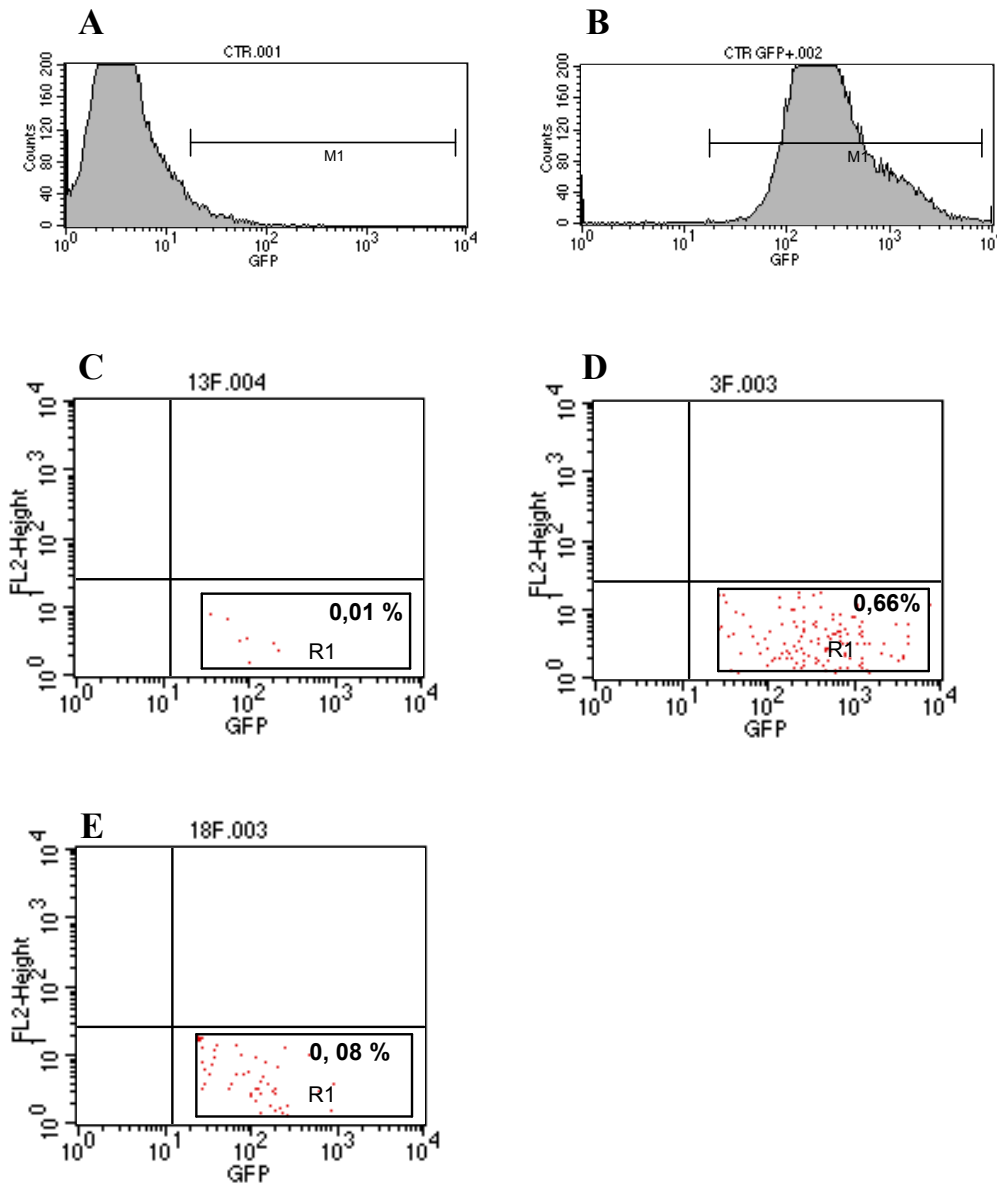


Figura 1. Análise de células mononucleares do sangue periférico por citometria de fluxo

(A) Histograma do sangue periférico de fêmeas de camundongos GFP⁻. (B) Histograma do sangue periférico de fêmeas de camundongos GFP⁺. A região R1 nos gráficos (C-E) contém a população de células fetais GFP⁺.

Parasitemia

A parasitemia foi analisada durante a fase aguda da infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* em mães e fêmeas virgens. Como pode ser verificado na figura 2, entre o 15° e 25° dia de infecção o grupo de fêmeas virgens apresentaram um aumento de parasitemia, superior ao das fêmeas parturientes, porém a diferença não foi estatisticamente significativa. Ambos os grupos apresentaram pico de parasitemia no 30° dia de infecção. Não houve mortalidade em nenhum dos grupos analisados.

Figura 2

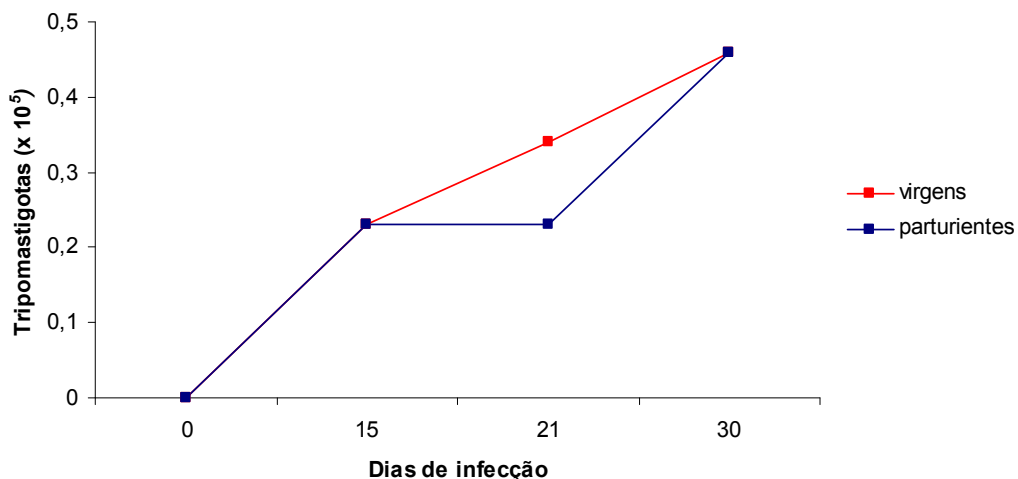


Figura 2. Parasitemia das fêmeas C57Bl/6 virgens e parturientes na fase aguda da infecção por *T. cruzi*. A parasitemia foi avaliada durante a infecção aguda com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A contagem em amostras de sangue foi realizada em 50 campos aleatórios, em microscópio óptico, no aumento de 400X. Dados representam a mediana de 6 a 8 animais por grupo.

Análise histopatológica

A análise histopatológica no coração (Figura 3) mostrou que a infecção aguda pelo *T. cruzi* determina uma miocardite de diferentes intensidades, difusa, com predomínio de células mononucleares nos dois grupos analisados (virgens e mães infectadas). No músculo esquelético observou-se uma destruição intensa das fibras musculares e um predomínio de células mononucleares no infiltrado inflamatório (Figura 4).

Figura 3

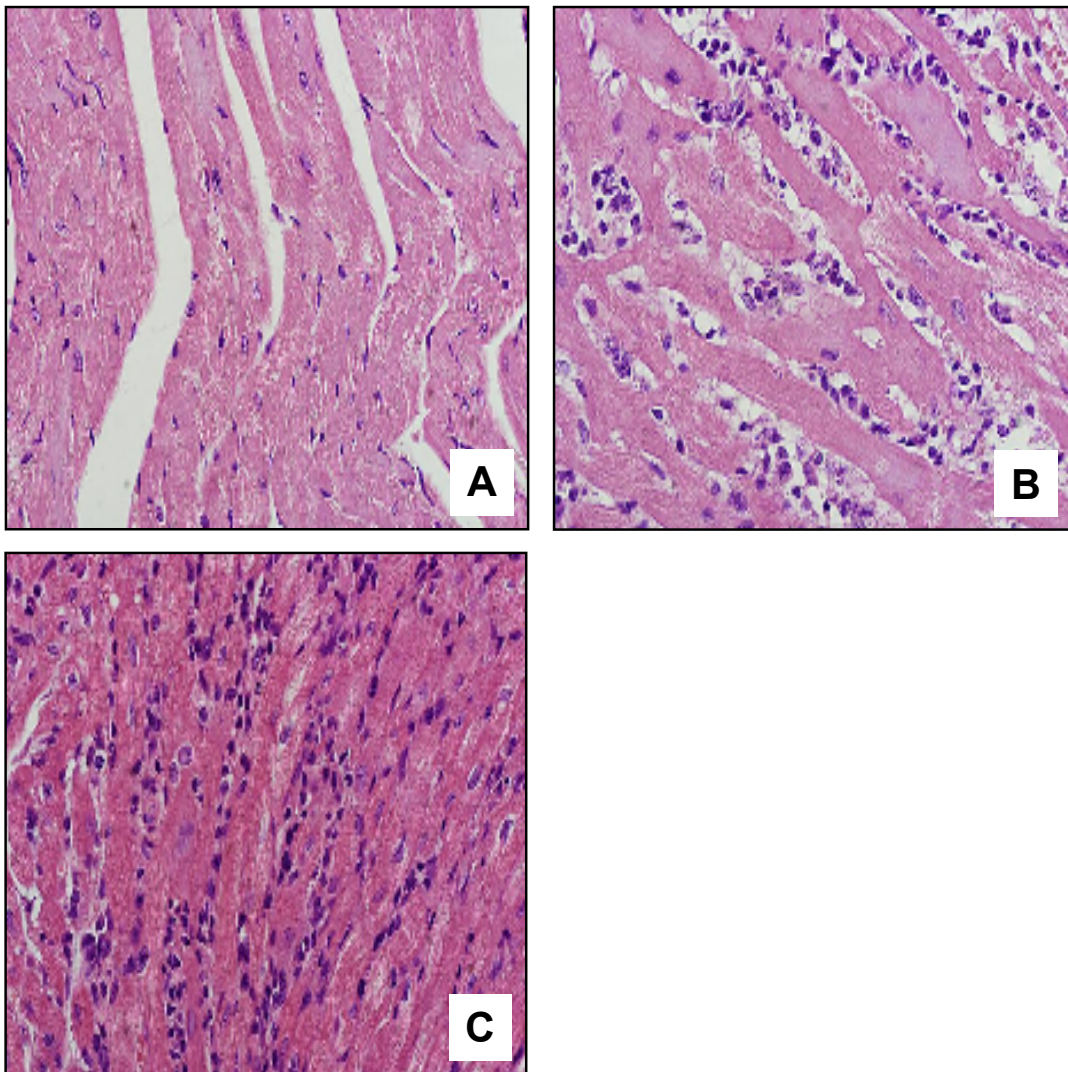


Figura 3. Análise histológica de secções de tecido cardíaco de fêmeas de camundongos C57Bl/6. Fêmeas saudáveis ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. **A**, coração de mãe não-infectada. **B**, coração de fêmea virgem infectada. **C**, coração de mãe infectada. H & E, aumento de 600X.

Figura 4

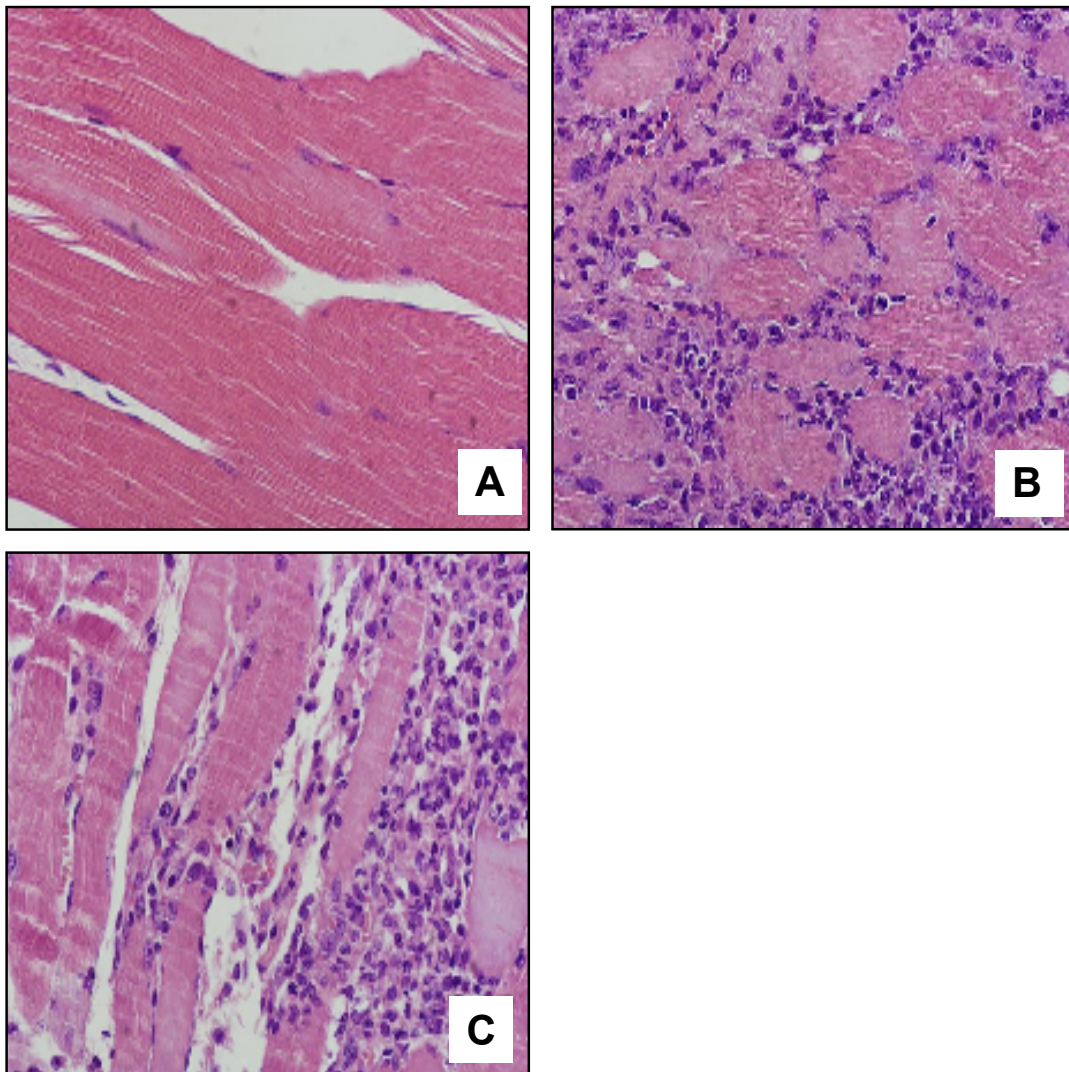


Figura 4. Análise histológica de seções de músculo esquelético de fêmeas de camundongos C57Bl/6. Fêmeas saudáveis ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. **A**, músculo esquelético de mãe não-infectada. **B**, músculo esquelético de fêmea virgem infectada. **C**, músculo esquelético de mãe infectada. H & E, aumento de 600X.

A análise morfométrica do infiltrado inflamatório no coração de mães infectadas e virgens infectadas não demonstrou diferença com significância estatística (Figura 5A). No entanto, na análise do músculo esquelético observou-se um aumento significativo do infiltrado no grupo de virgens infectadas comparadas com mães infectadas (Figura 5B). O número de ninhos de parasitos no coração e no músculo esquelético de mães infectadas foi maior comparado com o grupo de virgens infectadas, demonstrando uma significância estatística no coração e músculo esquelético (Figuras 6A e B).

Figura 5

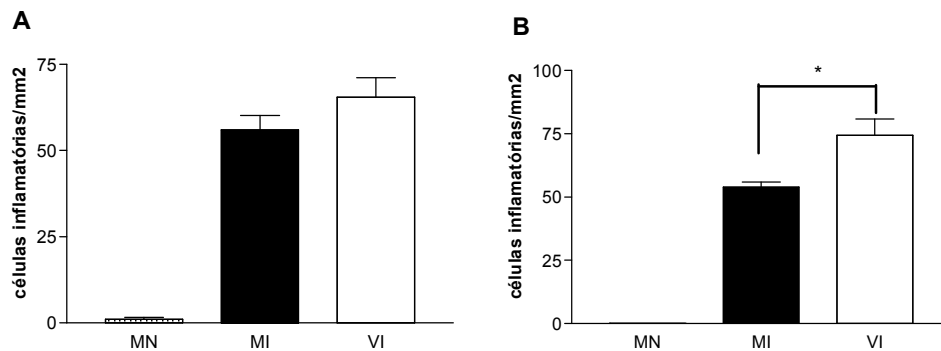


Figura 5. Quantificação do infiltrado inflamatório em secções de coração (A) e músculo esquelético (B) de fêmeas C57Bl/6. Fêmeas sadias ou infectadas com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. Secções de corações coradas com H&E foram avaliadas para contagem do número de células inflamatórias por morfometria, conforme descrito nos Materiais e métodos. **MN**, Mãe não-infectada. **MI**, Mãe infectada. **VI**, Virgem infectada. Os dados representam à média \pm SEM de 6-12 animais por grupo. * $P < 0.001$.

Figura 6

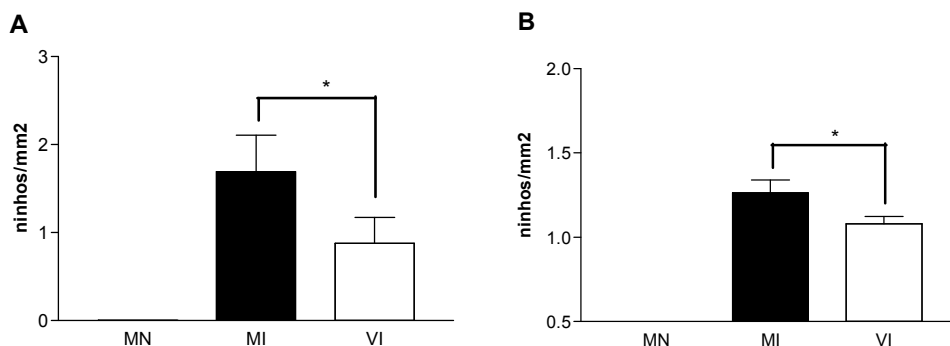


Figura 6. Quantificação do número de ninhos de amastigotas em secções de coração (A) e músculo esquelético (B) de fêmeas C57Bl/6. Fêmeas sadias ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. Secções de corações coradas com H&E foram avaliadas para contagem do número de ninhos de amastigotas ao microscópio óptico. **MN**, Mãe não-infectada. **MI**, Mãe infectada. **VI**, Virgem infectada. Os dados representam a média \pm SEM de 6-12 animais por grupo. * $P < 0.05$.

A análise histopatológica da fibrose em cortes histológicos de miocárdio e músculo esquelético das fêmeas C57Bl/6 corados com picrossírius vermelho mostrou que a infecção aguda pelo *T. cruzi* determina a deposição de colágeno nas áreas necrosadas, em substituição às fibras musculares destruídas (Figuras 7 e 8).

Figura 7

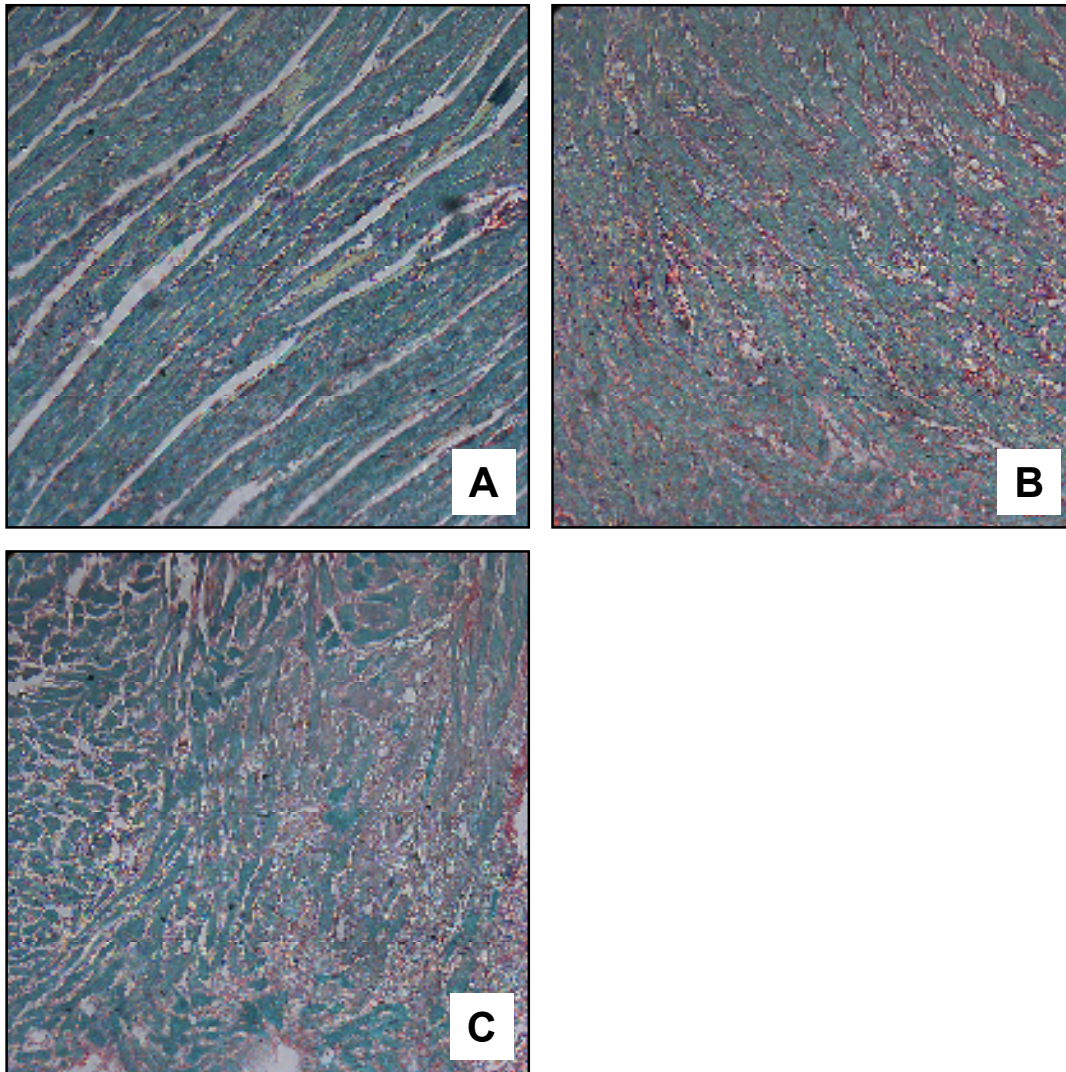


Figura 7. Análise de fibrose em secções de tecido cardíaco de fêmeas C57Bl/6. Fêmeas sadias ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. **A**, músculo esquelético de mãe não-infectada. **B**, músculo esquelético de fêmea virgem infectada. **C**, músculo esquelético de mãe infectada. Picrosirius em vermelho, aumento de 600X.

Figura 8

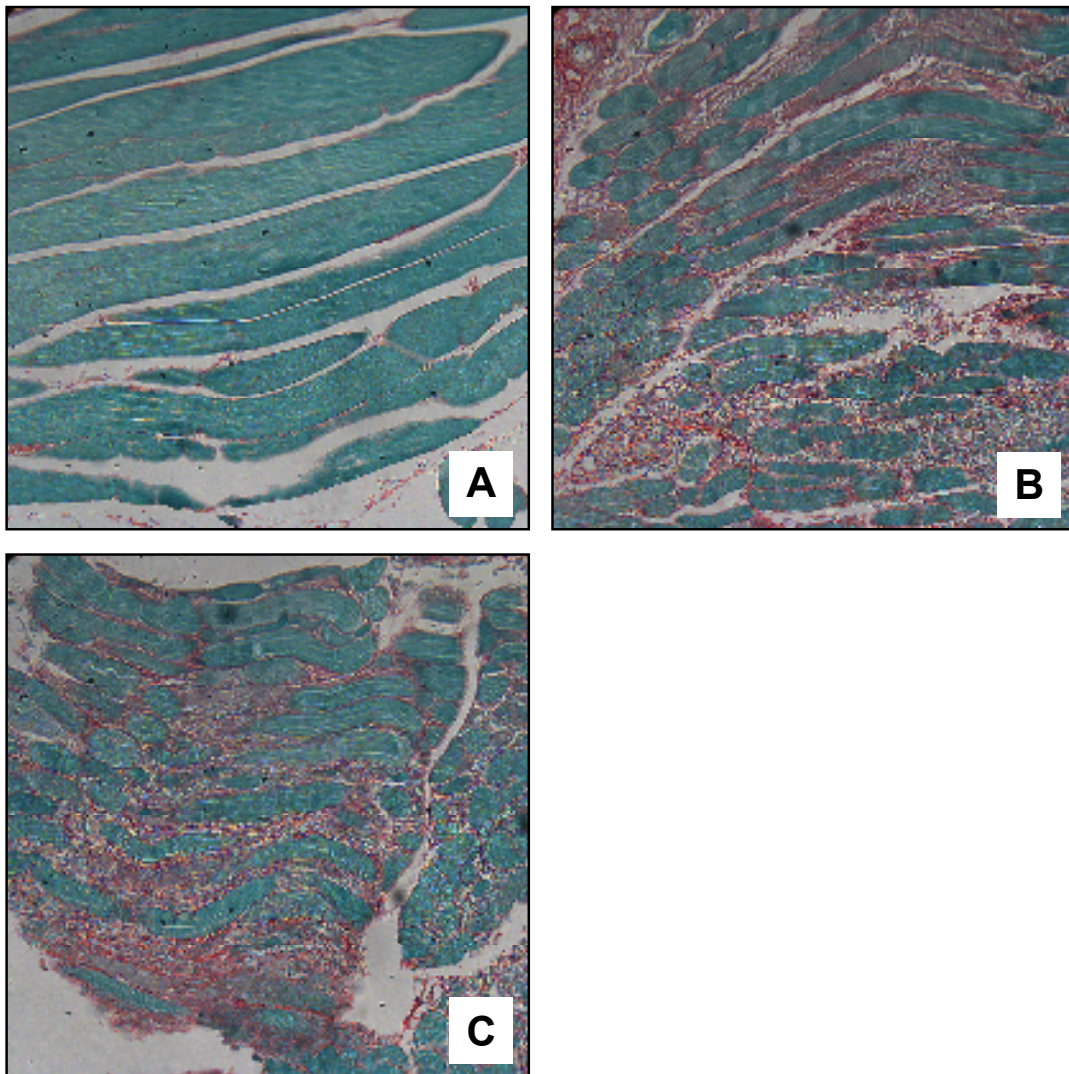


Figura 8. Análise de fibrose em secções de músculo esquelético de fêmeas C57Bl/6. Fêmeas sadias ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. **A**, músculo esquelético de mãe não-infectada. **B**, músculo esquelético de fêmea virgem infectada. **C**, músculo esquelético de mãe infectada. Picrosirius em vermelho, aumento de 600X.

A análise morfométrica no coração e no músculo esquelético de fêmeas C57Bl/6, para verificar se ocorre diferença na deposição de colágeno em mães e fêmeas virgens infectadas, demonstrou que a fibrose foi mais intensa no coração de mães infectadas comparadas com mães sadias e virgens infectadas (Figura 9A). No músculo esquelético ocorreu uma inversão, o grupo de fêmeas virgens infectadas apresentou fibrose mais elevada em comparação com o grupo de mães infectadas (Figura 9B).

Figura 9

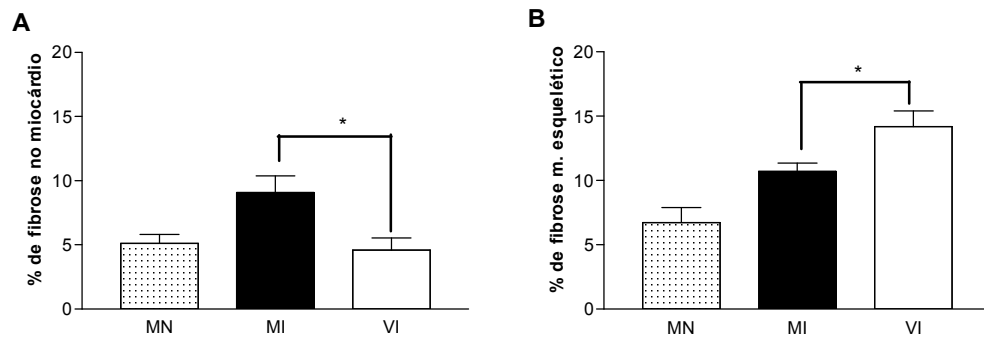


Figura 9. Quantificação da fibrose no miocárdio e no músculo esquelético de fêmeas C57BL/6. Fêmeas sadias ou infectadas com 1000 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (30 dias de infecção) foram sacrificadas. Secções de corações coradas com picrossírius vermelho foram avaliadas para contagem do número de células inflamatórias por morfometria, conforme descrito nos Materiais e métodos. **MN**, Mãe não-infectada. **MI**, Mãe infectada. **VI**, Virgem infectada. Os dados representam a média \pm SEM de 6-12 animais por grupo. * $P < 0.05$.

Presença de células fetais GFP⁺ no coração, fígado e músculo esquelético

Cortes de 5 µm do coração, músculo esquelético e fígado foram preparados e marcados com anticorpos anti-GFP para detecção de células fetais GFP⁺. Foram encontradas células fetais GFP⁺ no coração, músculo esquelético e fígado de mães após 30 dias de infecção por *T. cruzi* (Figuras 10-12).

De quatro fêmeas infectadas uma semana pós-parto com 100 tripomastigotas de *T. cruzi* foram encontradas poucas células fetais GFP⁺ (no máximo 2-3 células por campo, em aumento de 400x) no coração e fígado, em apenas duas fêmeas paridas. Já no músculo esquelético, células fetais GFP⁺ foram encontradas em maior número (de 2-6 células por campo, em aumento de 400x) em todas as fêmeas infectadas analisadas. Nenhuma célula GFP⁺ foi encontrada em secções de coração, músculo esquelético e fígado de fêmeas saudáveis que tiveram filhotes GFP⁺.

Para investigar uma possível diferenciação destas células nos tecidos avaliados, foi realizada análise de dupla-fluorescência com anticorpos específicos para marcação de células de músculo estriado (miosina de músculo esquelético) ou de hepatócitos (albumina). Células fetais GFP⁺ expressaram miosina no coração e no músculo esquelético (Figuras 10B e C, 12B e D), indicando uma possível diferenciação destas células em cardiomiócitos e células de músculo esquelético. Já no fígado, não foram encontradas células GFP⁺ marcadas para albumina (Figura 11).

Figura 10

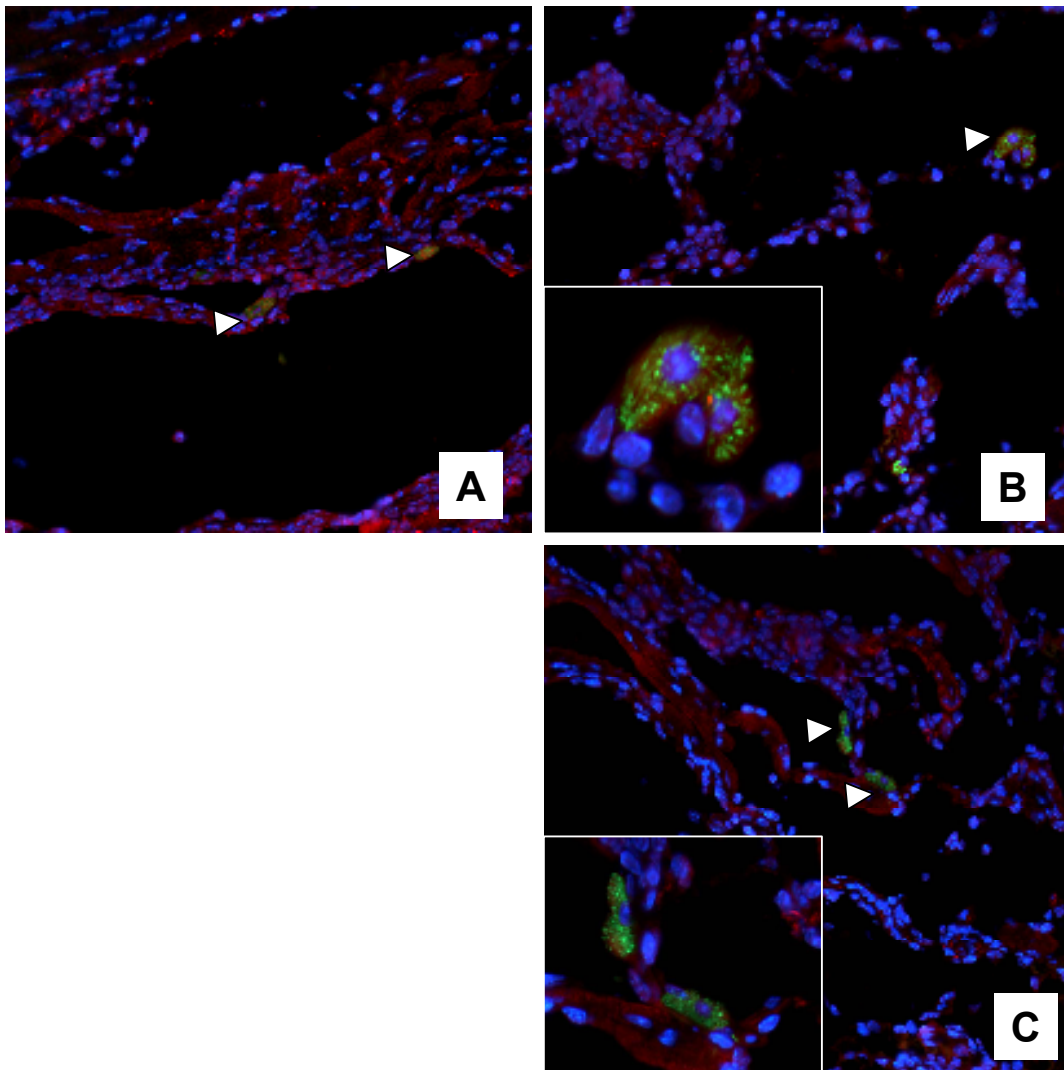


Figura 10 – Microquimerismo fetal no coração de fêmeas C57Bl/6 infectadas por *T. cruzi*. Fêmeas paridas foram infectadas com 100 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e sacrificadas no 30º dia pós-infecção. Secções de corações foram marcadas com anti-GFP (verde), anti-miosina (vermelho) e com DAPI (azul) para visualização dos núcleos. As setas indicam células fetais GFP⁺. Aumento de 400X.

Figura 11

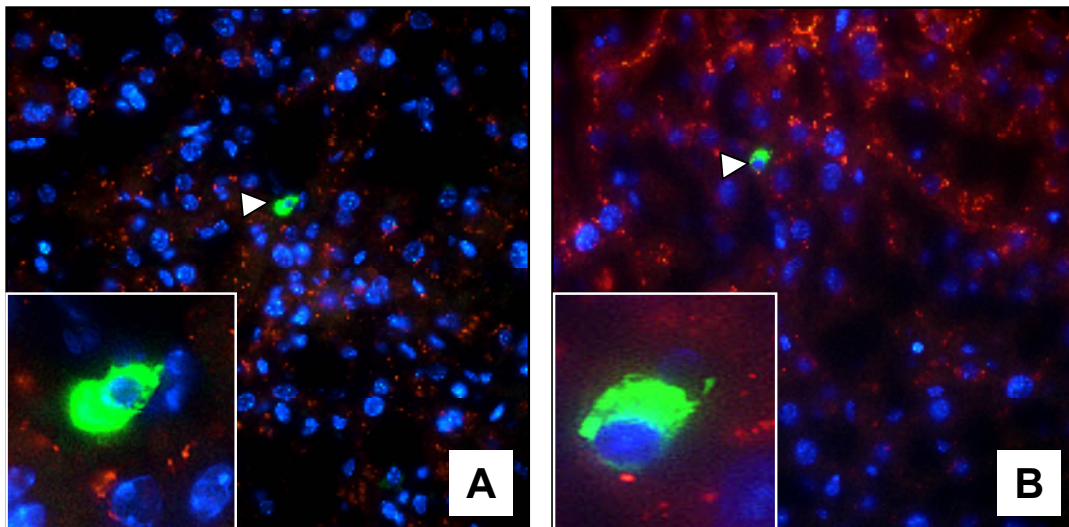


Figura 11 - Microquimerismo fetal no fígado de fêmeas C57Bl/6 infectadas pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fêmeas paridas foram infectadas com 100 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e sacrificadas no 30º dia pós-infecção. Secções de fígados foram marcadas com anti-GFP (verde), anti-albumina (vermelho) e com DAPI (azul) para visualização dos núcleos. As setas indicam células fetais GFP⁺. Aumento de 400X.

Figura 12

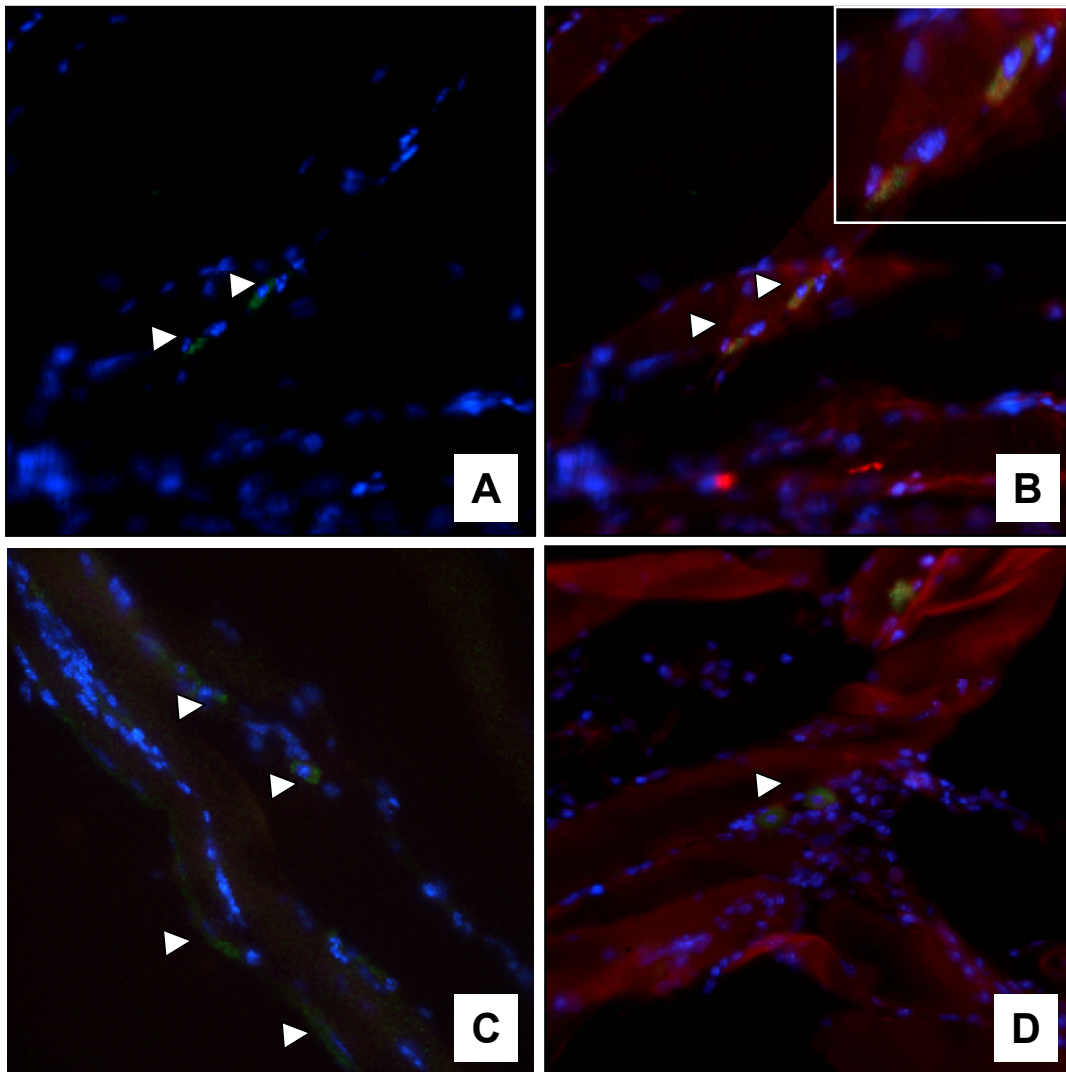
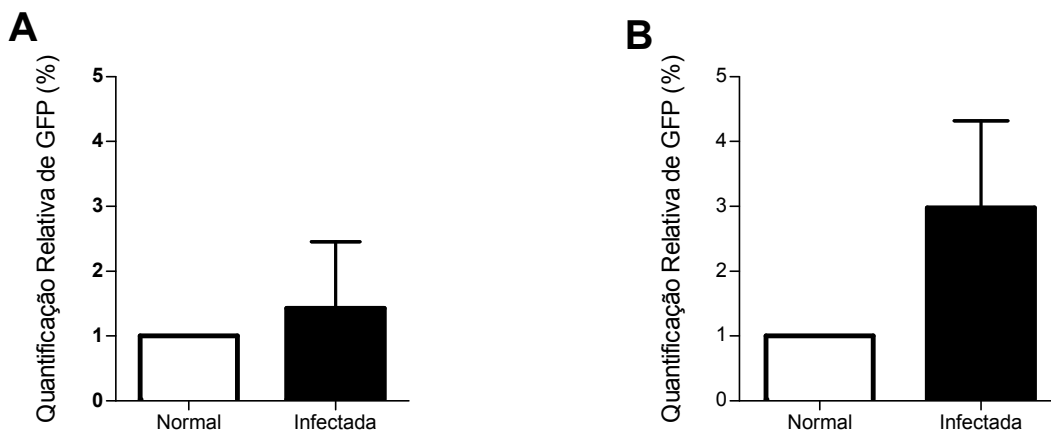


Figura 12 - Microquimerismo fetal no músculo esquelético de fêmeas C57BL/6 infectadas pela cepa Colombiana de *T. cruzi*. Fêmeas paridas foram infectadas com 100 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e sacrificadas no 30º dia pós-infecção. Secções de músculo esquelético foram marcadas com anti-GFP (verde), anti-miosina (vermelho; B e D) e com DAPI (azul) para visualização dos núcleos. As setas indicam células fetais GFP⁺. Aumento de 400X.

Quantificação do transgene *gfp* no coração e no músculo esquelético

A presença do transgene *gfp* foi analisada em amostras de coração e de músculo esquelético de mães C57Bl/6 sadias ou infectadas com 1000 tripomastigotas de *T. cruzi*. A análise por PCR em tempo real baseou-se na quantificação relativa da presença do transgene *gfp* dessas fêmeas após a normalização pelo gene constitutivo GAPDH. Pela análise por PCR em tempo real, detectou-se a presença de *gfp* no coração e no músculo esquelético de mães sadias, embora em quantidades menores do que as quantidades de *gfp* em ambos os tecidos de mães infectadas por *T. cruzi* (Figura 13). As quantidades de *gfp* no coração foram, em média, cerca de três vezes maior do que no músculo esquelético, em mães infectadas (Figura 14).

Figura 13



13: Níveis de *gfp* no músculo esquelético e coração de fêmeas C57BL/6 sadias ou infectadas por *T. cruzi*. Amostras de coração e músculo esquelético de fêmeas C57Bl/6 sadias ou infectadas com a cepa Colombiana de *T. cruzi* foram utilizadas para quantificação da presença do transgene *gfp* 30 dias após a infecção. A quantificação relativa baseou-se na comparação entre o percentual de *gfp* no coração e no músculo esquelético de fêmeas sadias ou infectadas, após a normalização dos mesmos em relação ao número de cópias do gene constitutivo GAPDH em cada um dos sistemas, independentemente. **A**, músculo esquelético; **B**, coração. Cada experimento foi realizado em triplicata em amostras obtidas de 7 animais por grupo. A

Figura 14

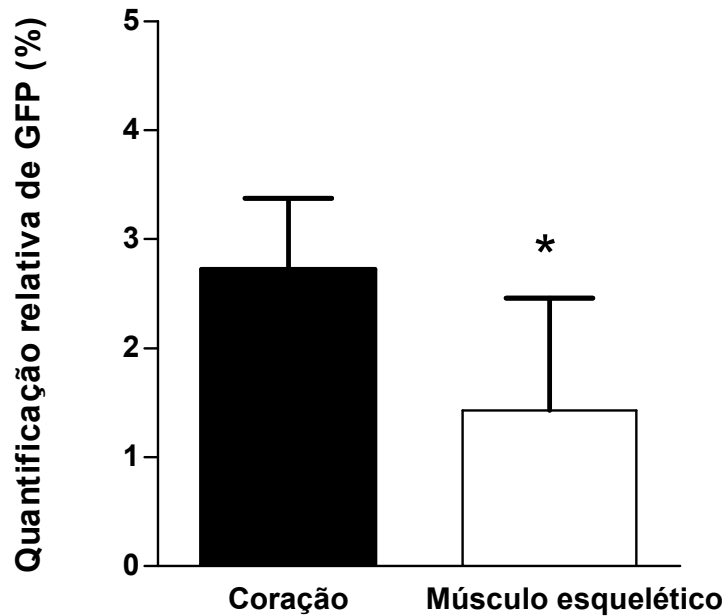


Figura 14: Comparação da presença do transgene *gfp* no coração e músculo esquelético em fêmeas C57BL/6 infectadas por *T. cruzi*. Amostras de coração e músculo esquelético de fêmeas C57BL/6 infectadas com a cepa Colombiana de *T. cruzi* foram utilizadas para a análise da presença do transgene *gfp* 30 dias após a infecção. Realizou-se a extração de DNA seguida de amplificação pela metodologia de PCR em tempo real. Cada experimento foi realizado em triplicata em amostras obtidas de 7 animais por grupo. * $P = 0.0197$ (teste *t* de Student).

6 DISCUSSÃO

A utilização de modelos experimentais constitui a principal ferramenta na análise de células fetais presentes no organismo materno, visto a dificuldade na obtenção de amostras em seres humanos. Trabalhos utilizando modelos experimentais de lesão em diversos órgãos como: fígado, (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2007), cérebro (TAN *et al.*, 2005), glândula da tireóide (IMAIZUMI *et al.*, 2005) e rim (WANG *et al.*, 2004) vêm sendo realizados na tentativa de explicar o potencial de reparo destas células em lesões em tecidos de fêmeas paridas. Até o momento nenhum trabalho experimental em modelos de doenças infecciosas ou de lesões musculares foi realizado. Neste estudo foram avaliados, pela primeira vez, a presença e o potencial de reparo tecidual de células fetais no coração e no músculo esquelético, utilizando o modelo de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* em fêmeas paridas de camundongos.

Neste trabalho foi demonstrada a presença de células fetais GFP⁺ na circulação materna de camundongos C57Bl/6, uma semana após o parto. Resultados semelhantes foram obtidos em trabalhos utilizando fêmeas de camundongos da mesma linhagem (TAN *et al.*, 2005); em ratas Sprague-Dawley células fetais GFP⁺ foram também detectadas na circulação e também na medula óssea (WANG *et al.*, 2000). No nosso estudo, foram encontradas células fetais circulantes em apenas 17% das fêmeas analisadas, embora todas tivessem filhotes GFP⁺.

Neste trabalho o microquimerismo fetal foi investigado no coração e músculo esquelético, visto que a infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* apresenta um miotropismo em camundongos; e na infecção aguda determina extensas lesões de fibras musculares esqueléticas, intenso infiltrado inflamatório, com lesões proeminentes no miocárdio (ANDRADE, 2000). Em nosso estudo, células fetais GFP⁺ foram encontradas no coração, no músculo esquelético e no fígado de fêmeas paridas C57Bl/6 30 dias pós-infecção com 100 tripomastigotas da cepa Colombiana. Este primeiro experimento teve como objetivo

investigar a presença de células fetais no miocárdio e no músculo esquelético no modelo de infecção por *T. cruzi*. Células fetais GFP⁺ foram encontradas nestes dois tecidos, e algumas destas células co-expressaram miosina, o que sugere uma diferenciação destas células em cardiomiócitos e células de músculo esquelético nos tecidos residentes.

Neste primeiro experimento a investigação de células fetais no fígado foi também realizada, visto que a infecção aguda pela cepa Colombiana de *T. cruzi* também acomete esse órgão (Camandaroba *et al.*, 2006) elevando os níveis de enzimas hepáticas e produzindo uma vasculite extensa (Bouzahzah *et al.*, 2006). No fígado detectamos células fetais GFP⁺, mas estas não expressaram albumina. Não foram encontradas células fetais GFP⁺ em secções de coração, fígado e músculo esquelético de fêmeas saudáveis que tiveram filhotes GFP⁺. Estes achados não descartam a possibilidade de células fetais GFP⁺ estarem presentes nos tecidos de mães saudáveis, visto que a técnica de imunofluorescência não é a mais sensível na investigação do microquimerismo fetal (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2005).

No trabalho realizado por Wang e colaboradores (2004) células fetais GFP⁺ expressando albumina foram encontradas no fígado de fêmeas de ratos paridas com lesão hepática induzida por ingestão diária de etanol. Já na investigação destas células no fígado em um modelo de lesão hepática por tetracloreto de carbono em fêmeas C57Bl/6, células fetais GFP⁺ foram detectadas no fígado, sendo mononucleares, algumas dispostas em agregados, mas sem expressão de albumina (KHOSROTEHRANI *et al.*, 2007).

Khosrotehrani e colaboradores (2005) encontraram células fetais GFP⁺ no coração, fígado, rim e em maior proporção no pulmão de fêmeas saudáveis que tiveram filhotes GFP⁺, em diferentes estágios da gestação, demonstrando que estas células também residem em órgãos não lesionados. Ainda neste trabalho, os autores demonstraram que o intervalo de parto influencia a quantidade de células fetais GFP⁺, encontradas nos tecidos por PCR em tempo

real e, uma semana pós-parto, as células fetais GFP⁺ são detectadas em apenas 4% dos órgãos sadios avaliados.

Nossos dados estão de acordo com trabalhos prévios que demonstraram a presença de células fetais GFP⁺ no fígado e rim no modelo de lesão hepática e renal por tetracloreto de carbono e gentamicina em ratos e camundongos fêmeas (WANG *et al.*, 2004; KHOSROTEHRANI *et al.*, 2007). Huu e colaboradores (2007) encontraram um elevado número de células fetais GFP⁺ em orelhas de fêmeas murinas gestantes hipersensibilizadas com oxazolona pelas técnicas de imunofluorescência, hibridização *in situ* e PCR em tempo real. Em contrapartida, poucas células fetais GFP⁺ foram observadas em orelhas controle, e na dupla marcação para CD31 e GFP foi demonstrado que as células fetais se organizam principalmente em torno dos vasos sanguíneos maternos e expressam marcadores característicos de vasos em tecidos inflamados de fêmeas murinas com fetos GFP⁺, denotando a participação de células progenitoras endoteliais na angiogênese materna.

No segundo momento deste estudo, fêmeas C57Bl/6 virgens e paridas foram desafiadas com um inóculo de 1000 tripomastigotas, com sacrifício após 30 dias, a fim de intensificar o modelo de lesão no miocárdio e músculo esquelético e comparar possíveis diferenças de lesões nestes órgãos na fase aguda entre os dois grupos.

Níveis parasitêmicos mais altos entre 15º e o 25º dia de infecção foram observados no grupo de virgens infectadas, porém a diferença não foi estatisticamente significativa comparada com o grupo de mães infectadas. Ambos os grupos atingiram o mesmo pico de infecção no 30º dia. Embora a infecção deste segundo experimento fosse utilizando um inóculo mais alto, nenhum óbito ocorreu nos grupos analisados. A resistência à infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* neste modelo experimental está associada ao *background* genético C57Bl/6, linhagem que constitui um modelo clássico de resistência na infecção por *T. cruzi*, e também pela influência dos hormônios femininos estrógeno e progesterona, que são

responsáveis pela menor susceptibilidade das fêmeas na infecção por *T. cruzi*. A aplicação de estrógeno, progesterona ou ambos resulta em baixos níveis de parasitemia em fêmeas ovariectomizadas comparadas com fêmeas intactas (ROBERT & ALEXANDER, 1998; SCHUURS & HAM, 1990).

De acordo com os achados histológicos, a infecção aguda por *T. cruzi* determinou uma miocardite de diferentes intensidades com destruição massiva das fibras musculares e com o predomínio de infiltrado de células mononucleares, observado nas secções de coração e músculo esquelético de mães e virgens infectadas. Estes achados são característicos da infecção por cepa Colombiana de *T. cruzi*.

Na análise morfométrica de secções do coração e de músculo esquelético foi observado um aumento significativo do infiltrado inflamatório em músculo esquelético no grupo de fêmeas virgens infectadas quando comparadas com mães infectadas, porém somente estes resultados não sustentam a participação de células fetais no remodelamento do músculo esquelético, das mães diminuindo desta forma o grau de inflamação. Comparando o número de ninhos de parasitas no coração e músculo esquelético foi demonstrado um maior número de ninhos no grupo de mães infectadas comparadas com virgens infectadas,

A análise morfométrica no coração e no músculo esquelético para verificar se ocorreu diferença na deposição de colágeno entre os grupos analisados demonstrou que a fibrose foi mais intensa no coração de mães infectadas quando comparadas com virgens infectadas; ocorrendo uma inversão na análise do músculo esquelético, no qual fêmeas virgens infectadas apresentaram fibrose mais elevada em comparação com o grupo de mães infectadas. No entanto, no 30º dia de infecção ainda há pouca deposição de fibrose em ambos os grupos infectados, pois o processo é acentuado após o controle da parasitemia e conseqüente diminuição da inflamação na fase aguda.

A análise da presença do transgene *gfp* no coração e no músculo esquelético por PCR em tempo real demonstrou um aumento significativo da presença do transgene *gfp* nestes dois órgãos de fêmeas infectadas, comparadas com fêmeas sadias. Isso reflete que possivelmente ocorre uma maior migração destas células para áreas de lesão ou uma maior proliferação das mesmas nessas áreas. Embora não tenham sido detectadas células fetais GFP⁺ em nenhum dos órgãos analisados por imunofluorescência em mães sadias com fetos GFP⁺, a presença do transgene *gfp* de origem fetal foi detectada no coração e músculo esquelético neste grupo por PCR em tempo real, indicando uma maior sensibilidade desta técnica na investigação do microquimerismo fetal.

Comparando a presença de *gfp* de origem fetal no coração e músculo esquelético de mães infectadas, foi observado um aumento em média de até três vezes do transgene *gfp* no coração em relação ao músculo esquelético. A fluorescência em tecidos congelados de camundongos transgênicos para GFP⁺ é muito intensa no coração e no músculo esquelético, enquanto que, em alguns tipos celulares, tais como neurônios do córtex cerebral, células da glia, células mesangiais glomerulares e células das ilhotas pancreáticas, a fluorescência é baixa ou até mesmo ausente (BIANKIN *et al.*, 2007). Isso sugere que a visualização de células GFP⁺ no coração e no músculo esquelético, que tenham se diferenciado em células musculares, deva ser intensa e de fácil observação ao microscópio de fluorescência. A detecção, por PCR em tempo real, do transgene *gfp* de origem fetal em tecidos lesados comparados com tecidos sadios tem sido relatada por diversos autores (TAN *et al.*, 2005; KHOSROTEHRANI *et al.*, 2007; HUU *et al.*, 2007), demonstrando que células fetais, provavelmente células-tronco ou progenitoras, são atraídas para áreas de lesão.

Fujiki e colaboradores (2008) comparando a quantificação da proteína verde fluorescente em duas linhagens transgênicas de camundongos C57Bl/6 EGFP⁺ e C57Bl/6 ROSA 26 EGFP⁺ pela técnica de citometria de fluxo e PCR em tempo real demonstraram que

a técnica de PCR em tempo real é mais sensível na detecção do transgene em animais C57Bl/6 EGFP comparando com camundongos C57Bl/6 ROSA 26 EGFP⁺. Na análise comparativa na expressão da proteína GFP em diversos tecidos de camundongos GFP⁺ sob o controle do promotor de beta actina (CBA) e de camundongos GFP⁺ sob o controle da ubiquitina humana (UBC), a expressão de GFP é bastante variável nos tecidos analisados, animais CBA apresentam alta variação na expressão de GFP no fígado, rim e intestino, enquanto que animais UBC expressam fracamente a proteína GFP em órgãos sólidos e sendo essa expressão variável no sangue (Swenson et al., 2007).

A associação de diversas técnicas, como citometria de fluxo, imunofluorescência, PCR em tempo real e hibridização *in situ*, potencializa as chances de elucidação do possível papel de células fetais no organismo materno. Estudos subseqüentes devem ser realizados no modelo experimental da infecção por *T. cruzi*, na tentativa de detectar células fetais e sua associação com lesões teciduais nos diversos tecidos lesados. O melhor entendimento dos fatores que promovem os processos de migração e de reparo tecidual pelas células fetais poderá contribuir para o desenvolvimento de novas terapias regenerativas.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. Células fetais GFP⁺ podem ser detectadas na circulação de fêmeas C57Bl/6 uma semana pós-parto;
2. O microquimerismo fetal está presente no coração, fígado e músculo esquelético de fêmeas paridas de camundongos na fase aguda da infecção por *T. cruzi*;
3. Células fetais GFP⁺ expressam marcador característico de células de músculo estriado no coração e músculo esquelético nos tecidos residentes;
4. A presença do transgene *gfp* de origem fetal é aumentada pela infecção por *T. cruzi* no coração e no músculo esquelético, em comparação com fêmeas sadias;
5. A presença do transgene *gfp* de origem fetal foi mais elevada no coração que no músculo esquelético na fase aguda da infecção por *T. cruzi*;
6. Os nossos resultados demonstram que células fetais podem contribuir para o reparo tecidual do coração e músculo esquelético, pelo menos no modelo de infecção aguda por *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, A.Z. Patologia experimental da doença de Chagas, In: BRENER, Z; ANDRADE, A.Z; NETTO-BARRAL, M. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2 ed; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000a.
2. ARTLETT CM, SMITH JB, JIMENEZ SA. **Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis**. N Engl J Med. 338 (17): 1186-1191, 1998.
3. BIANCHI DW, ZICKWOLF GK, WEIL GJ, SYLVESTER S, DEMARIA MA. **Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum**. Proc Natl Acad Sci U S A 93:705-708, 1996.
4. BOUZAHAZAH, B ET AL. **Cell cycle regulatory proteins in the liver in murine *Trypanosoma cruzi***. Cell cycle. 5 (20): 2396-2400, 2006.
5. CAMANDARоба E; THÉ, S, TORRICELLI, PESSINA, H, B; ANDRADE, G, S. ***Trypanosoma cruzi*: clones isolated from the Colombiana strain reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism**. Int J Exp Path. 87: 209-217, 2006.
6. CAMPOS, R.VF; ANDRADE, S.G. **Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91:795-780.
7. CAROL M. ARTLETT. **Pathophysiology of fetal microchimeric cells**. Clinica Chimica Acta 360: 1 –8, 2005.
8. CATHERINE M.VERFAILLIE. **Adult stem cells: assessing the case for pluripotency**. TRENDS in Cell Biology 12(11), 2002.

9. CHRISTNER PJ, ARTLETT CM, CONWAY RF AND JIMENEZ. **Increased numbers of microchimeric cells of fetal origin are associated with dermal fibrosis in mice following injection of vinyl chloride.** *Arthritis Rheum* 43: 2598–2605, 2000.
10. DAVID L. STOCUM. **Stem Cell in Regenerative Biology and Medicine.** *Wound Rep Reg*, 9: 429-442, 2001.
11. FEDERICI EE, ABELMANN WB AND NEVA FA. **Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Am J Trop Med Hyg* 13: 272-280, 1964.
12. FORTIN, A; CARDON, R. L; TAM, M; SKAMENE, E; STEVENSON, M. M; GROS, P. **Identification of a new malaria susceptibility locus (Char4) in recombinant congenic strains of mice.** *PNAS* 98(19): 10793-10798, 2001.
13. FUJIKI YUTAKA ET AL. **Quantification of green fluorescent protein by in vivo imaging, PCR, and flow cytometry: Comparison of transgenic strains and relevance for fetal cell microchimerism.** *Cytometry A* 73(2): 111-118, 2008.
14. HALL JG. **The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists.** *Clin Genet* 72:67–73 2007.
15. HISAO OSADA, SHIGEHARU DOI, TAKASHI FUKUSHIMA, HIROMITSU NAKAUCHI, KATSUYOSHI SEKI, AND SOUEI SEKIYA. **Detection of fetal HPCs in maternal circulation after delivery.** *TRANSFUSION* 41: 499-503, 2001.
16. IKADA, Y. **Challenges in tissue engineering.** *J. R. Soc. Interface*, 3:589-601, 2006.
17. JOHNSON KL, SAMURA O, NELSON JL, MCDONNELL M AND BIANCHI DW. **Significant fetal cell microchimerism in a non-transfused woman with hepatitis C: evidence of long-term survival and expansion.** *Hepatology* 36: 1295–1297, 2002.

18. KIARASH KHOSROTEHRANI, R.R.REYES, K.L.JOHNSON, R.B.FREEMAN, R.N.SALOMON, I.PETER, H.STROH, S.GUÉGAN, D.W.BIANCHI. **Fetal cells participate over time in the response to specific types of murine maternal hepatic injury.** Human Reproduction 22(3): 654–661, 2007.
19. KARIN SPAT ALBINO BARCELLOS E LUÍS EDUARDO COELHO ANDRADE. **Microquimerismo Fetal-Materno nas Doenças Reumáticas Auto-Imunes.** Rev Bras Reumatol, 44 (1) 53-61, 2004.
20. KIARASH KHOSROTEHRANI, DIANA W. BIANCHI. **Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse.** Journal of Cell Science 118 (8), 2005b.
21. KIARASH KHOSROTEHRANI, KIRBY L. JOHNSON, SARAH GU'EGAN, HELENE STROH, DIANA W. BIANCHI. **Natural history of fetal cell microchimerism during and following murine pregnancy.** Journal of Reproductive Immunology 66:1–12, 2005a.
22. KIARASH KHOSROTEHRANI, TUANGSIT WATAGANARA, DIANA W.BIANCHI, KIRBY L.JOHNSON. **Fetal cell-free DNA circulates in the plasma of pregnant mice: relevance for animal models of fetomaternal trafficking.** Human Reproduction 19(11): 2460–2464, 2004b.
23. KIARASH KHOSROTEHRANI, KIRBY L. JOHNSON, DONG HYUN CHA, ROBERT N. SALOMON, DIANA W. BIANCHI. **Transfer of Fetal Cells With Multilineage Potential to Maternal Tissue.** JAMA 292(1): 75-80, 2004a.
24. KIRBY L.JOHNSON AND DIANA W.BIANCHI. **Fetal cells in maternal tissue following pregnancy: what are the consequences?** Human Reproduction Update 10 (6): 497–502, 2004.
25. K.O'DONOGHUE, M.CHOOLANI, J.CHAN, J.DE LA FUENTE, S.KUMAR, C.CAMPAGNOLI, P.R.BENNETT, I.A.G.ROBERTS² AND N.M.FISK. **Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for**

- non-invasive prenatal diagnosis.** *Molecular Human Reproduction* 9,(8): 497-502, 2003.
26. KRABCHI K, GROS-LOUIS F, YAN J, BRONSARD M, MASSE' J, FOREST J-C, DROUIN R. **Quantification of all fetal nucleated cells in maternal blood between the 18th and 22nd weeks of pregnancy using molecular cytogenetic techniques.** *Clin Genet* 60:145–150, 2001.
27. LIEGEÓIS A, GAILLARD MC, OUVRE E et al. **Microchimerism in pregnant mice.** *Transplant Proc* 13 : 1250-1252, 1981.
28. MARTINA FRITSCH, LUCIANE C. BATISTA, FÁBIO F. PASQUALOTO, ELEONORA B PASQUALOTTO. **Células-tronco: aspectos gerais.** CÉLULAS-TRONCO, visão do especialista. Cap.1, p.19, EDUCS, 2007.
29. M KUROKI, A OKAYAMA, S NAKAMURA, T SASAKI, K MURAI, R SHIBA, M SHINOHARA, H TSUBOUCHI. **Detection of maternal-fetal microchimerism in the inflammatory lesions of patients with Sjögren's syndrome.** *Ann Rheum Dis* 61: 1041–1046, 2002.
30. M. MURACA, G. GALBIATI, G. REALDI, M.T. VILEI, A. SUELI COELHO FABRICIO, M. CARUSO. **Regenerative Medicine: An Insight.** *Transplantation Proceedings*, 39:1995–1998, 2007.
31. MALCOLM R. ALISON, RICHARD POULSOM, STUART FORBES, NICHOLAS A. WRIGHT. **An introduction to stem cells.** *J Pathol* 197: 419–423, 2002.
32. MASARU OKABE, MASAHITO IKAWA, KATSUYA KOMINAMI, TOMOKO NAKANISHI, YOSHITAKE NISHIMUNE. **“Green mice” as source of ubiquitous green cells.** *FEBS Letters* 407: 313-319, 1997.

33. MICHAEL KLINTSCHAR, UTA-DOROTHEE IMMEL, ASTRID KEHLEN, PATRIZIA SCHWAIGER, TAREK MUSTAFA, SEBASTIAN MANNWEILER, SIGRID REGAUER, MANFRED KLEIBER, CUONG HOANG-VU. **Fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis: a quantitative approach.** European Journal of Endocrinology 154: 237–241, 2006.
34. MILES, A. M; FELICIANGELI, D. M; ARIAS, R. A. **American trypanosomiasis (chagas disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies.** BMJ 326: 1444-1448, 2003.
35. NATHALIE C. LAMBERT, Y. M. DENNIS LO, TIMOTHY D. ERICKSON, TRACY S. TYLEE, KATHERINE A. GUTHRIE, DANIEL E. FURST, AND J. LEE NELSON. **Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA?Aquantitative answer.** BLOOD, 100 (8): 2845-2852, 2002.
36. NEDIME SERAKINCI, W. NICOL KEITH. **Therapeutic potential of adult stem cells.** European Journal of Câncer 4 2:1 2 4 3 –1 2 4 6, 2 0 0 6 .
37. NELSON, J. L. ET AL. **Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma.** Lancet 351: 559-562, 1998.
38. [NGUYEN HUU S](#), [DUBERNARD G](#), [ARACTINGI S](#), [KHOSROTEHRANI K](#). **Feto-maternal cell trafficking: a transfer of pregnancy associated progenitor cells.** [Stem Cells Reviews](#) 2(2): 111-116, 2006.
39. P. INVERNIZZI, C. DE ANDREIS, S. M. SIRCHIA, P. M. BATTEZZATI, M. ZUIN, F. ROSSELLA, F. PEREGO, M. BIGNOTTO, G. SIMONI, M. PODDA. **Blood fetal microchimerism in primary biliary cirrhosis.** Clin Exp Immunol 122:418-422, 2000.
40. PASSO, C. A. L; SAKURADA, K. J; GUARALDO, A. M. A; ORTIZ, C. B. C. S; RANGEL, A. H; GUENET, L. J. **Chagas fenômeno da resistência.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.29, p.26-31, 2005.

41. PAUL C. EVANS, NATHALIE LAMBERT, SEAN MALONEY, DAN E. FURST, JAMES M. MOORE, AND J. LEE NELSON. **Long-Term Fetal Microchimerism in Peripheral Blood Mononuclear Cell Subsets in Healthy Women and Women With Scleroderma.** *Blood* 93(6): 2033-2037, 1999.
42. [PERTL B, BIANCHI DW.](#) **Fetal DNA in maternal plasma: emerging clinical applications.** *Obstet Gynecol.* 98(3): 483-90, 2001.
43. POWELL, R. M; WASSOM, L. D. **Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Antibody isotype profiles.** *Parasite Immunology* 15: 215-221, 1993.
44. SANDRA A. BIANKIN, MICHAEL I. COLLECTOR, ANDREW V. BIANKIN, LINDSEY J. BROWN, WOLFRAM KLEEBERGER et al. **A histological survey of green fluorescent protein expression in ‘green’ mice: implications for stem cell research.** *Pathology* 39(2): 247-251, 2007.
45. SAU NGUYEN HUU, MICHE’ LE OSTER, SERGE UZAN, FABRICE CHAREYRE, SE’ LIM ARACTINGI, AND KIARASH KHOSROTEHRANI. **Maternal neoangiogenesis during pregnancy partly derives from fetal endothelial progenitor cells.** *PNAS* 104(6): 1871–1876, 2007.
46. SERAKINCI N; KEITH, N, W. Therapeutic potential of adults stem cells. *European Journal of Cancer*, 42: 1243-1246, 2006.
47. SWENSON ES, PRICE JG, BRAZELTON T, KRAUSE TS. **Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker.** *Stem Cells* 25(10): 2593-2600, 2007.
48. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The chagas’ disease.** Disponível em <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>>. Acesso em 25 abr. 2005.

49. XIAO-WEI TAN, HONG LIAO, LI SUN, MASARU OKABE, ZHI-CHENG XIAO, GAVIN S. DAWE. **Fetal microchimerism in the maternal mouse brain: a novel population of fetal progenitor or stem cell able to cross the blood –brain barrier?** *Stem Cells* 23: 1443-1452, 2005.
50. YUAN, S JOSHUA, REED ANN, CHEN FENG, NEAL STUART Jr. **Statistical analysis of real-time PCR data.** *BMC Bioinformatics*, 7(85): 1-12, 2006.
51. YU WANG, HIROTSUGU IWATANI, TAKAHITO ITO, NAOKO HORIMOTO, MASAYA YAMATO, ISAO MATSUI, ENYU IMAI, MASATSUGU HORI. **Fetal cells in mother rats contribute to the remodeling of liver and kidney after injury.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 961–967, 2004.