

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO, CRIOPRESERVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE
CÉLULAS TRONCO, DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA E GELATINA
DE WHARTON CANINA, VISANDO A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE
CÉLULAS TRONCO

ISADORA ARRUDA

Botucatu – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO, CRIOPRESERVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DE
CÉLULAS TRONCO, DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA E GELATINA
DE WHARTON CANINA, VISANDO A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE
CÉLULAS TRONCO

ISADORA ARRUDA

Dissertação apresentada junto ao programa de
Pós-graduação em Biotecnologia para
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr^a. Fernanda da Cruz
Landim

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Arruda, Isadora.

Caracterização, criopreservação e diferenciação *in vitro* de células tronco, derivadas de membrana amniótica e gelatina de Wharton canina visando a formação de um banco de células tronco / Isadora Arruda. - Botucatu, 2014

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Cão. 2. Células-Tronco. 3. Cordão umbilical. 4. Criopreservação. 5. Geleia de Wharton. 6. Âmnio.

Palavras-chave: Célula tronco mesenquimal canina; Cordão umbilical; Membrana extraembrionária.

Nome do Autor: Isadora Arruda

Título: CARACTERIZAÇÃO, CRIOPRESERVAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO, DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA E GELATINA DE WHARTON CANINA, VISANDO A FORMAÇÃO DE UM BANCO DE CÉLULAS TRONCO

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Profª Drª Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Membro

Departamento Medicina Veterinária

FZEA – USP – Pirassununga

Data da defesa: 10 de Junho de 2014.

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação aos meus pais,
Walmir e Lúcia e irmãos Natália e Vitor,
pois essa conquista só foi alcançada com o
apoio de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível, se não fosse por vocês, cada um teve seu papel importante nessa trajetória, muito obrigada a todos!!!

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por tantas graças na minha vida, sem Ele no comando tudo ficaria mais difícil!

Aos meus pais, Walmir e Lúcia, pelo amor dedicado a mim, pelo exemplo de luta e determinação e pelo apoio financeiro em toda minha trajetória acadêmica. Meus amores, se cheguei até aqui é porque Deus me colocou na melhor família que poderia ter, muito obrigada pelo apoio e carinho!

À minha querida irmã, Natália, amiga e companheira, em toda e qualquer hora, você foi muito importante nas minhas escolhas, sempre me ensinou muitas coisas, a vida toda. Obrigada por sua presença, sempre que possível. Pelas orações nos momentos difíceis, pelas conversas jogadas fora, horas e horas pelo celular, enfim por tudo!

Ao meu irmão Vitor e minha cunhada Daiane, por torcerem por mim e por me darem o exemplo de garra e determinação, que os dois possuem e eu admiro muito.

Agradeço a minha “bebezinha” Kate (minha cachorra), chegou e transformou minha vida, amor incondicional.

À minha família querida, avós paternos e maternos, tios e primos, sempre presentes me apoiando e me estimulando a continuar sempre.

Em especial gostaria de agradecer ao meu querido namorado, Maurício, que além de companheiro é meu amigo e está ao meu lado em todos os momentos, mesmo que a alguns quilômetros de distância. Obrigada pelas críticas construtivas, pelas inúmeras correções dessa dissertação, por me apoiar nas minhas decisões.

À minha querida sogra, Claribel (Bel), pelo apoio e carinho que tem por mim, por me socorrer nas horas difíceis, agradeço por toda ajuda.

Às minhas queridas Luluzinhas (Amigas de Botucatu) Carla, Grazi, Gi, May, Mi e Flavinha, obrigada meninas pelos anos de amizade, devido à correria do dia a dia, pouco conseguimos nos ver, mas sempre que é possível, passamos tardes maravilhosas, obrigada pelo apoio meninas, amo vocês!!

Agradeço Prof. Fernanda Landim, querida orientadora, pela confiança depositada em mim, pois sem me conhecer, deu a oportunidade de realizar meu sonho, desenvolver a Pós-graduação na Unesp/Botucatu, inicialmente com o treinamento

técnico (2011), seguido pelo Mestrado (2012-2014). Por todos os conselhos, pelo exemplo de seriedade e compromisso profissional e por compartilhar comigo sua experiência. MUITÍSSIMO obrigada por tudo!

Gostaria de agradecer especialmente a Prof. Denise, pois foi ela que me abriu as portas, serei eternamente grata. Obrigada pelo carinho e pelas palavras que me ofereceu em momentos oportunos. Um exemplo para mim.

À minha querida amiga Xuxu (Camila Chavier), devo tudo que sei à ela. Obrigada por todos os momentos compartilhados, horas e horas no laboratório, que parecia não acabar nunca, mas acabou, e você me abandonou, voltou para sua querida São Paulo. Obrigada pela amizade, carinho, por horas de conversa, pelas baladas e *happy hours* compartilhados. Saudades amiga!

Aos meus colegas do laboratório, Amanda, Midyan, Celina, Mari, Leandro, Marta, Dani, Dani (FIV), Luis, Mateus, Rosiara, Bruna, Loreta, Carol Destro e Denis, pelas ideias compartilhadas, e pelos momentos de descontração.

A minha querida amiga Bianca, Deus colocou você em minha vida e eu só tenho a agradecer, pela companhia de sempre, carinho, conselhos, desabafos. Obrigada por tudo mesmo, tenho um carinho enorme por você!

Agradeço ao Ian, Pós doutorando, pela amizade, apoio no experimento, conselhos oferecidos com sabedoria.

Às meninas do Hemocentro, Mari e Marjorie, obrigada pelas análises, pelo profissionalismo e comprometimento. Mari obrigada por acompanhar todas as minhas análises, pelas conversas, você é muito querida!

Aos residentes do Departamento de Reprodução, em especial a Michelle e a Marianne no primeiro ano, e aos meninos Endrigo, Luiz Fernando, Sidnei e Felipe no segundo ano, que realizaram as cesarianas, onde obtive minhas amostras para o experimento, assim como os residentes da Anestesiologia.

Agradeço às cadelas submetidas às cesarianas, sem elas o experimento não seria possível!

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal Cris, Edilson, Valter e a querida Dona Raquel, pelas conversas na hora do almoço, cada um fez sua parte para manter a ordem e a organização do departamento, muito obrigada!

À querida Universidade de Marília, instituição que me formei com muita dedicação, e que me deu suporte suficiente para chegar até aqui. Em especial ao Prof. Alexandre Hataka (hoje professor da Unesp/Botucatu... que orgulho!!), querido, que

me orientou na iniciação científica e ao Prof. Rodrigo Prevedelo Franco, sempre me apoiaram e incentivaram a seguir carreira acadêmica, e comemoraram comigo todas as minhas conquistas. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também aos estagiários que passaram pelo laboratório não lembro o nome de todos, mas fica aqui registrado, obrigada pela ajuda de todos!

Agradeço à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido, sem o qual não seria possível o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a CAPES, pela bolsa concedida.

Obrigada a todos que torceram por mim, tem um pouco de cada um nesta conquista!

Epigrafe

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar nos sonhos que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém...
...Quem acredita sempre alcança!”
(Renato Russo/Flávio Venturini)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Fonte: Adaptada de McGeedy et al. (2006). Esquema das membranas fetais em cavalos e carnívoros, no terço médio de gestação, a Ectoderma é apresentado com a linha grossa na cor preta, a Mesoderma pela linha tracejada e a Endoderme pela linha cinza. Com isso podemos esclarecer que a membrana amniótica tem origem do Mesoderma e Ectoderma e o cordão umbilical das três camadas germinativas. 6
- FIGURA 2. Característica fibroblastóide das células antes da criopreservação da Membrana Amniótica (A) e Gelatina de Wharton (B) e após a criopreservação MA (C) e GW (D)..... 21
- FIGURA 3. Gráfico de tempo de aderência ao plástico (horas), das células de Membrana Amniótica e Gelatina de Wharton, antes e após a criopreservação..... 21
- FIGURA 4. Gráfico de tempo (horas) entre as passagens das células de Membrana Amniótica e Gelatina de Wharton. 22
- FIGURA 5. Gráfico referente à contagem celular nas três passagens das CTMs de Membrana Amniótica, antes e após a criopreservação..... 23
- FIGURA 6. Gráfico de contagem celular nas três passagens das CTMs de Gelatina de Wharton, antes e após a criopreservação. 24
- FIGURA 7. Diferenciação *in vitro* das CTMs de membrana amniótica em 3ª passagem, antes e após a criopreservação. Células cultivadas em meio indutor osteogênico e corado com *Vermelho de alizarina* evidenciando as mineralizações de cálcio no meio extracelular antes a criopreservação (A) e após a criopreservação (B). As células cultivadas em meio basal (DMEM – baixa glicose + 20% SFB) corados com *Alizarin Red* demonstrando que mesmo sem a adição de meio indutor, as células produziram espontaneamente mineralização do meio extracelular (controle negativo), antes a criopreservação (C) e após (D). Fotos tiradas em microscópio de luz - 100µm. 25
- FIGURA 8. Diferenciação *in vitro* negativa das CTMs de Gelatina de Wharton, antes da criopreservação, mantidas em meio indutor osteogênico e corado com *Alizarin Red*. Foto tirada em microscópio de luz - 200 µm..... 26
- FIGURA 9. Diferenciação *in vitro* das CTMs da GW em terceira passagem antes e após a criopreservação. Células cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica e corados com *Vermelho de Alizarina* (Sigma) apresentaram mineralização do cálcio antes (A) e após (B) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal coradas com *Vermelho de Alizarina* demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as células apresentam espontaneamente mineralização do cálcio (controle negativo), antes da criopreservação (C) e após (D). Fotos tiradas em microscópio de luz – A e C) 100 µm e B e D) 200 µm. 27
- FIGURA 10. Diferenciação *in vitro* das CTMs da MA em terceira passagem antes e após a criopreservação. As células cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e corados com *Oil Red* (Sigma) e contracorada com Hematoxilina apresentaram gotículas lipídicas no citoplasma celular antes (A) e após (B) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal foram coradas da mesma forma e demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as

células apresentam espontaneamente gotículas lipídicas no citoplasma celular (controle negativo), antes da criopreservação (C) e após (D). As células porém mantiveram a morfologia fibroblastóide. Foto tirada em microscópio de luz – A) 50 µm e B,C e D) 100 µm. 28

FIGURA 11. Diferenciação *in vitro* das CTMs da GW em terceira passagem antes e após a criopreservação. As células cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e corados com *Oil Red* e contracorada com Hematoxilina apresentaram gotículas lipídicas no citoplasma celular antes (A) e após (C) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal foram coradas da mesma forma demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as células apresentam espontaneamente gotículas lipídicas no citoplasma celular (controle negativo), antes da criopreservação (B) e após (D). Notar a manutenção da morfologia fibroblastóide. Fotos tiradas em microscópio de luz – A, C e D- 100 µm e D- 50 µm..... 29

FIGURA 12. Perfil imunofenotípico (CD44) de células de Membrana amniótica em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD44 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo. 30

FIGURA 13. Perfil imunofenotípico (CD34) de células de Membrana Amniótica em segunda passagem antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo. 31

FIGURA 14. Perfil imunofenotípico (MHCII) de células de Membrana Amniótica em segunda passagem antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo. 31

FIGURA 15. Perfil imunofenotípico (CD44) de células de Gelatina de Wharton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo. 32

FIGURA 16. Perfil imunofenotípico (CD34) de células de Gelatina de Wharton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo. 33

FIGURA 17. Perfil imunofenotípico (MHCII) das células de Gelatina de Wharton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). 33

FIGURA 18. Análise por imunocitoquímica das células de Membrana Amniótica. O controle (A) sem a utilização do anticorpo anti-Vimentina, permaneceu não corado, e a marcação (B) indicando característica de CTMs. Foto tirada em microscópio de luz – 100 µm. 34

FIGURA 19. Análise por imunocitoquímica das células obtidas da Gelatina de Wharton. O controle (A) sem a utilização do anticorpo anti-Vimentina, permaneceu não corado, e a marcação (B) indicando característica de CTMs. Foto tirada em microscópio de luz – 100 µm. 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Efeito da criopreservação no tempo de diferenciação osteogênica e adipogênica das Células Tronco Mesenquimais provenientes da Membrana Amniótica.....	28
TABELA 2. Efeito da criopreservação no tempo de diferenciação osteogênica e adipogênica das Células Tronco Mesenquimais provenientes da Gelatina de Wharton.....	30
TABELA 3. Efeito da criopreservação sobre a marcação (anticorpos monoclonais) nas células de Membrana Amniótica.....	32
TABELA 4. Efeito da criopreservação sobre a marcação (anticorpos monoclonais) nas células de Gelatina de Wharton.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

CT - Célula Tronco
CTA – Célula Tronco Adulta
CTM – Células Tronco Mesenquimal
CTH – Célula Tronco Hematopoiética
MO – Medula Óssea
CTE – Célula Tronco Embrionária
iPS – Células Tronco de Pluripotência induzida
CD – “Cluster Designation” - Classificação para anticorpos monoclonais
HLA-DR – Antígenos Leucocitários Humanos
TA – Tecido adiposo
SCU – Sangue do cordão umbilical
GW – Gelatina de Wharton do inglês – Wharton’s Jelly
MA – Membrana amniótica
MHC I e II – Complexo principal de histocompatibilidade do Tipo I e II
DMSO – Dimethylsulfoxido
HBSS – Bank’s Balanced Salt Solution
FCR – Força centrífuga relativa
Xg – Força gravitacional
DMEM-LG – Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose
T25 – Garrafa para cultivo no tamanho 25 cm²
SFB – Soro fetal bovino
mL – Mililitro
mM – Milimolar
Mg₂₊ – Magnésio
Ca₂₊ – Cálcio
LANÇA – Laboratório de Terapia Celular e Reprodução Avançada
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
UNESP – Universidade Estadual Paulista

ARRUDA, I. Caracterização, criopreservação e diferenciação *in vitro* de células tronco, derivadas de membrana amniótica e gelatina de Wharton canina visando a formação de um banco de células tronco. **Botucatu, 2014. 100p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes na maioria dos tecidos adultos, e por isso são atrativas para a terapia celular, pois possuem alto potencial de diferenciação e proliferação, sendo assim, utilizadas na reconstrução tecidual. O presente experimento objetivou obter maior conhecimento sobre CTMs derivadas da membrana amniótica e cordão umbilical de cães, antes e após criopreservação, visando a formação de um banco de células. Assim, oito amostras de membrana amniótica e oito amostras de gelatina de Wharton foram obtidas de cesarianas, as quais foram submetidas a digestão enzimática, e cultivadas em meio basal. Uma porção celular, de cada amostra, foi criopreservada em 1ª passagem, de forma lenta, e armazenada por 4 semanas. As células antes e após a criopreservação foram submetidas à caracterização, onde foi observado características de adesão, proliferação, diferenciação e expressão de marcadores de superfícies utilizando-se citometria de fluxo, e imunocitoquímica. A partir destas avaliações, foi possível demonstrar que as células antes e após a criopreservação exibiram comportamento semelhante, quanto à proliferação e crescimento. A viabilidade celular da membrana amniótica apresentou 97,0% das células viáveis antes da criopreservação e 94,6% após, já a gelatina de Wharton 98,8 antes e 93,5% após a criopreservação. O potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica foi mantido, no entanto foi necessário um tempo maior ($p < 0,05$) para que as células de gelatina de Wharton se diferenciassem após a criopreservação. E ainda mantiveram a expressão de CD44, em níveis satisfatórios para que fossem consideradas positivas, onde a membrana amniótica expressou 85,6% antes e 67,8% após a criopreservação e a gelatina de Wharton expressou 86,0% antes e 82,1% após a criopreservação e a ausência de expressão dos CD34 e MHC II. Uma característica peculiar observada foi que antes e após a criopreservação ocorreu a diferenciação espontânea dos controles não induzidos a diferenciação, nas duas linhagens (osteogênica e adipogênica). Concluímos que as células, após 4 semanas de criopreservação, mantém as características de CTMs, reafirmando a característica de imunoantigenicidade, porém são necessários estudos aprofundados relacionados à diferenciação espontânea.

Palavras-chave: Célula tronco mesenquimal, membrana extraembrionária, cordão umbilical, cão.

ARRUDA, I. In vitro characterization, cryopreservation and differentiation of stem cells derived from amniotic membrane and canine Wharton's jelly aiming a stem cells bank. **Botucatu, 2014. 100p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are present in most of adult tissues, and are therefore attractive for cell therapy. Because of their high potential for differentiation and proliferation, they are being used in tissue reconstruction. This experiment aimed to enrich knowledge of canine MSCs derived from umbilical cord and amniotic membrane before and after cryopreservation regarding the formation of a cell bank. Thus, eight samples of amniotic membrane and eight samples of Wharton's jelly were obtained from dogs at birth, which were subjected to enzymatic digestion and basal medium culture. Slow freezing of a sample from each culture was held at the first passage and stored for four weeks. Before and after freezing cells were subjected to characterization being observed adhesion, proliferation, differentiation and expression of surfaces markers using flow cytometry and immunocytochemistry. Based on these analyses it was demonstrated that the cells before and after cryopreservation exhibited similar behavior for proliferation and cell growth. Cell viability of amniotic membrane showed 97.0% of viable cells before freezing and 94.6% after, and the Wharton's jelly 98.8% before and 93.5% after cryopreservation. The potential of the osteogenic and adipogênica differentiation as well as maintained, however it required a longer time ($p < 0.05$) for the cells from Wharton's jelly to differentiate themselves after freezing. And still maintained the expression of CD44, at satisfactory levels to be considered positive, where the amniotic membrane expressed 85.6% before and 67.8% after freezing and Wharton's Jelly expressed 86.0% before and 82.1% after cryopreservation and absence of expression of CD34 and MHC II. A peculiar feature observed was that before and after freezing spontaneous differentiation in both lineages (osteogenic and adipogenic) occurred in the controls that were not induced to differentiation. We conclude that after 4 weeks cryopreservation the cells maintain MSCs features, confirming the characteristic of imunoantigenicidade however extensive studies related to the spontaneous differentiation are needed.

Key-words: Mesenchymal stem cell, extra-embryonic membrane, umbilical cord, dog.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Células tronco	3
3.2 Células Tronco Mesenquimais	4
3.3 Membranas Extra-embrionárias	6
3.3.1 Membrana Amniótica.....	7
3.3.2 Cordão umbilical	8
3.4 Medicina Regenerativa.....	10
3.5 Bancos de célula tronco	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Obtenção das amostras.....	14
4.1.2 Membrana Amniótica.....	14
4.1.3. Gelatina de Whaton.....	15
4.2 Passagens	15
4.3 Criopreservação	16
4.4 Caracterização.....	16
4.4.1 Citometria de Fluxo.....	17
4.4.2 Imunocitoquímica	17
4.4.3 Diferenciação Celular.....	17
4.5 Tratamentos e Delineamento Experimental	18
4.6 Análises Estatísticas	18
5. RESULTADOS.....	20
5.1 Comportamento celular.....	20

5.2 Viabilidade Celular	22
5.3 Contagem celular	23
5.4 Caracterização	24
5.4.1. Diferenciação Osteogênica.....	24
5.4.2. Diferenciação Adipogênica	27
5.4.4 Citometria de Fluxo.....	30
5.4.5. Imunocitoquímica	34
4. DISCUSSÃO	36
4.1 Comportamento celular.....	36
4.2 Contagem celular até a terceira passagem.....	36
4.3 Viabilidade celular	37
4.4 Caracterização antes e após a criopreservação das CTMs	38
4.4.1 Potencial de diferenciação em linhagem mesenquimal.....	38
4.4.2 Caracterização Imunofenotípica por Citometria de Fluxo	40
4.4.3 Imunocitoquímica	41
5. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	44
Trabalho a ser enviado para a revista Stem Cell Research.....	61

1. INTRODUÇÃO

A utilização de animais para estudos pré-clínicos é uma prática comum em todas as áreas da medicina, inclusive na de terapia celular. Através destes é possível identificar características fundamentais das células tronco ou mesmo da fisiologia da doença para tratamento sendo possível inclusive a cura de diversas doenças, que hoje apenas se tem controle.

Dentre as doenças estudadas, as degenerativas neurais são as principais, pois são doenças onde se perde células de forma definitiva, sem que o organismo possa repô-las efetivamente. Dentre elas o Parkinson e o Alzheimer recebem atenção especial, onde a substituição de células danificadas ou doentes deverá ser feita por células tronco saudáveis, tentando assim induzir a cura ou talvez chegar próximo à ela (MONTANICCI et al., 2011).

O termo “célula-tronco” (CT) vem de uma tradução literal do inglês “stem cell”, e foi adotada desde o princípio pelo meio científico e imprensa nacional, contudo existem outras expressões que descrevem melhor sua função: *célula madre* em castelhano, *cellula staminale* em italiano, e em Portugal eles utilizam *célula-mãe* ou *célula estaminal* (ZAGO & COVAS, 2006).

Elas estão presentes em quase todos os tecidos do corpo e permanecem lá por toda a vida, porém são diferentes dos demais tipos celulares, por se apresentarem indiferenciadas sendo responsáveis pela regeneração fisiológica do indivíduo.

As Células Tronco Adulta (CTA), podem ser chamadas de multipotentes, pois possuem característica de se diferenciar em diversos tecidos da mesma origem. Dentre elas podemos citar as Células Tronco Mesenquimais (CTM) e as Células Tronco Hematopoiéticas (CTH). Com relação as células tronco unipotentes, estas originam somente um tipo celular do tecido, sendo exemplo a célula tronco espermatogonial e células de pele.

A capacidade celular de um tecido adulto em se diferenciar em diversos outros, atribui a ela um extraordinário potencial terapêutico. Além disso, pesquisas evidenciam a existência dessas células na maioria dos órgãos e tecidos, todavia é necessário um melhor conhecimento quanto à manutenção e diferenciação dessas células *in vitro* e *in vivo* (BAKSH et al., 2004; YARAK & OKAMOTO, 2010).

As primeiras CTMs identificadas foram obtidas da Medula Óssea (MO), entretanto, ela possui uma quantidade muito pequena dessas células, aproximadamente 0,001 a 0,01% do total de células nucleadas (PITTENGER et al., 1999). Atento a este fato, iniciou-se uma busca por fontes que proporcionassem maior obtenção de células tronco mesenquimais de forma menos invasiva, assim como o tecido adiposo.

Uma fonte alternativa, que acredita-se possuir características intermediárias entre CTMs e Células Tronco Embrionárias (CTEs) são as de membranas extra-embrionárias (CREMONESI et al., 2011). Este material é de fácil acesso, não invasivo, (obtido no momento do parto), e por serem mais primitivas que as CTAs possuem maior capacidade de diferenciação, mantendo um baixo risco de produção de tumores (FERNANDES et al., 2012).

Em contrapartida, a utilização de tecidos fetais como fonte de CTMs é recente e não é totalmente segura, para tanto se fez necessário à criação de bancos de células de cordão umbilical e recentemente de CTMs, para armazenar esses tecidos ou células para futuras aplicações. Na área humana, já existem diversos bancos espalhados pelo mundo, inclusive no Brasil, na expectativa de utilização dessas células, de forma segura e efetiva.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Células tronco

Nos últimos anos a ciência vem encontrando diversas formas de utilizar as células tronco como uma nova ferramenta biotecnológica, empregada na medicina regenerativa, com o objetivo de contribuir para o tratamento e/ou cura para diversas doenças (GOMES & PRANKE, 2008).

A utilização de modelos animais para estudos pré-clínicos, parte do pressuposto que essas células e algumas estruturas são similares às de humanos, e a eleição da espécie utilizada ocorre, principalmente, observando características específicas que se assemelham entre espécies (JIN et al., 2007; GUEST et al., 2008, FU et al., 2010; REQUICHA et al., 2012; KUTZLER et al., 2012; DUAN et al. 2013; TANG et al., 2013; YUAN et al., 2013).

Por definição, CTs são células indiferenciadas que se mantêm nos tecidos podendo se multiplicar quando estimuladas (IGLÉZIAS, 2004; ZAGO & COVAS, 2006), através de divisões assimétricas, ou seja, por meio de mitoses ela irá gerar uma célula idêntica a ela (indiferenciada), e ainda, uma célula diferenciada com a característica do tecido no qual se aloja (CÂMARA et al., 2008; CARDOSO & ARRUDA, 2009).

Existem três tipos de células tronco as quais são classificadas quanto sua natureza em: célula tronco embrionária (CTE), célula tronco adulta (CTA) e a Célula Tronco de Pluripotência Induzida (iPS).

As CTEs são divididas em Pluripotentes, obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto, podendo originar tecidos das três camadas germinativas: endoderma, mesoderma e ectoderma (BETHESDA, 2009b) e Totipotentes originadas do ovo ou zigoto, capazes de originar todos os tecidos, incluindo placenta e anexos embrionários (ZAGO & COVAS, 2006).

O fato de estas células serem multiplicadas *in vitro* mantendo a pluripotencialidade, assim como, diferenciadas em tecidos específicos às tornam uma poderosa ferramenta para as pesquisas e fonte potencial de tecidos para transplante (ZAGO & COVAS, 2006). Contudo a utilização dessas células ainda é difícil,

principalmente na área humana, onde encontram uma barreira legislativa para a liberação na utilização de embriões.

No intuito de avançar as pesquisas com célula tronco embrionárias cientistas desenvolveram um tipo celular semelhantes às CTEs, estas foram denominadas de iPS, onde células tronco adultas sofreram uma reprogramação genética e passaram a expressar marcadores de superfície de CTEs (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

As iPSs são uma ferramenta útil para o desenvolvimento de drogas e modelagem de doenças e a intenção científica é utilizá-las na medicina de transplante. Porém, essa reprogramação atualmente é feita a partir de vírus e plasmídios utilizando DNA exógeno, e a técnica ainda precisa ser aprimorada antes da condução de experimentos em humanos, pois em animais sabe-se que essas células desenvolveram tumores (BETHESDA, 2009c). Apesar disto, uma característica que se destaca nas iPSs, é que o receptor pode ser também o doador de células para um possível transplante, minimizando os efeitos de rejeição.

Em contrapartida, as CTAs possuem um extraordinário potencial para se desenvolver em diversos tipos celulares do organismo, durante toda fase de vida do indivíduo, se dividindo quando necessário para reparar possíveis danos (BETHESDA, 2009a).

Na vida pós-natal, a MO é a fonte de célula tronco adulta mais estudada (BYDLOWSKI et al., 2009) e possui duas formas celulares, sendo as células tronco hematopoiéticas (CTH) capazes de gerar células sanguíneas as primeiras a serem identificadas, e as mesenquimais (CTM), identificadas por Friendstein e colaboradores (1970), que ao cultivarem o sangue da MO, observaram Unidades Formadoras de Colônia aderentes, semelhantes a fibroblastos, assim, iniciando a caracterização das CTMs.

3.2 Células Tronco Mesenquimais

As propriedades básicas que permitem o isolamento e cultivo das CTMs são: a facilidade de aderência em superfícies plásticas ou vidro e a capacidade de se diferenciar *in vitro* e *in vivo* em osteoblastos, adipócitos, condroblastos e mioblastos. Tal característica é identificada como plasticidade (BAKSH et al., 2004; ZAGO & COVAS, 2006).

Morfológicamente estas células são fusiformes, formato semelhante a um fibroblasto, e no início do seu crescimento *in vitro* apresentam a formação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) (CÂMARA et al., 2008).

Por apresentarem essa semelhança a Sociedade Internacional de Terapia celular (ISCT) listou alguns marcadores de superfície que elas devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. Esses marcadores foram estabelecidos para células humanas, porém são correlacionados com as células de animais.

Tais características são adotadas como critério mínimo para a caracterização das CTMs, o que permite um avanço mais rápido no uso dessas células em estudos pré-clínicos e, conseqüentemente, aplicações terapêuticas (DOMINICI, 2006).

Estudos pioneiros, com CTMs, foram realizados com células obtidas do sangue da medula óssea, onde Friedenstein e colaboradores nas décadas de 60 e 70 estudaram as características clonogênicas e de aderência ao plástico das células semelhantes a fibroblastos derivadas de medula óssea, as quais posteriormente foram denominadas de célula tronco mesenquimal (VÄÄNÄNEN, 2005).

As CTMs da MO podem ter um potencial terapêutico na reconstrução tecidual (Fibbe, 2002), além disso, elas expressão um amplo espectro de citocinas e fatores de crescimento envolvidos diretamente na manutenção do ambiente estromal que regula a hematopoese e outros sistemas celulares presentes na medula óssea (ZAGO & COVAS, 2006). Porém ainda é necessária uma melhor compreensão do papel das células progenitoras e do microambiente nas diferenciações: osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Entretanto, apesar de apresentarem potencial de diferenciação e auto-renovação, elas são caracterizadas por baixa taxa de crescimento (DEL CARLO et al., 2004). Em conseqüência disso, iniciaram-se as buscas por fontes que apresentassem características semelhantes, mas que tivesse maior população de CTMs e ainda melhor taxa de crescimento.

Assim, o tecido adiposo (TA), foi considerado uma fonte abundante, e de fácil obtenção de CTMs. Ele pode ser coletado no momento de qualquer intervenção cirúrgica, sendo obtido, em humano, em procedimentos de lipoaspiração (ZUK et al., 2001) e em pequenos animais durante ovariosalpingohisterectomia (MARTINELLO et al., 2010). Além disso estas células podem ainda ser obtidas de tecido subcutâneo

(NEUPANE et al., 2008), sendo considerada uma fonte atrativa de células tronco de origem adulta (ZUK et al., 2004).

Em 2006, Miao et al. indicaram a placenta como uma fonte rica e atraente de CTMs, quando comparadas com a medula óssea, e Pasquinelli et al. (2007), baseado na mesma comparação, mostrou que existem diferenças estruturais, porém, fenotipicamente semelhantes, focando as pesquisas com esta outra possível fonte de CTHs e CTMs.

3.3 Membranas Extra-embrionárias

Nos mamíferos, as membranas extra-embrionárias estão envolvidas na produção de hormônios e na formação da placenta, e são funcionais apenas até o nascimento, após isso, elas são expelidas ou ainda absorvidas pelo organismo materno (MCGEADY et al., 2006).

Abaixo podemos observar as membranas extra-embrionárias e sua origem embriológica (Figura 1), esquematizadas em uma só imagem, demonstrando que a formação da placenta dos vertebrados envolve as três camadas germinativas (WOODING & BURTON, 2008).

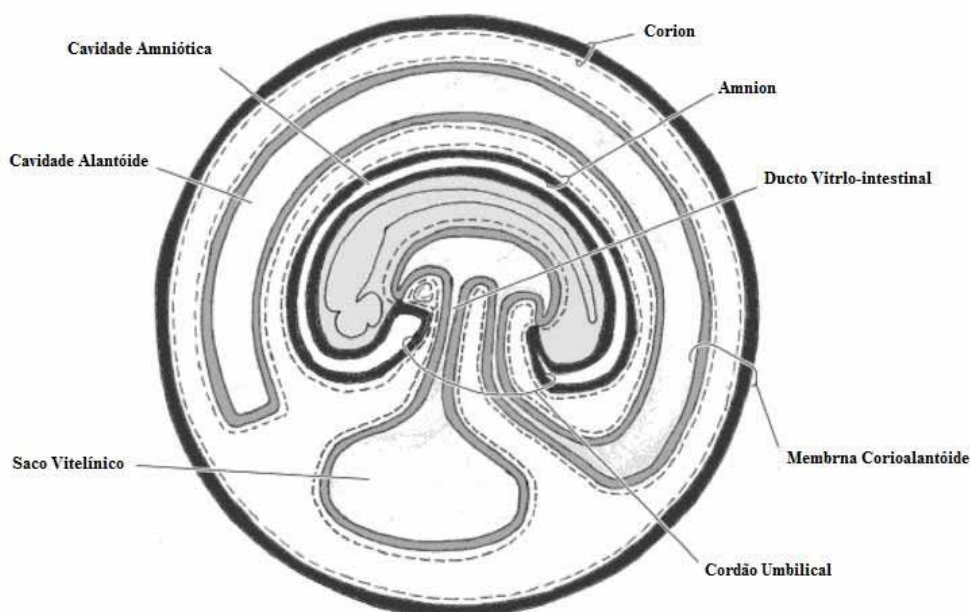


FIGURA 1. Fonte: Adaptada de McGeady et al. (2006). Esquema das membranas fetais em cavalos e carnívoros, no terço médio de gestação, a Ectoderma é apresentado com a linha grossa na cor preta, a Mesoderma pela linha tracejada e a Endoderme pela linha cinza. Com isso podemos esclarecer que a membrana amniótica tem origem do Mesoderma e Ectoderma e o cordão umbilical das três camadas germinativas.

A placenta é formada por membranas extra-embrionárias: saco vitelínico, membrana amniótica, membrana coriônica, membrana alantoide e pelos fluídos fetais (líquido amniótico e coriônico). Ela possui algumas funções como substituição do pulmão, intestino e rins fetais, uma vez que a troca de gases e excreção é feita através da placenta e também proteção mecânica.

Tais funções são importantes apenas na vida embrionária (McGEADY et al., 2006). Contudo, a função de maior importância para o presente estudo é a proteção do feto contra o sistema imunológico materno (WOODING & BURTON, 2008), isto pode contribuir para a característica imunomodulatória que as células derivadas das membranas fetais apresentam.

Considerando as membranas e líquidos fetais já existem trabalhos relacionados ao isolamento de CTMs em diversas espécies animais, do saco vitelínico (WENCESLAU et al., 2011 em cão), membrana amniótica (RUTIGLIANO et al., 2013 em felinos), membrana coriônica (CIUCĂ et al., 2011; KOO et al., 2012 em humano), membrana alantoide (ZEIGLER et al., 2006 em mouse) e líquido amniótico (TSAI et al., 2004; JANZ et al., 2009 em humano; IACONO et al., 2012 em equino; PRATHEESH et al., 2012 em caprino).

Além disso, CTMs têm sido isoladas do cordão umbilical, que é uma estrutura associada à placenta, onde é possível se obter CTMs da veia do cordão umbilical (ZUCONNI et al., 2010), sangue de cordão umbilical (SCU) (LEE et al., 2004a KAWASAKI-OYAMA et al., 2008; LIM et al., 2007) e da Gelatina de Wharton (WJ) (WANG et al., 2004; ROCCA et al., 2009; CHEN et al., 2013; FONG et al., 2011; MONTANUCCI et al., 2011; URANIO et al., 2011).

A coleta destes materiais, além de não ser invasiva, é atrativa para a formação de bancos de células tronco, por ser de fácil acesso, e utilizar materiais que até então seriam descartados, no pós-parto (BIEBACK & BRINKMANN, 2010). Além disso, a quantidade de células obtidas é superior a da medula óssea, por exemplo.

3.3.1 Membrana Amniótica

A membrana amniótica (MA) é uma membrana transparente ou esbranquiçada, constituída por epitélio estratificado simples, avascular (MORINI et al., 2008) e fina,

formando uma cavidade que envolve o embrião sendo sua principal função é a proteção do mesmo (McGEADY et al., 2006).

O protocolo para isolamento de CTMs a partir de MA ainda não está bem estabelecido, pois podemos obter essas células utilizando *explants* (URANIO et al., 2011) ou por digestão enzimática (PARK et al., 2012).

Dias-Prado et al. (2011) testaram dois protocolos diferentes, dos quais em um deles a amostra era submetida a uma digestão mecânica antes da enzimática (A), e o segundo não (B). Foi observado que o protocolo B (sem digestão mecânica), apresentou uma concentração celular menor ($A \pm 202$ células/grama de tecido e $B \pm 2$ células/grama de tecido), e conseqüentemente precisou de um tempo maior para apresentar confluência, demonstrando a influência da técnica, na quantidade de células obtida.

Além da facilidade de isolamento e obtenção, sabe-se que essas células são capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares (ILANCHERAN et al., 2007, MANUELPILLAI et al., 2011), e ainda de expressar *Octamer-4* (Oct-4) em células caninas e felinas (URANIO et al., 2011; RUTIGLIANO et al., 2013) o qual é um fator de transcrição e está intimamente associado ao estado “indiferenciado” das células tronco (ZAGO & COVAS, 2006).

Além disso, Miki e seus colaboradores (2007), demonstraram que a membrana amniótica apresenta uma reatividade heterogênea aos anticorpos de pluripotência testados, sugerindo que ela apresenta células em diferentes estágios de diferenciação, por estes motivos se tornam tão atrativas para a terapia celular.

3.3.2 Cordão umbilical

O cordão umbilical é formado por duas artérias e duas veias, envoltas pela matriz extravascular, também chamada de Gelatina de Wharton (GW), a qual é composta por tecido conectivo (McGEADY et al. 2006). As CTMs de cordão umbilical podem ser isoladas do sangue, dos vasos sanguíneos e da GW. Contudo, estudos relacionados a essas fontes ainda são recentes e escassos, apesar de os resultados obtidos serem otimistas.

Os primeiros modelos experimentais eram humanos, em 2002 Kadner et al. estudaram as células provenientes do cultivo de fragmentos do cordão umbilical,

demonstrando excelente crescimento e formação de tecido com propriedades semelhantes às do tecido cardíaco, apresentando assim uma promissora alternativa para a engenharia tecidual cardiovascular. Porém, as células mais estudadas são as originadas do Sangue do Cordão Umbilical (SCU), o qual pode conter tanto CTHs como CTMs. As hematopoiéticas são semelhantes às encontradas na medula óssea e utilizadas rotineiramente na medicina humana, onde já existem bancos de sangue de cordão umbilical e ocorre transplante autólogo destas células.

Em cães, as CTHs do SCU, são cuidadosamente estudadas como uma fonte alternativa e menos invasiva comparada a de medula óssea e apesar do volume pequeno coletado do cordão umbilical é possível a obtenção de CTs em quantidade semelhante à obtida de MO de cães adultos (NAKAGE et al., 2008). Porém as CTMs representam uma pequena porção mononucleada presente na amostra, sendo necessário o isolamento e multiplicação *in vitro* (KAWAZAKI-OYAMA et al., 2008).

Exatamente por haver quantidades mínimas de CTMs no SCU, Carlin e seus colaboradores (2006) isolaram e caracterizaram pela primeira vez CTMs da GW nos animais domésticos, o modelo experimental utilizado foi o suíno. No entanto, os autores não realizaram a diferenciação, concluindo que a matriz possuía células únicas e primitivas, com potencial indefinido, um ótimo atrativo para pesquisas. Posteriormente, Uranio et al. (2011) demonstraram que, em cães, é possível o isolamento, cultivo e diferenciação *in vitro* de CTMs de membranas fetais (GW, líquido amniótico e membrana amniótica).

Considerando as células tronco de sangue de cordão umbilical, elas têm demonstrado eficácia terapêutica de doenças em modelos animais, incluindo as vantagens quanto a questões éticas ou mesmo de rejeição, quando comparadas com células tronco embrionárias (KIM et al., 2010).

Atualmente, o foco dos estudos estão voltados para a matriz extra vascular do cordão, em busca da melhor forma de isolamento, potencial de diferenciação e caracterização (PURANIK et al., 2012, SALEHINEJAD et al., 2012; SEO et al., 2012; YOON et al., 2013; LEE et al., 2013; LIU et al., 2013;), se mostrando uma alternativa tão interessante quanto a medula óssea (CREMONESI et al., 2008).

Em estudo realizado *in vitro* pôde ser observado que a GW é uma excelente fonte para a reconstrução de cartilagem, porém para realizar a reparação de defeitos em cartilagem *in vivo* ainda são necessários muitos estudos (Liu et al., 2013).

Além disso, elas são consideradas “imuno-privilegiadas”, pois apresentam característica imunossupressora e ainda possuem um potencial de diferenciação multipotente e pluripotente, sendo uma fonte importante para a terapia celular em um futuro próximo (TAGHIZADEH et al., 2011).

3.4 Medicina Regenerativa

Há onze anos, a medicina regenerativa era considerada uma área nova da medicina, com escopo de controlar e ampliar o processo de regeneração natural (SOARES & SANTOS, 2002; PUSSI & PUSSI, 2005).

O avanço nos estudos destas células é tão veloz, que surgiu uma nova abordagem, a qual compreende a regeneração e reparação das células/tecidos/órgãos com principal objetivo de restaurar a função prejudicada. Porém devido ao pouco conhecimento acumulado a terapia celular somente é aplicada onde terapias anteriores obtiveram resultados insatisfatórios (MONTI et al., 2012).

A terapia celular com CTMs é uma alternativa promissora, pois a diferenciação dessas células em tecidos mesodermis e não mesodermis amplia a possibilidade de utilização clínica, tanto em humanos quanto em animais (MONTEIRO, et al., 2010). As CTMs são capazes também de produzir grandes quantidades de fatores hormonais, agindo como potentes moduladores parácrinos e ainda não induzem a formação de tumores, em indivíduos imunocomprometidos (NAZAROV et al., 2012).

Contudo, os vertebrados possuem um sistema imune evoluído que é capaz de discriminar um corpo estranho e apresentar uma resposta seletiva contra eles, e isso é obtido através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), identificado (através de investigação da sua função) na resposta imunológica a tumores e ainda rejeição de transplantes (TEVA et al., 2010).

Lee et al. (2012) sugeriram que a placenta possui vantagens, em relação às demais fontes de CTMs, quanto ao efeito imunomodulatório. Assim as perspectivas quanto à utilização dessas células para fim terapêutico são enormes. Há estudos em andamento, principalmente no tratamento de diabetes, Parkinson e doenças cardíacas, porém sem resultados concretos, os quais devem começar ser publicados nos próximos anos (MONTI et al., 2012).

Para que a aplicação ocorra de forma efetiva faz-se necessário um conhecimento profundo do sistema imunológico e todas as questões relacionadas a ele, uma vez que, ao introduzir essas células em um organismo elas podem ser identificadas como corpo estranho.

3.5 Bancos de célula tronco

Quando se fala em terapia celular deve ser considerado que não será uma terapia imediata, uma vez que, em humanos os transplantes dessas células são realizados de forma autóloga e há de ser considerada a criopreservação, e conseqüente, formação de bancos para o armazenamento desses materiais.

Vale ressaltar, que no Brasil existem bancos de células de cordão umbilical humano, porém na Veterinária, é necessário muito estudo, principalmente em relação aos protocolos utilizados para congelar e descongelar estas células.

Desta forma, é necessário utilizar protocolos seguros onde as células possam se manter viáveis por longos períodos. Em estudo pioneiro, CTMs provenientes do SCU foram criopreservadas por tempo prolongado obtendo-se resultados positivos, em relação à expansão e diferenciação *in vitro* destas pós-congelamento. Entretanto, observou-se que algumas dessas células submetidas a passagens sucessivas apresentavam características de senescência e mudança morfológica (LEE et al., 2004b, LEE et al., 2005). Apesar disso, Liu et al. (2011) congelaram CTMs de cordão umbilical humano e ao descongelar verificaram potencial positivo de diferenciação dessas células.

Utilizando células de líquido amniótico Janz et al. (2012), testaram alguns crioprotetores, e demonstraram que o glicerol e o DMSO mantém uma melhor viabilidade, assim como as características de proliferação e marcadores específicos, quando criopreservadas por 6 meses. Ângelo et al. (2012) também mostraram que a criopreservação não alterou o cariótipo das CTMs obtidas do líquido amniótico.

Contudo, Chaytor et al. (2012) demonstraram que tão importante quanto a forma de congelar, é também a inibição da recristalização de gelo na pós-congelação, promovendo o aumento na viabilidade celular, técnicas como essas são facilmente adaptadas para veterinária.

Outro pré-requisito para a formação de bancos de CTMs, que possam ser amplamente aplicados em medicina regenerativa é o conhecimento da

imunoantigenicidade após administração de células obtidas de fontes alogênicas. As CTMs humanas têm sido amplamente descritas expressando antígenos de histocompatibilidade (MHC) classe I e não expressando os de classe II, assim como as moléculas co-estimulatórias B7-1, B7-2 e CD40 (LE BLANC et al., 2003; MAJUMDAR et al., 2003; KLYUSHNENKOVA et al., 2005; TYNDALL et al., 2007).

Esta característica é geralmente descrita como não imunogênica o que é confirmado por estudos que demonstram que a co-cultura de CTMs alogênicas e leucócitos não resultaram na ativação ou proliferação dos últimos (DI-NICOLA et al., 2002; LE BLANC et al., 2003; KLYUSHNENKOVA et al., 2005).

Em 2008, Wan et al. fizeram transplante alogênico em ratos, onde foi aplicado CTMs derivadas do tecido adiposo, em condições *in vivo*, as mesmas inibiram, significativamente, a rejeição aguda que é comum nesses casos, confirmando o efeito imunomodulatório dessas células.

Esse comportamento imunológico aumentam as perspectivas quanto ao uso de bancos celulares, porém, deve ser considerado com cautela, uma vez que os mecanismos imunomodulatórios destas células não são totalmente elucidados (MONTEIRO et al. 2010).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste experimento foi buscar maior conhecimento sobre o comportamento de células tronco mesenquimais caninas, obtidas da membrana amniótica, bem como da Geleia de Wharton de fetos caninos a termo, visando a formação de um banco de células disponíveis para utilização em diversos protocolos de terapia celular.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o isolamento e cultivo de CTMs obtidas da membrana amniótica, bem como da matriz extravascular do cordão umbilical de fetos caninos a termo;
- Verificar a viabilidade e potencial de crescimento celular após procedimento padrão de criopreservação para formação do banco de células tronco;
- Analisar o potencial de diferenciação das CTMs dos diferentes tecidos fetais em células da linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, antes e após o procedimento de criopreservação;
- Avaliar, através de citometria de fluxo, a expressão dos marcadores de superfície CD44, CD34, bem como do MHC classe II, nas células cultivadas, em segunda passagem antes e após a criopreservação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Campus de Botucatu.

4.1 *Obtenção das amostras*

As amostras foram obtidas de cadelas submetidas a cesarianas (aproximadamente 60 dias gestacionais) realizadas no centro cirúrgico do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da FMVZ/UNESP - Botucatu, onde os animais foram devidamente anestesiados, e sua coleta foi aprovada pelo Comitê de ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, sob o nº de protocolo: 90/2012-CEUA, de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

No centro cirúrgico o útero era incisionado cuidadosamente, tendo assim acesso ao neonato, a membrana coriônica foi retirada e então o cordão umbilical foi pinçado e coletado uma porção (n=8) em seguida era coletado fragmento de membrana amniótica (n=8), ambos foram colocados em uma solução tampão contendo antibiótico e antimicótico, as amostras foram transferidas para o laboratório e imediatamente processadas.

4.1.2 **Membrana Amniótica**

Os fragmentos de membrana amniótica foram lavados *em Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS - Gibco®), fracionados (digestão mecânica), com auxílio de uma pinça e um bisturi, e colocados em solução a 0,04% de colagenase (Sigma) a temperatura de 37,5°C em banho termostático por aproximadamente 40 minutos.

A suspensão celular foi submetida à Força Centrífuga Relativa (FCR) 500 xg por 10 minutos, formando um *pellet*, então o mesmo foi ressuspensionado em meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose* (DMEM - baixa glicose - Gibco®) com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB - Gibco®), suplementado com antibióticos (1% de solução de Penicilina e Estreptomicina - Gibco®) e antimicótico (1,2% de solução de Anfotericina - Gibco®) e centrifugado novamente a FCR 500 g por 10 minutos para a retirada completa da solução de colagenase. O precipitado celular foi ressuspensionado em 5 mL do meio já citado, colocados em frascos de 25cm² (T25) e cultivados em estufa com 5% de CO₂ em ar a temperatura de 37,5°C. O meio de cultivo foi trocado após 48 horas, seguido de troca duas vezes por semana.

4.1.3. Gelatina de Whaton

As amostras de cordão umbilical foram dissecadas para retirada dos vasos sanguíneos, e então foram realizados os mesmos procedimentos da membrana amniótica, com uma única diferença, foi utilizado uma solução de 0,02% de colagenase (Sigma) por aproximadamente 40 minutos.

4.2 Passagens

Quando as células atingiram confluência de 80%, elas foram tripsinizadas (Trypsina-EDTA 0,05% - Gibco®) e centrifugadas a FCR 500 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, e as células lavadas com meio de cultivo. Neste momento o número de células foi estimado com o auxílio de uma câmara de Neubauer e um corante de exclusão (Trypan Blue - Gibco®). Uma amostra celular foi diluída no corante em uma concentração de 1:1 e mantida por 3 minutos, tempo suficiente para corar as células mortas. Uma porção de 10 µl dessa diluição foi colocada em cada hemicâmara, e foi realizada a contagem nos quatro quadrantes da extremidade, de forma que a diferença no número de células em cada hemicâmara não ultrapassasse 10%. Foi realizada uma média entre as duas hemicâmaras obtendo-se uma média de células vivas, e então, utilizou-se para calcular o número de células/mL a fórmula abaixo, descrita por Zago e Covas (2006). Este procedimento foi repetido em todas as passagens.

$$\text{Número de células/mL} = \text{média núm. de células} / \text{núm. de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

4.3 Criopreservação

Após a tripsinização, em primeira passagem, as células foram contadas, com auxílio de uma Câmara de Neubauer e de corante Azul de Trypan, para estimar a concentração e a viabilidade celular, em seguida, separadas em criotubos contendo aproximadamente uma concentração de 5×10^5 células/criotubo, com 1,5 mL de meio crioprotetor composto por 90% de SFB (Gibco®) e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma). Os criotubos foram acondicionados no Nalgene™, e mantido por 24 horas no Ultra Freezer -80°C (Thermo Scientific – Forma 8800 Series), resfriando gradualmente as células a aproximadamente 1°C por minuto. Em seguida os criotubos foram transferidos para o nitrogênio líquido (-196°C).

As amostras foram reconstituídas após 4 semanas, utilizando o protocolo descrito por Chaytor et al. (2012), que consiste em manter as células em banho-maria sob leve agitação até ficar uma minúscula pedra de gelo, a partir disto, a amostra foi gotejada em tubo de polipropileno (15ml), previamente preparado com 3mL de meio de manutenção a 37,5°C, e desta forma mantido por 3 minutos. Em seguida adicionou-se 9 mL de meio de manutenção e a suspensão foi submetida a centrifugação por 10 minutos a FCR 580 g, visando melhorar a viabilidade. Após, realizou-se o teste de viabilidade com Azul de Trypan, de acordo com a fórmula abaixo. Ao final do cultivo secundário foi realizada a caracterização por citometria de fluxo e no momento da terceira passagem a diferenciação osteogênica, adipogênica.

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{Número de células vivas}}{\text{Núm. de células vivas} + \text{núm. de células mortas}} \times 100$$

4.4 Caracterização

Para a caracterização utilizou-se a análise por citometria de fluxo, a diferenciação celular (osteogênica e adipogênica) e análise imunocitoquímica.

4.4.1 Citometria de Fluxo

A caracterização das Células Tronco Mesenquimais (CTMs) foi realizada no momento da segunda passagem, antes e após a criopreservação. Para tanto, utilizou-se a marcação celular com anticorpos de superfície caninos CD 44, CD 34 e MHC classe II por citometria de fluxo, utilizado o protocolo padrão sugerido pelo fabricante de cada anticorpo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur BD[®], sendo:

- Marcador Positivo para CTM: CD 44
- Marcadores Negativos para CTM: CD 34 e MHC classe II

4.4.2 Imunocitoquímica

Foi realizada a análise com o anticorpo primário anti-vimentina (linhagem mesenquimal) por imunocitoquímica, o qual foi detectado por incubação em Sistema HIDEf Detection[™] HRP Polymer (Cell Marque, Rocklinn, CA; USA, 954D-31) marcado com peroxidase, e revelado com diaminobenzidina (Liquid DAB, DakoCytomation, K3468), sendo contra-corada com Hematoxilina de Harris. Esta análise especificamente foi realizada somente após criopreservação.

4.4.3 Diferenciação Celular

Osteogênica

Para diferenciação em células osteogênicas, no momento da terceira passagem, uma concentração de 5×10^3 células/poço (seis poços/amostra - placa de 24 poços) foram cultivadas e ao entrar em confluência de 80-90%, o meio de manutenção, de quatro poços foi substituído por meio de diferenciação osteogênico (*Kit* de diferenciação Osteogênica - *Stem Pro* - Gibco[®]). Outros dois poços foram mantidos com meio de manutenção (Controle). Todas as amostras permaneceram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, por um período médio de 14 dias, sendo os insumos trocados a cada dois dias, segundo as recomendações do fabricante.

A diferenciação das células osteogênicas foi avaliada através da coloração com Vermelho de Alizarina (Sigma), que cora em vermelho escuro o depósito extracelular de cálcio. Para isto, as células foram lavadas, incluindo os controles, com HBSS livre de Mg_{2+} e Ca_{2+} (Gibco[®]) e fixadas em Paraformaldeído a 4% (BD[®]), por 20 minutos. As células foram lavadas três vezes com água deionizada e então coradas com Vermelho de Alizarina a 0,4 mM (Sigma) por 20 minutos. As monocamadas coradas foram observadas através de microscopia ótica de contraste de fase.

Adipogênica

A diferenciação das células na linhagem adipogênica, também foi feita em terceira passagem, com concentração de 10×10^3 células/poço (seis poços/amostra - placa com 24 poços). As amostras foram mantidas em meio de manutenção até apresentarem uma confluência de 80-90%, e então o meio de quatro poços foi substituídos pelo meio de diferenciação adipogênica, *Kit* de diferenciação Adipogênica - *Stem Pro* (Life). Nos demais manteve-se o meio de manutenção (controle). As células permaneceram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, em média por 12 dias, e os insumos trocados a cada dois dias.

Para a avaliação da diferenciação em células adipogênicas, estas foram lavadas com HBSS livre de Mg_{2+} e Ca_{2+} (Gibco[®]) e fixadas em Paraformaldeído 4% (BD[®]) por 20 minutos, após, coradas com Oil Red O (Sigma), que detecta o acúmulo de lipídio intracelular, corando as gotículas lipídicas em vermelho.

4.5 Tratamentos e Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo cada amostra uma unidade experimental. Logo, o experimento contou com 16 unidades experimentais, oito criopreservadas e oito não criopreservadas.

4.6 Análises Estatísticas

Os dados de citometria de fluxo e o tempo de diferenciação foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.2, 2010) utilizando o

procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias comparada pelo teste de Hartley. Estes dados foram transformados em inversão e então submetidos à análise de variância, que contemplou como causas de variação o efeito dos tratamentos (criopreservado ou não), com 5% de probabilidade.

5. RESULTADOS

No presente experimento, foi observado o comportamento das CTMs de membrana amniótica e da matriz extravascular do cordão umbilical canino ou Gelatina de Wharton (GW). A caracterização dessas células foi feita por citometria de fluxo, diferenciação em duas linhagens mesenquimais (adipogênica e osteogênica) e imunocitoquímica.

5.1 *Comportamento celular*

Após a coleta os tecidos foram imediatamente processados, obtendo uma porção celular, a qual foi cultivada. Inicialmente foi observada a aderência ao plástico (Figura 2) de células arredondadas que progressivamente adquiriram formato fibroblastóide, indicando tratar-se de CTMs. Em média, antes da criopreservação foram necessárias 62 e 51 horas (Figura 2) para as células de MA e GW, respectivamente, apresentarem o formato fibroblastóide, demonstrando um comportamento diferenciado entre os materiais.

Após a criopreservação as de MA voltaram ao formato fibroblastóide em 42 horas e as de GW em 30 horas (Figura 3), mostrando que após a criopreservação a tendência das células foi apresentar este formato de forma mais rápida.

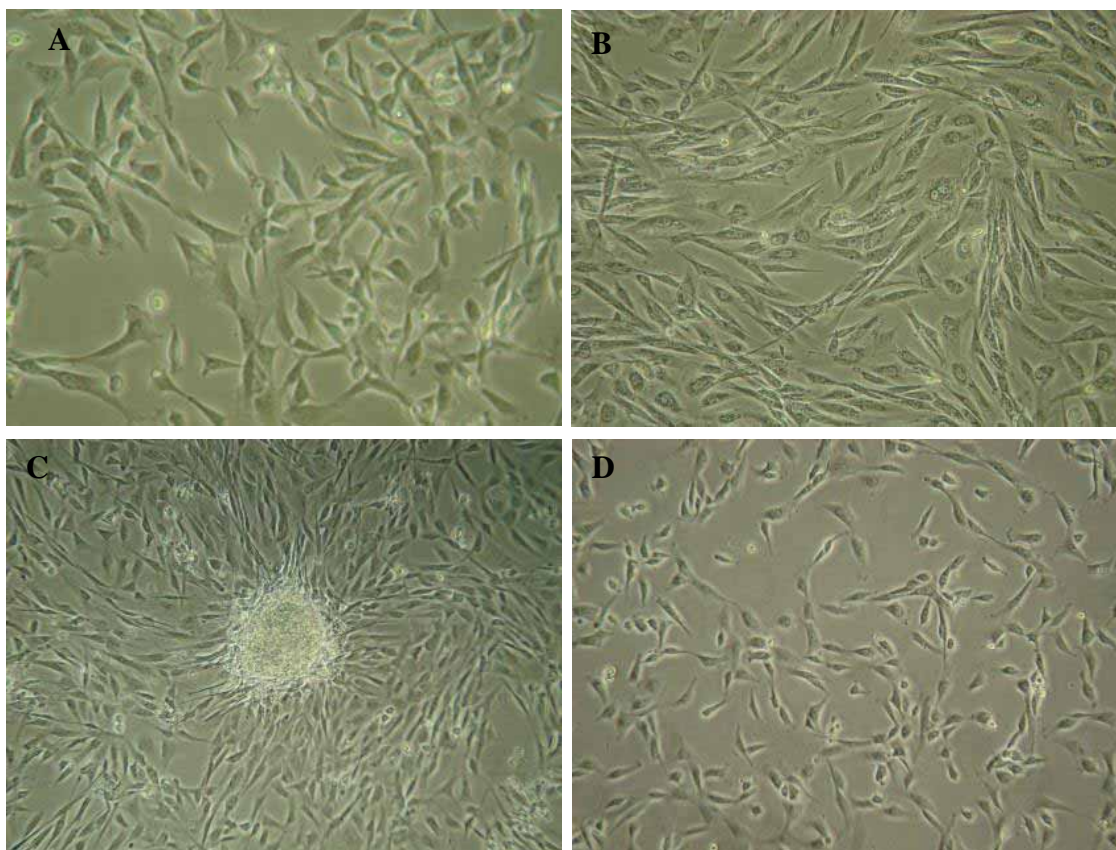


FIGURA 2. Característica fibroblastóide das células antes da criopreservação da Membrana Amniótica (A) e Gelatina de Wharton (B) e após a criopreservação MA (C) e GW (D).

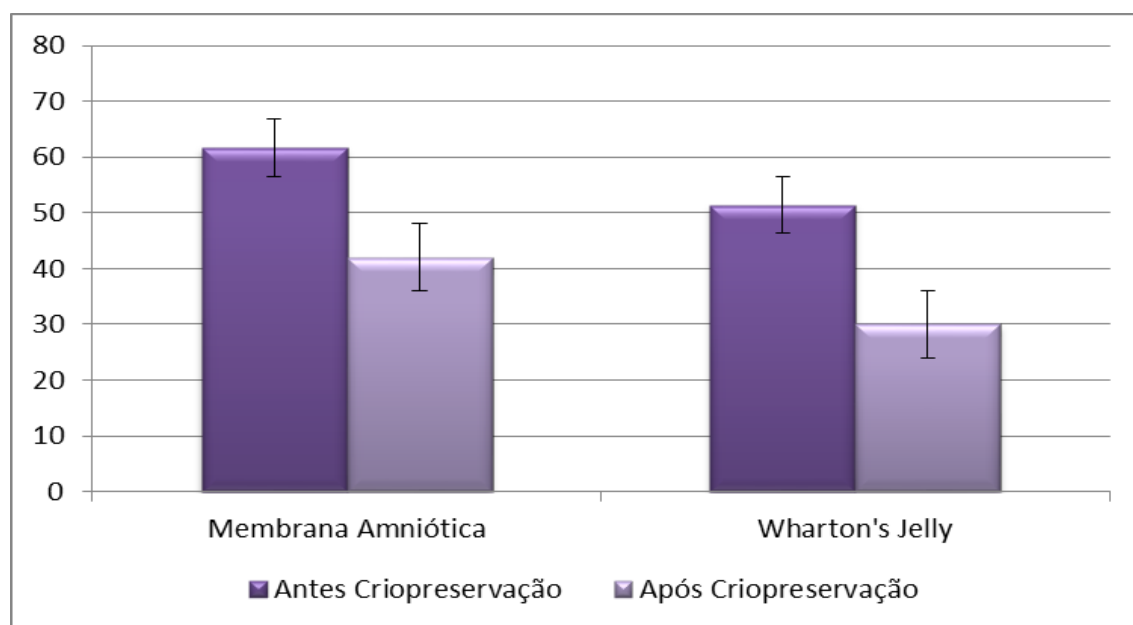


FIGURA 3. Gráfico de tempo de aderência ao plástico (horas), das células de Membrana Amniótica e Gelatina de Wharton, antes e após a criopreservação.

Após a aderência, observou-se o tempo entre as passagens, ou seja, quanto tempo era necessário entre uma passagem e outra com uma confluência de 80% aproximadamente), em horas (Figura 4).

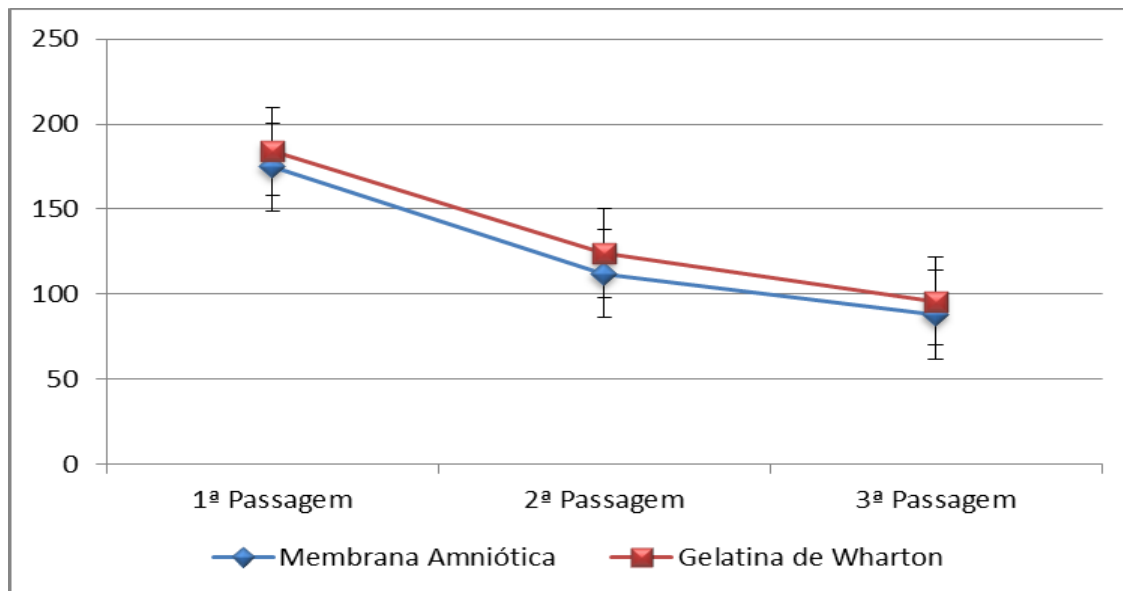


FIGURA 4. Gráfico de tempo (horas) entre as passagens das células de Membrana Amniótica e Gelatina de Wharton.

A Figura 4 indica que, em média, as CTMs provenientes de MA atingiram confluência de forma mais rápida. Essa diferença não passa de 9 horas na primeira passagem, em segunda passagem essa diferença aumenta para 12 horas, e quando elas atingem a terceira passagem essa diferença diminui novamente, 8 horas. As células de GW demonstraram comportamento semelhante. Portanto, para completar as três passagens da MA são necessárias 375 horas, já as de GW 404 horas, apresentando entre os materiais uma diferença de 29 horas.

5.2 Viabilidade Celular

Para se verificar a qualidade dessas células foi estimada a viabilidade celular antes e após a criopreservação. No momento em que foram criopreservadas as células da Membrana amniótica apresentavam 97% de viabilidade e a de Gelatina de Wharton apresentavam 98,8%. Após a reconstituição verificou-se valores de 94,6% para a MA e 93,5% para as de GW, demonstrando ótima viabilidade após o período de criopreservação.

5.3 Contagem celular

A cada passagem foi estimada a quantidade de células/garrafa (T25), desta contagem estimada observou que as células da membrana amniótica (Figura 5), possuem um comportamento diferenciado. Antes da criopreservação elas apresentam um decréscimo em seu crescimento, ou seja, a quantidade de células diminui a cada passagem. Entretanto, após a criopreservação, ocorre um aumento na concentração celular.

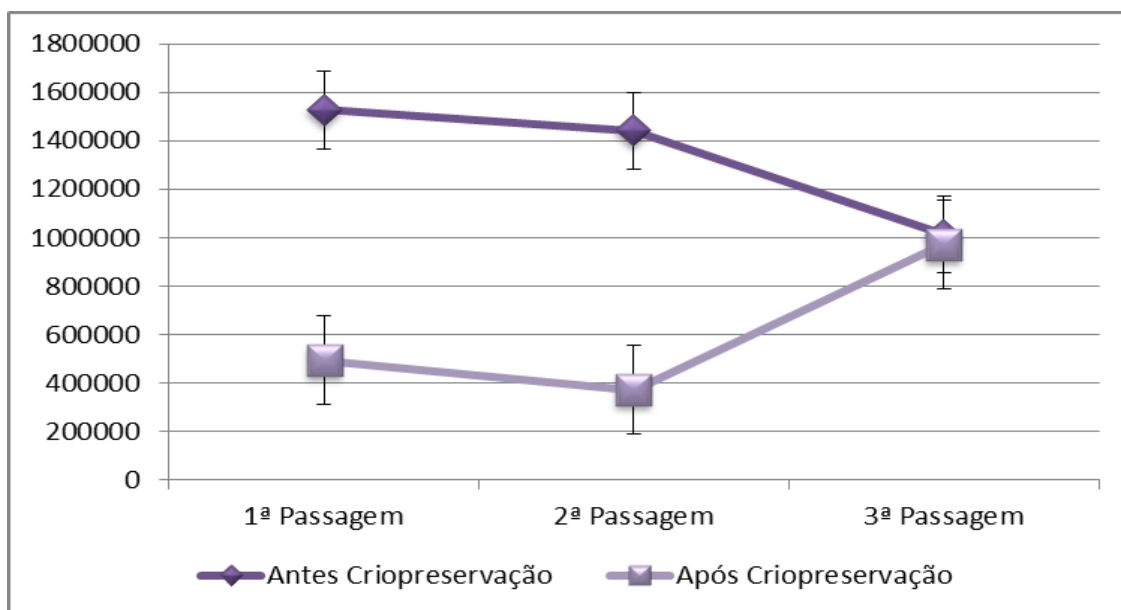


FIGURA 5. Gráfico referente à contagem celular nas três passagens das CTMs de Membrana Amniótica, antes e após a criopreservação.

Em relação as células de GW (Figura 6), tanto antes quanto após a criopreservação estas apresentam decréscimo em sua concentração. Porém antes da criopreservação a queda foi mais acentuada, indicando maior morte celular.

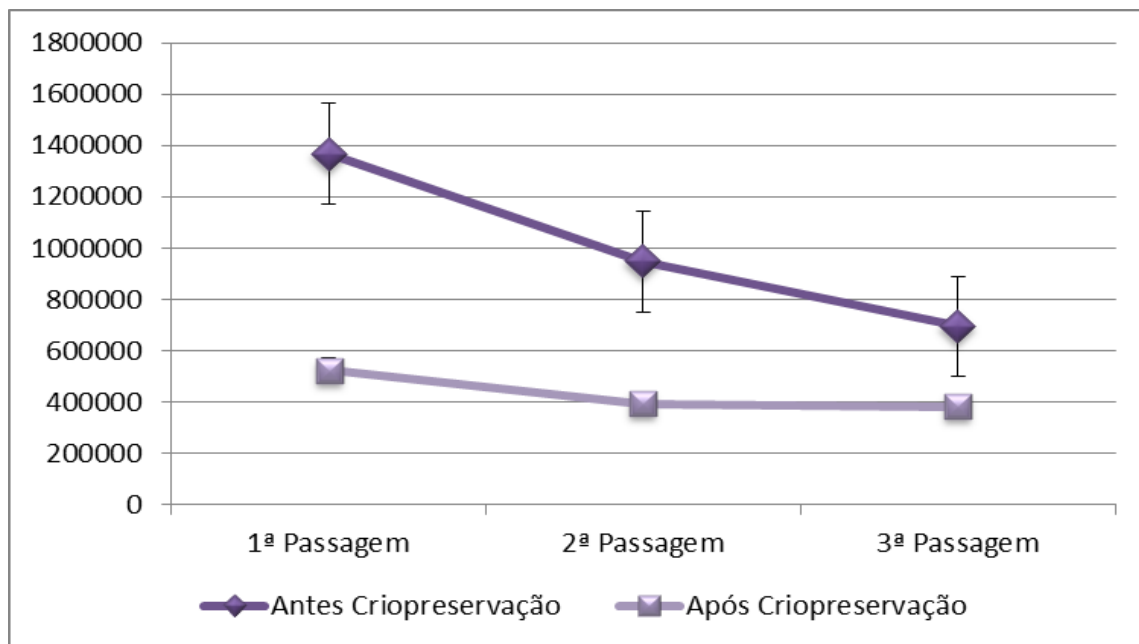


FIGURA 6. Gráfico de contagem celular nas três passagens das CTMs de Gelatina de Wharton, antes e após a criopreservação.

5.4 Caracterização

5.4.1. Diferenciação Osteogênica

Após a adição do meio de diferenciação as células foram monitoradas diariamente, e os insumos trocados a cada dois dias. Este procedimento foi realizado, nas células de membrana amniótica e também nas de Gelatina de Wharton, antes e após a criopreservação.

Membrana Amniótica

O tempo médio para a diferenciação osteogênica, antes da criopreservação, foi de 424 horas (17 dias), obtendo-se resultado positivo em todas as amostras submetidas à diferenciação. Foi realizado um controle negativo para cada amostra, onde o meio de manutenção foi mantido por todo o período de diferenciação. Neste caso observou-se diferenciação espontânea do controle em três amostras (37,5%). Após a criopreservação as células se diferenciaram em 360 horas (15 dias), com resultado positivo para todas as amostras submetidas à diferenciação. No controle, também foi observada a diferenciação espontânea em 3 amostras. É importante ressaltar que as amostras que

sofreram diferenciação espontânea antes e após a criopreservação, foram as mesmas (Figura 7).

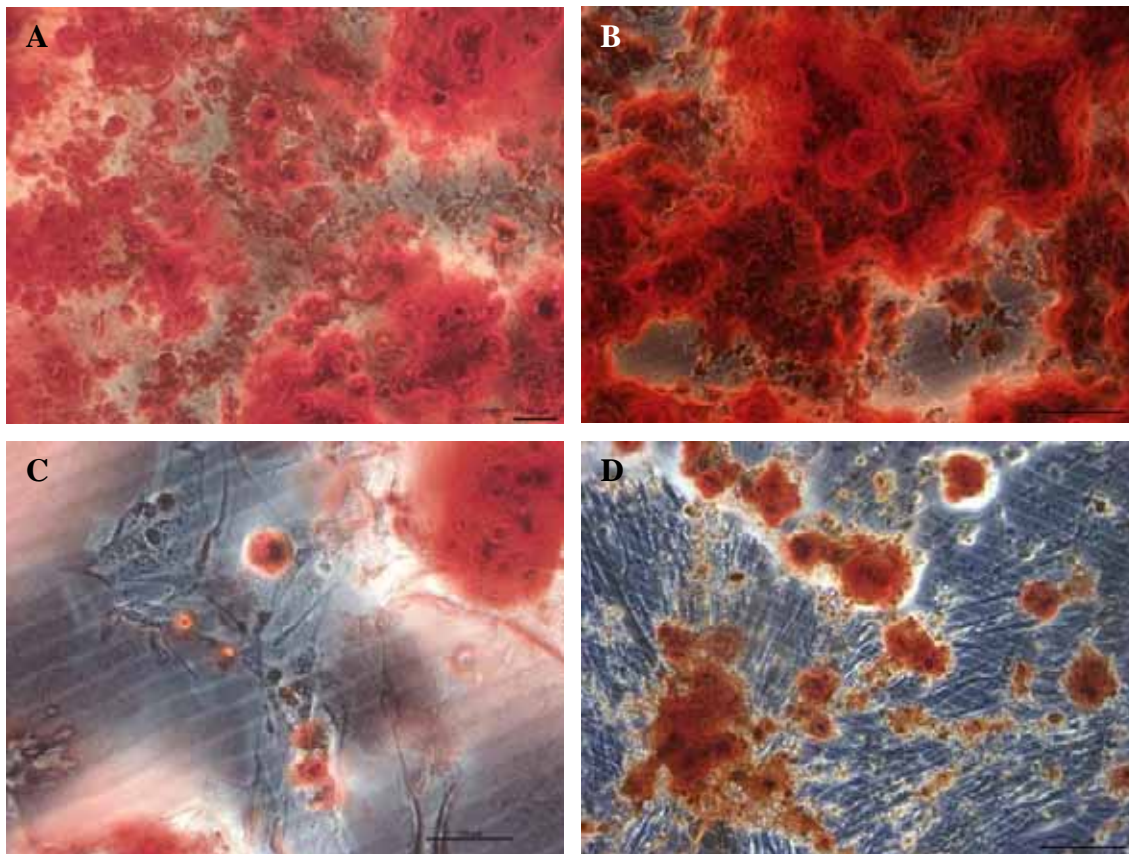


FIGURA 7. Diferenciação *in vitro* das CTMs de membrana amniótica em 3ª passagem, antes e após a criopreservação. Células cultivadas em meio indutor osteogênico e corado com *Vermelho de alizarina* evidenciando as mineralizações de cálcio no meio extracelular antes a criopreservação (A) e após a criopreservação (B). As células cultivadas em meio basal (DMEM – baixa glicose + 20% SFB) corados com *Alizarin Red* demonstrando que mesmo sem a adição de meio indutor, as células produziram espontaneamente mineralização do meio extracelular (controle negativo), antes a criopreservação (C) e após (D). Fotos tiradas em microscópio de luz - 100µm.

Gelatina de Wharton

O tempo médio para a diferenciação osteogênica, antes da criopreservação, foi de 296 horas (12 dias), sendo o resultado negativo obtido em apenas uma (8%) amostra submetida à diferenciação (Figura 8). Neste caso pôde-se observar a ausência de depósitos de cálcio no meio extracelular, e as células mantiveram formato fibroblastóide.

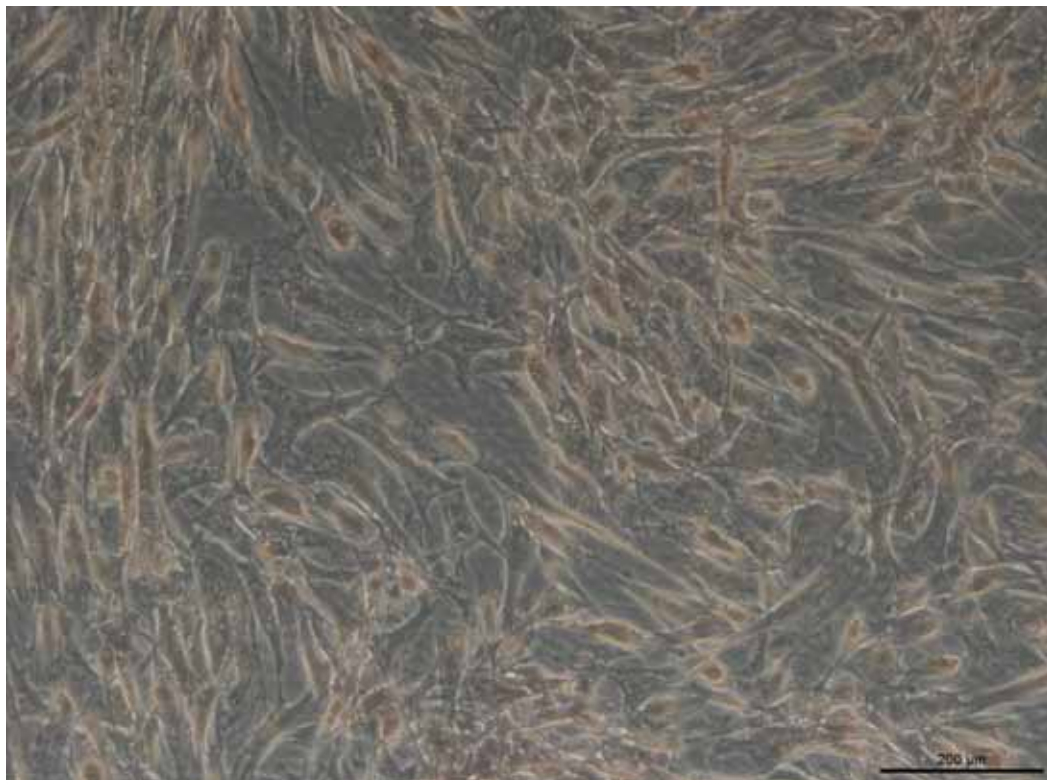


FIGURA 8. Diferenciação *in vitro* negativa das CTMs de Gelatina de Wharton, antes da criopreservação, mantidas em meio indutor osteogênico e corado com *Alizarin Red*. Foto tirada em microscópio de luz - 200 μm .

As demais foram positivas para diferenciação. No controle negativo observou diferenciação espontânea de três amostras. Após a criopreservação, em média, as células se diferenciaram em 360 horas (15 dias), apresentando resultado positivo para todas as amostras submetidas à diferenciação. No controle dessas células observou cinco (62,5%) diferenciações espontâneas, dentre elas 3 diferenciaram antes e pós criopreservação (Figura 9).

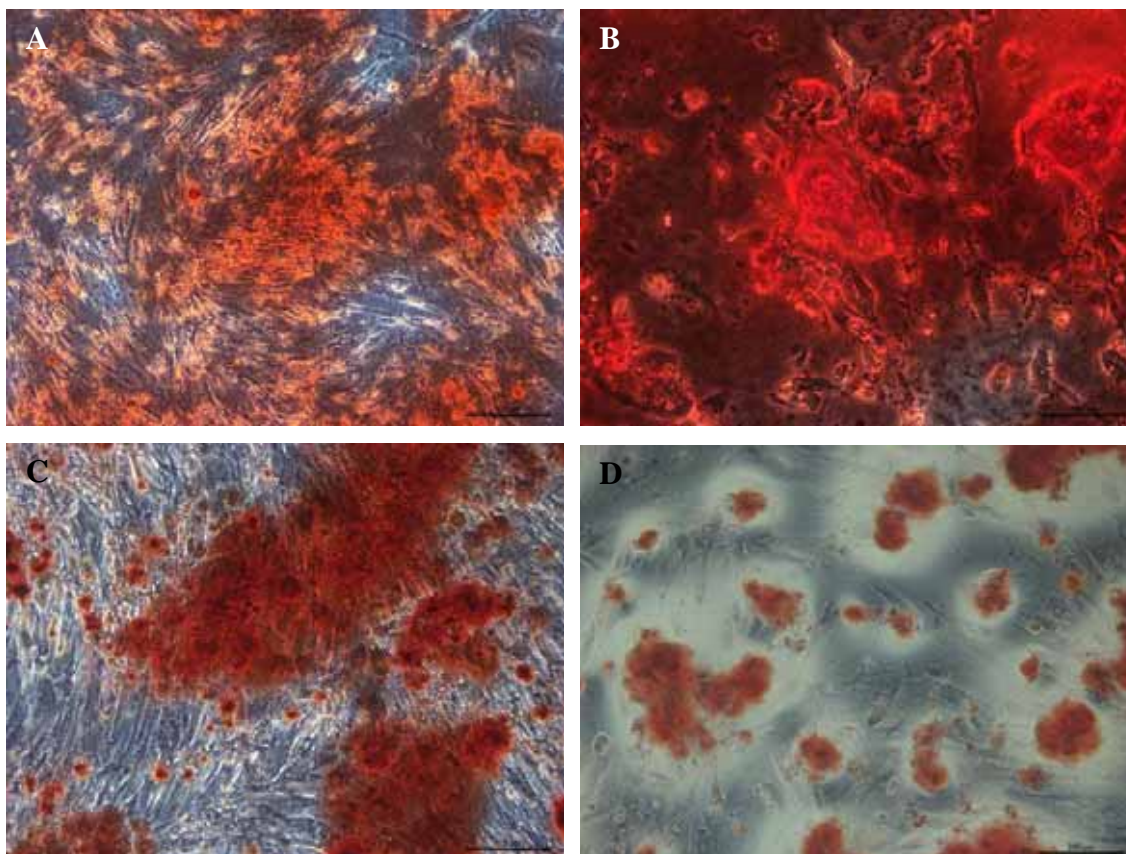


FIGURA 9. Diferenciação *in vitro* das CTMs da GW em terceira passagem antes e após a criopreservação. Células cultivadas em meio indutor de diferenciação osteogênica e coradas com *Vermelho de Alizarina* (Sigma) apresentaram mineralização do cálcio antes (A) e após (B) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal coradas com *Vermelho de Alizarina* demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as células apresentam espontaneamente mineralização do cálcio (controle negativo), antes da criopreservação (C) e após (D). Fotos tiradas em microscópio de luz – A e C) 100 μm e B e D) 200 μm .

5.4.2. Diferenciação Adipogênica

Membrana Amniótica

O tempo de diferenciação, não apresentou diferença estatística ($P > 0.05$) para amostras de membrana amniótica (Tabela 1) antes e após a criopreservação. O tempo médio para a diferenciação adipogênica, antes da criopreservação foi de 260 horas (11 dias), sendo que todas as amostras apresentaram resultado positivo. O controle apresentou diferenciação espontânea em todas as amostras. Após a criopreservação foi necessário, 304 horas (13 dias), para a diferenciação adipogênica onde todas as amostras foram positivas. O controle negativo também apresentou diferenciação positiva em todas as amostras (Figura 10).

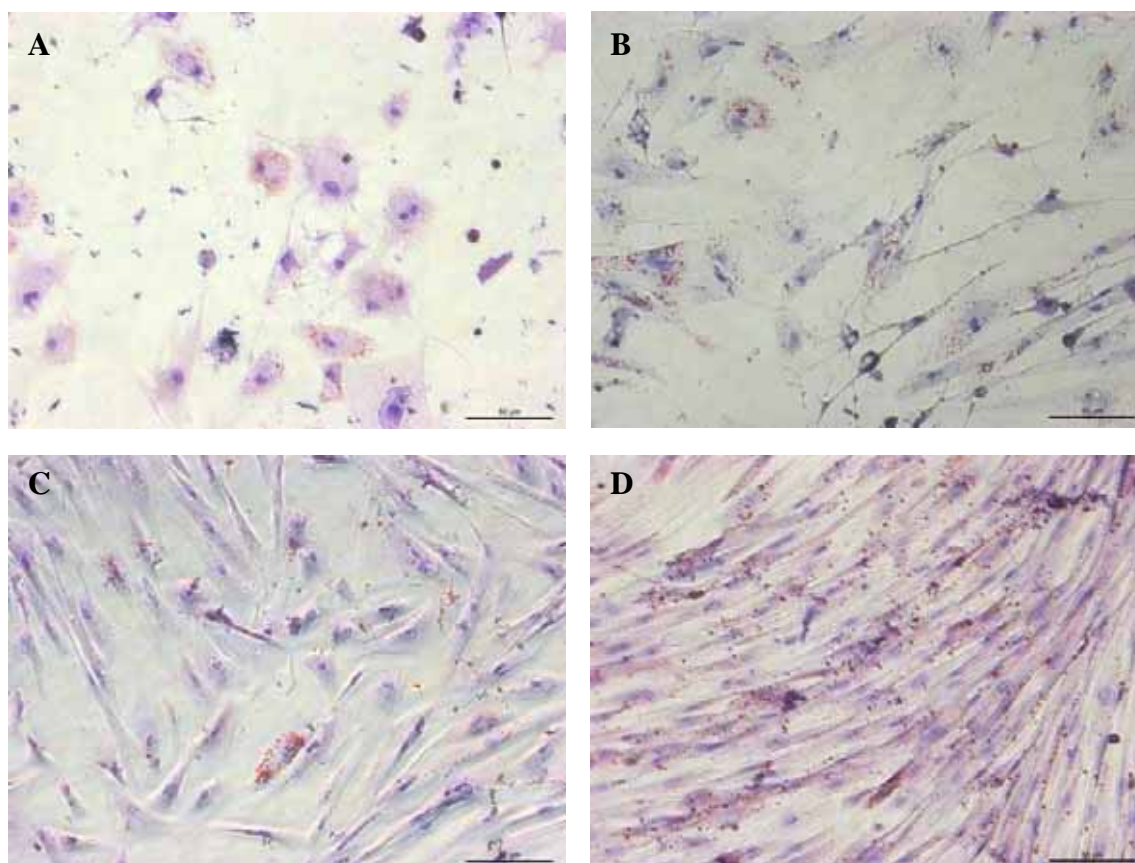


FIGURA 10. Diferenciação *in vitro* das CTMs da MA em terceira passagem antes e após a criopreservação. As células cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e coradas com *Oil Red* (Sigma) e contracoradas com Hematoxilina apresentaram gotículas lipídicas no citoplasma celular antes (A) e após (B) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal foram coradas da mesma forma e demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as células apresentam espontaneamente gotículas lipídicas no citoplasma celular (controle negativo), antes da criopreservação (C) e após (D). As células porém mantiveram a morfologia fibroblastóide. Foto tirada em microscópio de luz – A) 50 μm e B,C e D) 100 μm .

TABELA 1. Efeito da criopreservação no tempo de diferenciação osteogênica e adipogênica das Células Tronco Mesenquimais provenientes da Membrana Amniótica.

Diferenciação	Criopreservação		EPM [#]	Probabilidade [*]
	Antes	Após		
Osteogênica	424	360	23,1360	0,1774
Adipogênica	260	304	18,0000	0,2385

[#]EPM= Erro Padrão da Média. ^{*}Médias diferem significativamente na mesma linha quando $P < 0,05$

Gelatina de Wharton

O tempo médio para a diferenciação adipogênica das amostras de GW antes da criopreservação foi de 196 horas (8 dias). Uma amostra foi perdida por problemas na placa, as demais apresentaram diferenciação positiva. Todos os controles apresentaram

diferenciação espontânea. Após a criopreservação, o tempo médio para a diferenciação adipogênica foi de 288 horas (12 dias), onde todas as amostras apresentaram resultados positivos, e todos os controles também diferenciaram (Figura 11).

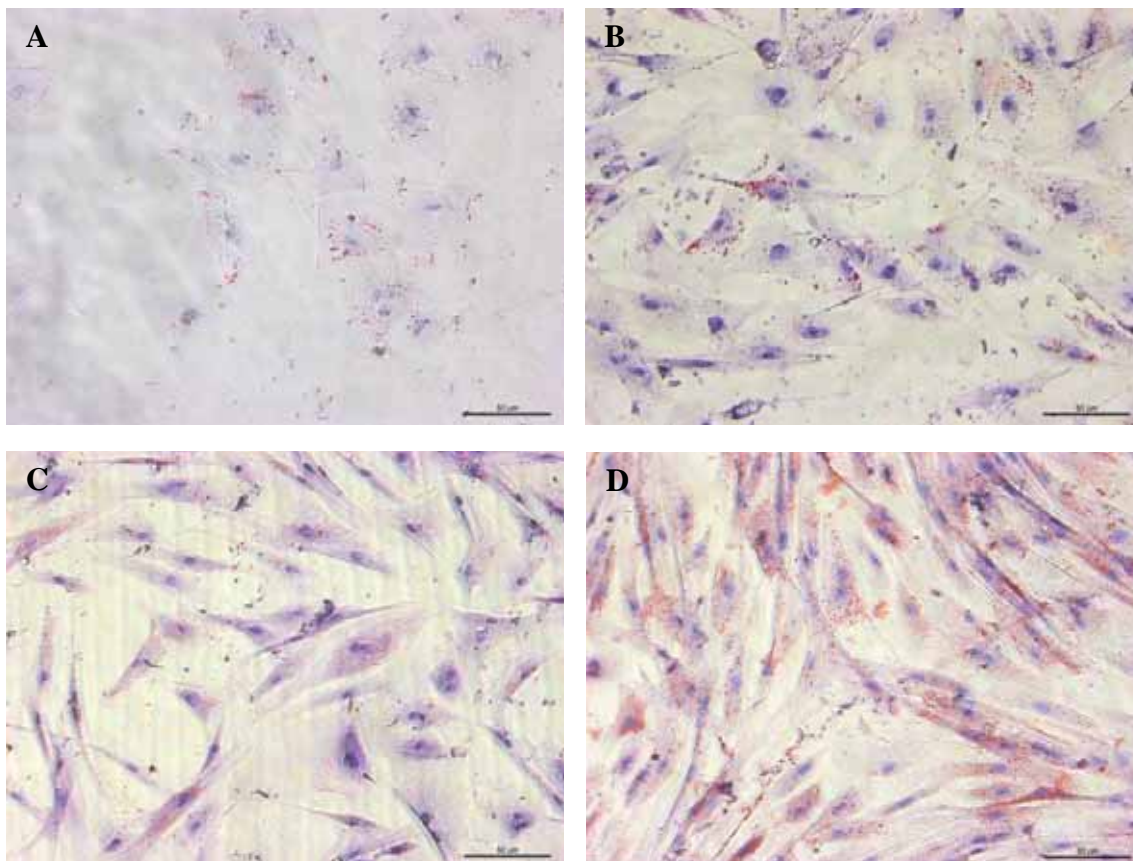


FIGURA 11. Diferenciação *in vitro* das CTMs da GW em terceira passagem antes e após a criopreservação. As células cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica e coradas com *Oil Red* e contracoradas com Hematoxilina apresentaram gotículas lipídicas no citoplasma celular antes (A) e após (C) a criopreservação. As células cultivadas em meio basal foram coradas da mesma forma demonstraram que mesmo sem a adição de meio indutor, as células apresentam espontaneamente gotículas lipídicas no citoplasma celular (controle negativo), antes da criopreservação (B) e após (D). Notar a manutenção da morfologia fibroblástica. Fotos tiradas em microscópio de luz – A, C e D- 100 μm e D- 50 μm .

Considerando, a Gelatina de Wharton (Tabela 2) podemos observar que não houve diferença estatística significativa ($P > 0.05$) em relação ao tempo de diferenciação osteogênica. Contudo, a diferenciação adipogênica apresentou diferença significativa ($P < 0.05$), com um aumento no tempo para diferenciação após a criopreservação.

TABELA 2. Efeito da criopreservação no tempo de diferenciação osteogênica e adipogênica das Células Tronco Mesenquimais provenientes da Gelatina de Whaton.

Diferenciação	Criopreservação		EPM [#]	Probabilidade [*]
	Antes	Após		
Osteogênica	296	360	34,1121	0,3730
Adipogênica	196	288	16,3039	0,0009

[#]EPM= Erro Padrão da Média. ^{*}Médias diferem significativamente na mesma linha quando $P < 0,05$

5.4.4 Citometria de Fluxo

Membrana Amniótica

O marcador positivo utilizado CD44 (Figura 12) apresentou média de 85,61% de marcações positivas antes da criopreservação (Fig.12A), e após a criopreservação a média foi de 67,83% (Fig.12B).

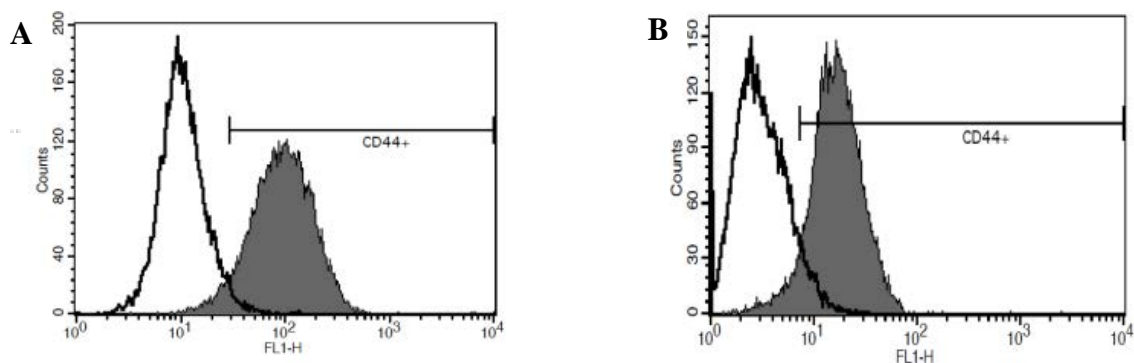


FIGURA 12. Perfil imunofenotípico (CD44) de células de Membrana amniótica em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD44 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo.

Um dos marcadores negativos utilizados foi o CD34 (Figura 13). Neste caso a média de marcação foi de 1,86% (Fig.13A) o que corresponde a negativo ($\leq 3\%$) antes da criopreservação. Após a criopreservação foi de 2,35% (Fig.13B).

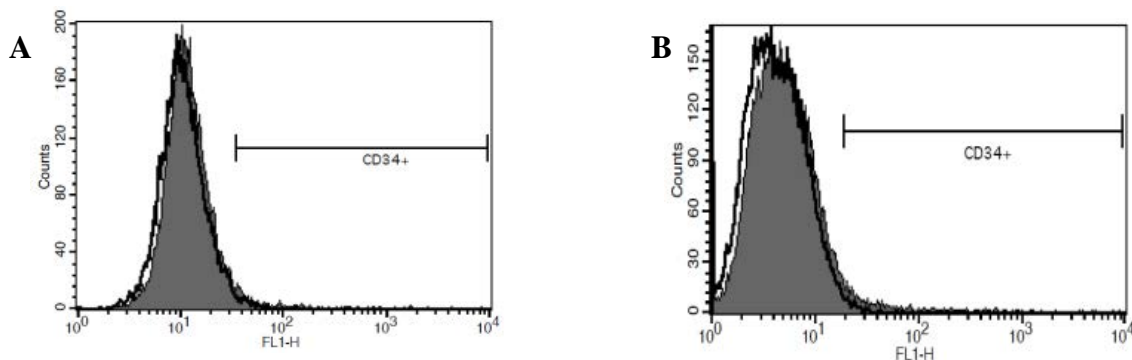


FIGURA 13. Perfil imunofenotípico (CD34) de células de Membrana Amniótica em segunda passagem antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo.

Outro marcador negativo utilizado foi o MHC II (Figura 14). Antes da criopreservação este apresentou-se negativo em média de 0,90% (Fig.14A), Após a criopreservação, foram negativas e apresentaram em média 0,54% (Fig.14B).

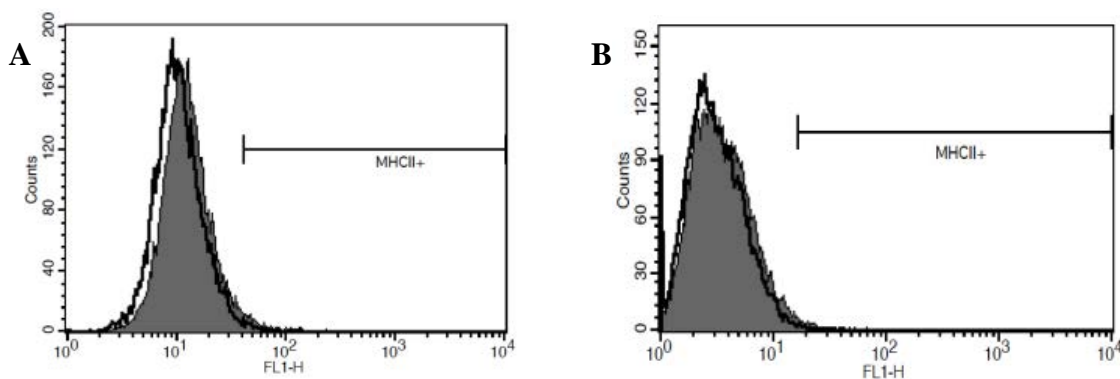


FIGURA 14. Perfil imunofenotípico (MHCII) de células de Membrana Amniótica em segunda passagem antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo.

Nas amostras de membrana amniótica (Tabela 3) antes e após a criopreservação, não verificou diferença estatística ($P > 0,05$) entre um momento e outro, para todos os anticorpos analisados, mantendo as características de adesão celular (CD44), não apresentando Células Tronco Hematopoiéticas (CD34) e não expressando antígeno de histocompatibilidade (MHCII).

TABELA 3. Efeito da criopreservação sobre a marcação (anticorpos monoclonais) nas células de Membrana Amniótica.

	Criopreservação		EPM [#]	Probabilidade [*]
	Antes	Após		
Controle	0,34	0,06	0,1375	0,3256
CD44	85,61	67,83	7,1979	0,2331
CD34	1,86	2,35	0,5012	0,4293
MHCII	0,90	0,54	0,1371	0,1855

[#]EPM= Erro Padrão da Média. ^{*}Médias diferem significativamente na mesma linha quando $P < 0,05$

Gelatina de Whaton

O marcador positivo utilizado foi o CD44. Antes da criopreservação 86,07%, foram positivas para este marcador. Após a criopreservação 82,12% das células foram positivas (Figura 15).

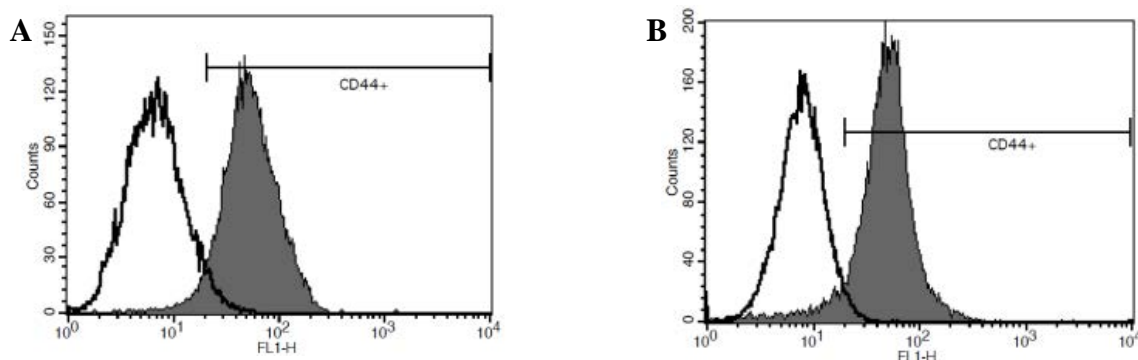


FIGURA 15. Perfil imunofenotípico (CD44) de células de Gelatina de Whaton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo.

Para o CD34, antes da criopreservação apresentaram em média 2,12% das células apresentaram positivas. Após a criopreservação a média de células marcadas foi 1,26% (Figura 16).

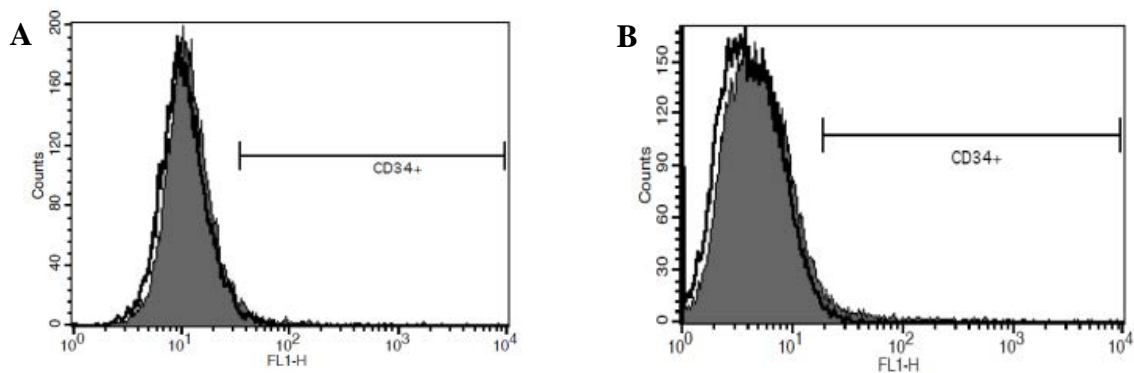


FIGURA 16. Perfil imunofenotípico (CD34) de células de Gelatina de Wharton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B). Em cinza as células que expressaram o CD34 e a linha preta sem preenchimento o controle negativo, onde não foi utilizado o anticorpo.

Outro marcador negativo avaliado foi o MHCII que apresentaram média geral, antes da criopreservação, de 1,76% de colônias marcadas. Após a criopreservação apresentou 1,29% das amostras foram positivas (Figura 17).

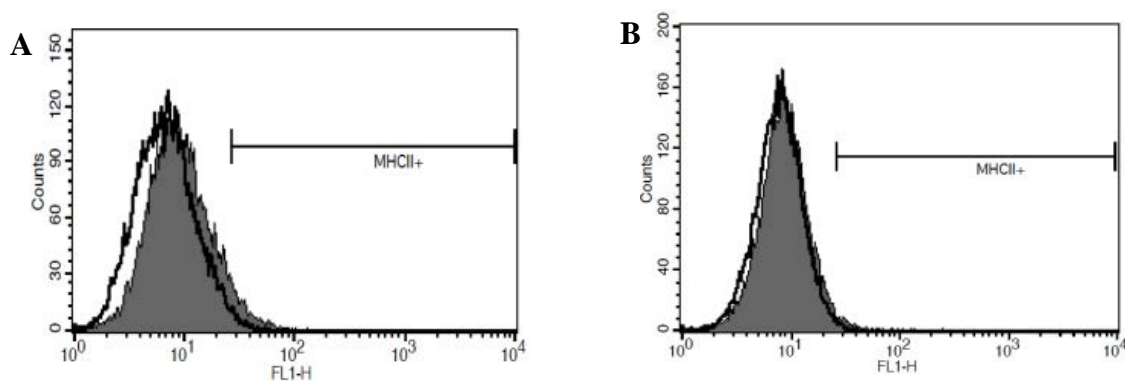


FIGURA 17. Perfil imunofenotípico (MHCII) das células de Gelatina de Whaton em segunda passagem, antes (A) e após a criopreservação (B).

Assim como as amostras de membrana amniótica, as de Gelatina de Wharton (Tabela 4) também não apresentaram diferença estatística entre os momentos estudados ($P > 0,05$), mantendo, portanto, as mesmas características antes e após a criopreservação.

TABELA 4. Efeito da criopreservação sobre a marcação (anticorpos monoclonais) nas células de Gelatina de Wharton.

	Criopreservação		EPM [#]	Probabilidade [*]
	Antes	Após		
Controle	0,20	0,03	0,0500	0,0933
CD44	86,07	82,11	3,9470	0,6396
CD34	2,12	1,26	0,4118	0,3199
MHCII	1,76	1,29	0,4127	0,0961

[#]EPM= Erro Padrão da Média. ^{*}Médias diferem significativamente na mesma linha quando $P < 0,05$

5.4.5. Imunocitoquímica

As amostras de membrana amniótica (Figura 18) e Gelatina de Wharton (Figura 19) foram analisadas por imunocitoquímica após a criopreservação em segunda passagem, e apresentaram-se positivas para o anticorpo anti-vimentina.

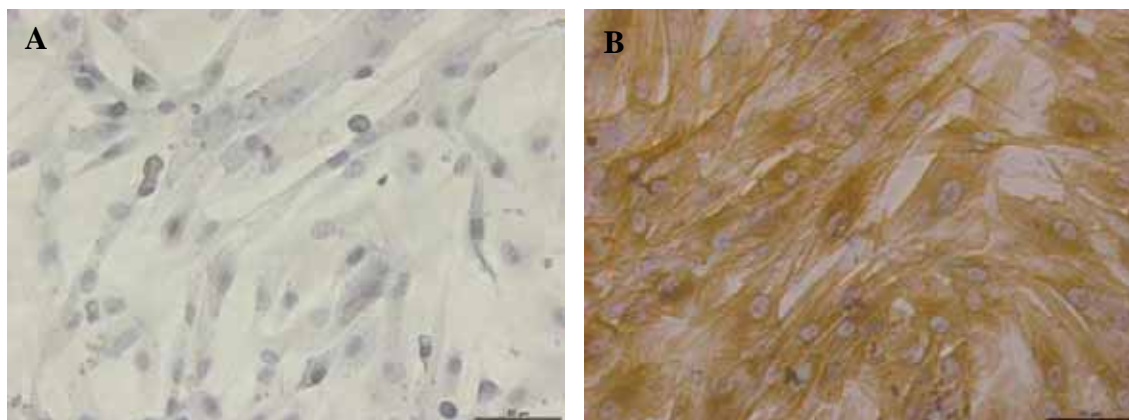


FIGURA 18. Análise por imunocitoquímica das células de Membrana Amniótica. O controle (A) sem a utilização do anticorpo anti-Vimentina, permaneceu não corado, e a marcação (B) indicando característica de CTMs. Foto tirada em microscópio de luz – 100 μ m.

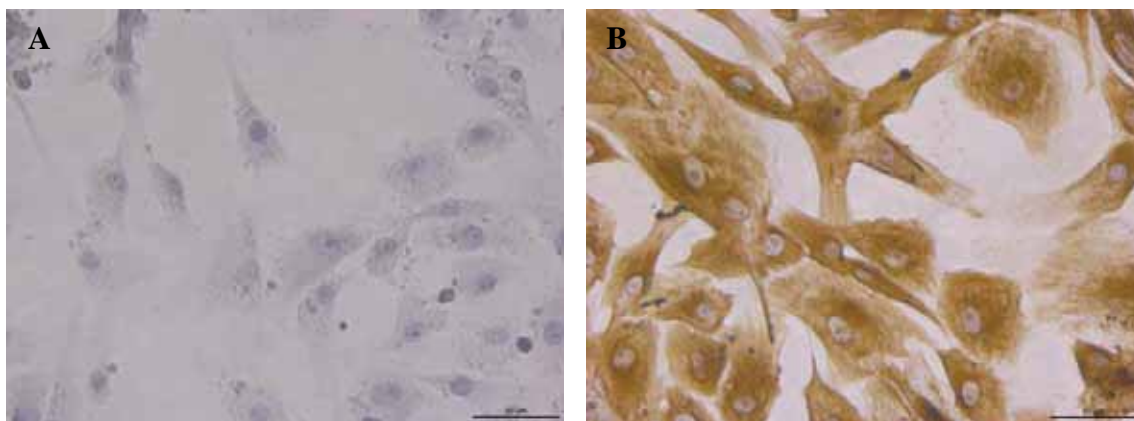


FIGURA 19. Análise por imunocitoquímica das células obtidas da Gelatina de Wharton. O controle (A) sem a utilização do anticorpo anti-Vimentina, permaneceu não corado, e a marcação (B) indicando característica de CTMs. Foto tirada em microscópio de luz – 100 μm .

4. DISCUSSÃO

Com a finalidade de verificar o potencial de fontes alternativas à medula óssea, as células derivadas das membranas extraembrionárias e do cordão umbilical foram eleitas neste trabalho, pois possuem características interessantes para a formação de bancos de células tronco. No entanto, para que isso se concretize é necessário um conhecimento, inicialmente, básico dessas células tanto antes de criopreservadas, assim, como após o processamento de criopreservação.

4.1 Comportamento celular

O meio utilizado no presente experimento foi o DMEM – LG, suplementado com 20% SFB. Este mesmo meio foi utilizado por Barlow et al. (2008), que compararam células de medula óssea e de placenta humana como fonte de CTMs, observando resultados semelhantes relacionados a proliferação celular.

Neste experimento, as células apresentaram formato fibroblastóide em aproximadamente 2,5 e 2 dias, para membrana amniótica e gelatina de Wharton respectivamente, ou seja, em menor tempo que as da medula óssea, para a qual é necessário 3-4 dias (CSAKI et al., 2008). Após a criopreservação as células de MA e de GW voltaram ao formato fibroblastóide de forma ainda mais rápida, com 6 dias, obtendo vantagem em relação a CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical, onde é necessário entre 7-14 dias (LEE et al., 2005).

4.2 Contagem celular até a terceira passagem

A contagem foi realizada e analisada a título de curiosidade em três passagens, e verificou-se um comportamento diferenciado das células de MA antes e após a criopreservação, onde no primeiro momento a tendência das células era de redução em número, e no segundo a tendência era de aumento. As células de GW apresentaram comportamento semelhante, tendendo a reduzir o número celular a cada passagem.

Vale ressaltar, que três passagens pode não ser suficientes para verificar a real tendência dessas células, uma vez que a maioria dos trabalhos utilizam mais de seis

passagens (LEE et al., 2013, RUTIGLIANO et al., 2013, YOON et al., 2013). No entanto foi observado em estudo com tecido de cordão umbilical humano, que até a terceira passagem, antes e após a criopreservação o número de células se mantiveram constantes, e a tendência nas passagens consecutivas foi o aumento no número celular (BALCI & CAN, 2013) discordando do resultado deste experimento, uma vez que esta característica foi observada somente nas células de MA antes da criopreservação.

4.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular (aproximada) foi realizada, nas células que foram criopreservadas, essa etapa é muito importante para o experimento, pois através dela podemos observar a ação do meio crioprotetor em conjunto com a técnica de criopreservação e descongelação dessas células, na vitalidade celular.

A substância crioprotetora, neste caso, foi o DMSO, ele é bastante utilizado em protocolos de criopreservação (LEE et al., 2004b, COSTA et al., 2012; GINIS et al., 2012), isso porque é um protetor intracelular, que impede a formação de cristais de gelo no interior das células (JANZ et al., 2012) e apresenta pequena ou nenhuma citotoxicidade, desde que utilizado em baixas concentrações (CHAYTOR et al., 2012). Estas propriedades são de extrema importância para as células permanecerem por tempo prolongado sob baixas temperaturas.

Neste estudo foi utilizado meio crioprotetor com 10% de DMSO, concentração que é estabelecida para diferentes fontes celulares (BALCI & CAN, 2013; XU et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Contudo não existe padronização da solução na qual o DMSO será diluído (RENZI et al., 2012; WU et al., 2012). No presente estudo foi utilizado 90% de SFB + 10% DMSO, uma vez que resultados positivos foram observados com esta metodologia em outras espécies (MAIA et al., dados não publicados). Apesar do baixo número de amostras estudadas até o momento, os resultados obtidos com esta solução de criopreservação em equinos foi bastante animador, e estes foram reproduzido no presente experimento onde a metodologia também apresentou resultados satisfatórios.

Além disso, o método de criopreservação é importante para a viabilidade, para isto, as células foram criopreservadas de forma lenta, utilizando o “*Mr. Frosty*” (Nalgene™ -Termo) também utilizado por outros autores (WOLBANK et al., 2007;

CHAYTOR et al., 2012; POLCHOW et al., 2012). Para a descongelação foi utilizada a técnica descrita por Chaytor et al. (2012) que tem por finalidade melhorar a viabilidade celular após a criopreservação.

Neste estudo após quatro semanas criopreservadas, as amostras não apresentaram uma queda acentuada na porcentagem de viabilidade, a MA apresentou 94,6% após a criopreservação (antes 97%), e as células de gelatina de Wharton apresentaram 93,5% (antes 98,8%). Desta forma, em ambos os grupos as células foram consideradas viáveis, sendo estes resultados semelhantes ao descritos anteriormente na literatura (LEE et al., 2005; GINIS et al., 2012).

4.4 Caracterização antes e após a criopreservação das CTMs

Algumas características são fundamentais, e confirmam a identidade dessas células, assim como a aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide (do inglês *fibroblast-like*), diferenciação em tecidos da mesma origem embrionária e ainda marcadores de superfícies, que as células devem ou não expressar.

4.4.1 Potencial de diferenciação em linhagem mesenquimal

Para a diferenciação celular foram utilizados *kits* comerciais e de forma padronizada. As diferenciações das células de membrana amniótica e gelatina de Wharton foram realizadas em terceira passagem antes e após a criopreservação, quanto maior o número de passagens menor é o potencial de diferenciação (REQUICHA et al., 2012).

As células eram mantidas em meio de diferenciação até que houvesse mudanças morfológicas e, então, fixadas e coradas juntamente com os controles negativos.

Diferenciações: Osteogênica e Adipogênica

As células se diferenciaram na linhagem osteogênica em 13 e 9 dias, para membrana amniótica e gelatina de Wharton respectivamente, demonstrando uma diferenciação mais rápida comparada ao tecido adiposo canino, onde Requicha et al. (2012) mostraram que foram necessários 35 dias.

Outra característica interessante demonstrada por Mauro et al. (2010) em ovinos, foi que a diferenciação da membrana amniótica é uniforme quando comparado com a do tecido adiposo que se apresentou parcial, mantendo este potencial ao longo das passagens, o que é uma vantagem, quanto à utilização dessas células para a terapia celular voltada para a regeneração óssea.

Já para a diferenciação adipogênica foram necessários 8 dias (membrana amniótica) e 6 dias para gelatina de Wharton, indicando uma facilidade maior em diferenciação para esta linhagem.

Após a criopreservação o potencial de diferenciação foi mantido nas duas linhagens, assim como em diversos estudos (LEE et al., 2004b em sangue de cordão umbilical; JANZ et al., 2012 em fluido amniótico; GIUSEPPE et al., 2014 em gelatina de Wharton).

Contudo, uma característica interessante neste estudo foi a auto diferenciação dos controles negativos, observadas nas diferenciações osteogênicas em menor frequência e nas adipogênicas com maior frequência, em ambas as amostras (MA e GJ).

Algo semelhante foi observado por Polchow et al. (2012), no cultivo de células provenientes de artérias do cordão umbilical humano, onde foi observado vacúolos corados pelo Oil Red O, em duas amostras, porém eles classificaram essas células sem potencial de diferenciação, e diferentemente do presente experimento, foi utilizado 10% de *Fetal Calf Serum* (FCS). Contudo os autores não fizeram controle negativo de todas as seis amostras utilizadas no experimento, apenas realizaram controle em duas.

A concentração de SFB (20%) no meio de manutenção dessas células deve ser considerada, e pode ter influenciado na diferenciação espontânea, uma vez que, os meios de diferenciação (adipogênica e osteogênica), recebem determinada quantidade de SFB na formulação

Vale ressaltar que a maioria dos artigos analisados não avaliam a diferenciação espontânea dos controles negativos cultivados a 10% de soro (SFB ou FCS) (CSAKI et al., 2008; ROCCA et al., 2009; NAALDIK et al., 2012; PARK et al., 2012; RUTIGLIANO et al., 2013), ou mesmo a 20% (MAURO et al., 2010).

Além da concentração, sabe-se que o tipo de soro, pode também influenciar positivamente na diferenciação, Diascro et al. (1998) evidenciaram diferenciação de células de linhagem osteogênica em adipócitos, utilizando soro de coelho inativado, e atribuíram aos ácidos graxos a principal função nesse processo, uma vez que eles

suprimem a expressão de Fosfatase Alcalina e as células passam a apresentar características de grupos celulares adipogênicos.

Outro fator importante observado por Peng et al. (2012) em CTMs de ratos é que a densidade e o contato entre as células influenciam positivamente nas diferenciações osteogênica e adipogênica, ou seja, quanto maior a densidade e o contato entre as células, maior é o potencial de diferenciação, mas isso acontece quando as células são induzidas a isto.

Neste caso, não se sabe se a densidade e o contato entre células poderia também influenciar nos controles negativos, uma vez que eles foram cultivados até uma confluência de praticamente 100%, ou seja, alta densidade e contato entre células.

Ainda são necessários estudos relacionados às concentrações de soro e o quanto ele pode influenciar na diferenciação osteogênica e adipogênica, pois até o momento não foi encontrado qualquer relato.

4.4.2 Caracterização Imunofenotípica por Citometria de Fluxo

As células foram avaliadas em dois momentos distintos, antes e após a criopreservação, com a finalidade de avaliar as possíveis mudanças nos marcadores de superfície expressos pelas células após um tempo curto de criopreservação. Para isso foram utilizados três marcadores: CD44, CD34 e MHCII (HLA-DR) já consagrados em diversos estudos com CTMs (WOLBANK et al., 2007; DIAZ-PRADO et al., 2011; POLCHOW et al., 2012; YUAN et al., 2012; RUTIGLIANO et al., 2013).

As células marcadas com o CD44 para membrana amniótica e gelatina de Wharton foram consideradas positivas antes e após a criopreservação, apesar de não ser uma excelente marcação, pois o ideal seria uma marcação $\geq 95\%$ (DOMINICI et al., 2006). Neste caso as de MA apresentaram em média 85,61% antes e 67,83% após a criopreservação, e as de GW 86,07% e 82,11% antes e após a criopreservação, respectivamente. A utilização de um segundo marcador positivo para CTMs (CD90 ou CD105, por exemplo), seria necessário neste caso, para confirmar marcação positiva de forma mais idônea, o que não foi possível no presente experimento.

Considerando os marcadores negativos, CD34 e MHC II, Dominici et al. (2006), sugerem que a marcação para ser considerada negativa deve expressar marcação $\leq 2\%$,

o que é comum para os dois anticorpos nas CTMs (WOLBANK et al.; 2007; MARTINELLO et al., 2011; YANG et al., 2011; KOO et al., 2012; YUAN et al., 2012).

No presente estudo, para o CD 34 houve alteração de marcação nos dois tecidos estudados. As de MA mantiveram-se negativas antes da criopreservação (1,86%), porém após a criopreservação ocorreu um aumento na marcação (2,35%), já nas células de GW foi observada o contrário, maior marcação nas células antes da criopreservação (2,12%) e menor após (1,26%). Estes resultados são semelhantes aos observados por Seo et al. (2012) onde as células de GW canina apresentaram marcação positiva para o CD34 (2,62%). Entretanto, no estudo em questão não houve criopreservação das amostras.

Considerando a classificação sugerida por Dominici et al. (2006), relacionada à células de medula-óssea humana, pode haver diferenças quanto à espécie utilizada bem como a fontes diferentes, como demonstraram Miao et al. (2006) em células derivadas de placenta e medula óssea humana nas quais ocorreu marcação do CD 34 nas CTMs de placenta (4,6%), enquanto que as de MO apresentaram-se negativas (1,8%).

Neste experimento em dois momentos as amostras apresentarem porcentagens acima do estabelecido para negativo ($\leq 2\%$), porém estão muito próximas desse valor, e essa classificação (negativa ou positiva), varia de acordo com o autor em 2 a 3% (DOMINICI et al., 2006; SEO et al., 2012, YUAN et al., 2013).

Foi observado nas amostras estudadas (MA e GW) antes e após a criopreservação, que a expressão de MHC II se manteve negativa. Isto também foi observado por Todorov et al. (2010) e Giuseppe et al. (2014) demonstraram que o momento da criopreservação, tende a alterar a expressão do MHC II. Isto é, quando criopreservado em cultivo primário as células apresentaram expressão de aproximadamente 1,0% e em primeira passagem a expressão passou a 1,6%, chegando mais próximo do positivo.

Sabe-se que MHC do tipo II somente são expressos nas membranas de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) que inclui células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (Teva et al., 2010), e a não expressão nas CTMs, atribui à elas um efeito imunomodulatório.

4.4.3 Imunocitoquímica

A imunocitoquímica, no presente estudo foi realizada somente pós-criopreservação e em segunda passagem verificando marcação positiva para Ac. Anti-vimentina para ambas as amostras. Resultados semelhantes foram observados por Balci & Can (2013), que observaram marcação positiva para Vimentina na primeira e na sexta passagem das células mesenquimais derivadas de tecido de cordão umbilical humano, antes e após a criopreservação, caracterizando-as como CTMs.

5. CONCLUSÕES

Analisando cuidadosamente os resultados obtidos, sugere-se as seguintes conclusões:

- O potencial de proliferação foi mantido, após a criopreservação;
- A viabilidade celular foi preservada com a utilização do meio de criopreservação contendo 10% de DMSO + 90% de SFB;
- O potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico foi claramente observado nos dois momentos analisados, ou seja, a criopreservação não prejudicou essa característica;
- Houve evidente diferenciação espontânea, em ambas as linhagens mesenquimais, necessitando mais estudos, uma vez que não há relatos claros sobre essa característica em células originadas das membranas extraembrionárias, ou mesmo de outras fontes na literatura consultada;
- Não foi observada influencia da criopreservação, na expressão ou não dos marcadores utilizados para caracterizar as CTMs, apesar de uma variação discreta no marcador CD34 tanto nas células de MA quanto nas de GW.
- Tanto as células da MA como da GW apresentaram marcações negativas e menores de MHC II após a criopreservação indicando uma característica de baixa imunogenicidade mesmo após a conservação a baixas temperaturas;
- A marcação de Anti-Vimentina, nas células criopreservadas, demonstrou que após a criopreservação as células mantêm a característica de CTMs.

Com isso podemos concluir que as células de membrana amniótica e gelatina de Wharton, são fontes seguras, mantendo as mesmas características após 4 semanas criopreservadas, porém é necessário estudos aprofundados relacionados à característica de diferenciação espontânea, e qual o efeito dessa característica em futuras aplicações clínicas.

REFERÊNCIAS

ÂNGELO P. C.; FERREIRA A. C. S.; FONSECA V. D.; FRADE S. P.; FERREIRA C. S.; MALTA F. S. V.; PEREIRA A. K.; LEITE H. V.; BRUM A. P.; PARDINI V. C.; GOMES K. B.; CABRAL A. C. V., Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genetics and Molecular Research*, v.11, n.2, p.1002-1012, 2012.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S., Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal Cellular and Molecular Medicine*, v.8, n.3, p.301-316, 2004.

BALCI, D.; CAN, A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, n.1, p. 60-72, 2013.

BARLOW, S.; BROOKE, G.; CHATTERJEE, K.; PRICE, G.; PELEKAMOS, R.; ROSSETI, T.; DOODY, M.; VENTER, D.; PAIN, S.; GILSHENAN, K.; ATKINSON, K. Comparison of human placenta- and bone marrow-Derived multipotent mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, v. 17, p.1095–1108, 2008.

BETHESDA, M. D., Stem cell Basics: Introduction. In: *Stem Cell Information* [World Web Site], National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009a - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>.

BETHESDA, M. D., Stem cell Basics: What are embryonic stem cells?. In: *Stem Cell Information* [World Web Site], National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009b - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics3>.

BETHESDA, M.D. What are induced pluripotent stem cells?. In *Stem Cell Information* [World Wide Web site], National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009c. <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics10.aspx>

BIEBACK, K.; BRINKMANN, I., Mesenchymal stromal cell from human perinatal tissues: from biology to cell therapy. *World Journal Stem Cells*, v.2, n.4, p.81-92, 2010.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MESELLIS, L. M. F.; JANZ, F.L., Características Biológicas das Células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v.31, supl.1, p.25-35, 2009.

CÂMARA, N. O. S.; SEMEDO, P.; OLIVEIRA, D. O., Mini-curso Tórico-prático: Laboratório de Isolamento/Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimal. In: 3º Simpósio Multidisciplinar Sobre Células-Tronco, p. 1-7, 2008.

CARDOSO, G. B. C.; ARRUDA, A. C. F., O papel das células tronco na engenharia tecidual. *Revista Ciência & Cognição*, v.14, n.3, p.214-219, 2009.

CARLIN R.; DAVIS D.; WEISS M.; SCHULTZ B.; TROYER D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.4, n.8, 2006 - doi:10.1186/1477-7827-4-8.

CHANG, Y-J.; HWANG, S-M.; TSENG, C-P.; CHENG, F-C.; HUANG, S-H.; HSU, L-F.; HSU, L-W.; TSAI, M-S., Isolation of Mesenchymal Stem Cells eith Neurogenic Potencial from the Mesoderm od the Amniotic Membrane. *Cells Tissues Organs*, v. 192, p. 93-105, 2010.

CHAYTOR J. L.; TOKAREW J. M.; KWU L.; LECLERE M.; TAM R. Y.; CAPICCIOTI C. J.; GUOLLA L.; MOO E. V.; FINDLAY C. S.; ALLAN S. A.; BEN R. N., Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*, v.22, n.1, p.123-133, 2012.

CHEN, B.; WRIGHT, B.; SAHOO, R.; CANNON, C.J. A novel alternative to cryopreservation for the short-term storage of stem cells for use in cell therapy using

alginate encapsulation. *Tissue Engineering: Part C*, v. 19, n. 7, p. 9, 2013 - doi: 10.1089/ten.tec.2012.0489.

CHEN, H-C.; LEE, Y-S.; SIEBER, M.; LU, H-T.; WEI, P-C.; WANG, C-N.; PENG, H-H.; CHAO, A-S.; CHENG, P-J; CHANG, S-D.; CHEN S-J.; WANG, T-H. MicroRNA and messenger RNA analyses of mesenchymal stem cells derived from teeth and the Wharton Jelly of umbilical cord. *Stem Cells and Development* - doi: 10.1089/scd.2011.0186.

CIUCĂ D. R.; SORIȚĂU O.; ȘUȘMAN S.; PO V. I.; MIHU C. M.; ROM J. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. *Morphology Embryology*, v.52, n.3, p.803–808, 2011.

CREMONESI, F.; VIOLINI, S.; LANGE-CONSIGLIO, A.; RAMELLI, P.; RANZENIGO, G.; MARIANI, P. Isolation, in vitro culture and characterization of fetal umbilical cord stem cells at birth. *Veterinary Research Communications*, v.32, n.1, p.139-142, 2008.

CREMONESI F., CORRADETTI A., LANGE-CONSIGLIO A. Biology and therapeutic use of domestic animal stem cells fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Therigenology*, n.75, p.1400-1415, 2011.

CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARRO, D.; CREMONESI, F.; CONSIGLIO, A.L. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. *Society for Reproduction and Fertility*, p. 1741–7899 - Online version via www.reproduction-online.org - doi: 10.1530/REP-12-0437.

COSTA, P.F.; DIAS, A.F.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Cryopreservation of cell/scaffold tissue engineered constructs. *Tissue Engineering: Part C*, v. 18, n. 11, p. 852-858, 2012 - DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0649 pag.852-858.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. N Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a

biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochemical Cell Biology*, v. 2007, n. 128, p. 507–520, 2007.

DEL CARLO, R. J. ; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. F.; PINHEIRO, L. C. P., Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto em ortopedia veterinária. *Revista Ceres*, v. 51, n. 295, p. 411-418, 2004.

DIASCRO, D. D. JR., VOGEL, R. L., JOHNSON, T. E.; WITHERUP, K. M.; PITZENBERGER, S. M.; RUTLEDGE, S. J.; PRESCOTT, D. J.; RODAN, G. A.; SCHMIDT, A. High Fatty Acid Content in Rabbit Serum Is Responsible for the Differentiation of Osteoblasts Into Adipocyte-like Cells. *Journal of Bone And Mineral Research*, v.13, n.1, 1998.

DÍAZ-PRADO, S.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; HERMIDA-GÓMEZ,T.; RENDAL-VÁZQUEZ, E.; FUENTES-BOQUETE, I.; TORO, F.J.; BLANCO, F. J., Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Engineering*, v.17, n.1, p.49-59, 2011.

DI-NICOLA M., CARLO-STELLA C., MAGNI M., MILANESI M., LONGONI P.D., MATTEUCCI P. et al., Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, v.99, p.3838–3843, 2002.

DOMINICI M.; LE BLANC K.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH I.; MARINI F.C.; KRAUSE D.S.; DEANS R.J.; KEATINGS A.; PROCKOP D.J.; HORWITZ E.M. Position Paper: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DUAN, X.; ZHUC, X.; DONG, X.; YANG, J.; HUANG, F.; CENA, S.; LEUNG, F.; FANC, H.; XIANG, Z. Repair of large osteochondral defects in a beagle model with a novel type I collagen/glycosaminoglycan-porous titanium biphasic scaffold. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, p. 3951–3957, 2013.

FERNANDES R. A.; COSTOLA-SOUZA C.; SARMENTO C. A. P.; GONÇALVES L.; FAVARON P. O.; MIGLINO M.A., Placental tissues as sources of stem cells – Review. *Open Journal of Animal Sciences*, v.2, n.3, p.166-173, 2012 - doi:10.4236/ojas.2012.23023.

FIBBE, W. E., Mesenchymal stem cells. A potencial source for skeletal repair. *Annals of the Rheumatic Diseases*, n.61, supl.II, p.29-31, 2002.

FONG, C-Y.; SUBRAMANIAN, A.; GAUTHAMAN, K.; VENUGOPAL, J.; BISWAS, A.; RAMAKRISNA, S.; BONGSO, A., Human umbilical cord Wharton's Jelly stem cells undego enhanced chondrogenic scaffolds and in a sequential two-stage culture medium environment. *Stem Cell Reviews and Reports*, v.8, n.1, p.195-209, 2011.

FRIENDENSTEIN A. J.; CHAILAKHJAN R. K.; LALYKINA K. S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell And Tissue Kinetics.*, v.3, p.393-403, 1970.

FU, Q.; SONG, X-F.; LIAO, G-L.; DENG, C-L.; CUI, L. Myoblasts differentiated from adipose-derived stem cells to treat stress urinary incontinence. *Urology*, v. 75, n. 3, p. 719-723, 2010.

GAO, Y.; ZHU, Z.; ZHAO, Y.; HUA, J.; MA, Y.; GUAN, W. Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Science*, v. 15, p. 3698-3710, 2014 - doi:10.3390/ijms15033698

GINIS, I.; GRINBLAT, B.; SHIRVAN, M.H. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Engineering: Part C*, v. 18, n. 6, p. 453 a 463, 2012 - DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0395

GIUSEPPE, F. D.; PIERDOMENICO, L.; ELEUTERIO, E.; SULPIZIO, M.; LANUTI, P.; RIVIELLO, A.; BOLOGNA, G.; GESI, M.; DI ILIO, C.; MISCIA, S.; MARCHISIO, M.; ANGELUCCI, S. Cryopreservation effects on Wharton's jelly stem cells proteome. *Stem Cell Reviews and Reports* - DOI 10.1007/s12015-014-9501-8
Publicado on-line em 12 de Março 2014- Acesso: 18/03/2014.

GOMES T.; PRANKE P. Comparação entre as células tronco de sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo: uma revisão. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.40, p.25-30, 2008.

GUEST, D.J.; OUSEY, J.C.; SMITH, M.R.W. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* , v.1, p. 1–9, 2008.

HOYNOWSKI, S.M.; FRY, M.M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; TUCKER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K. E., Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, n. 362, p. 347-353, 2007.

IACONO E.; BRUNORI L.; PIRRONI A.; PAGLIARO P.P.; RICCI F.; TAZZARI P.L.; MERLO B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, v.143, p.455–468, 2012.

IGLÉZIAS, J. C. R., Célula-Tronco. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, v.6, n.2, p. III – IX, 2004.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E.M.; PERA, M.; MANUELPILLAI, U. Stem Cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potencial. *Biology of reproduction*, v. 77, p. 577-588, 2007.

JANZ, F.L.; ROMÃO, C. M., BYDLOWSKI, S. P., Líquido amniótico como fonte de células tronco mesenquimais. Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde, Ponta Grossa, v.15, n.1, p.7-10, 2009.

JANZ, F.L.; DEBES, A.A.; CAVAGLIERI, R.C.; DUARTE, S.A.; ROMÃO, C.M.; MOR, A.F.; ZUGAIB, M.; BYDLOWSKY, S.P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.2012, p. 10, 2012 - doi:10.1155/2012/649353.

JIN, G-J.; YIN, X-J.; YU, X-F.; CHO, S-J.; LEE, H-S.; LEE, H-J.; KONG, I-K.; Enhanced tyrosine hydroxylase expression in PC12 cells co-cultured with feline mesenchymal stem cells. Journal Veterinary Science, v.8, n.4, p. 377-382, 2007.

KADNER, A.; HOERSTRUP, S. P.; TRACY, J.; BREYMAN, C.; MAURUS, C. F.; MELNITCHOUK, S.; KADNER, G.; TURINA, G. Z. M., Human umbilical cord cells: a new cell source for cardiovascular tissue engineering. The Annals of Thoracic Surgery, v.74, p.1422-1428, 2002.

KAWASAKI-OYAMA, R. S.; BRAILE, D. M.; CALDAS, H. C.; LEAL, J. C. F.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; ABBUD FILHO, M.; SANTOS, I., Cultivo de células mesenquimais do sangue de cordão umbilical com e sem o uso de gradiente de Ficoll-Paque. Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular, v.23, n.1, p. 29-34, 2008.

KIM, J-Y.; JEON, H. B.; YANG, Y. S.; OH, W.; CHANG, J. W., Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. World Journal of Stem Cells, v.2, n.2, p.34-38, 2010.

KLYUSHNENKOVA E., MOSCA J.D., ZERNETKINA V., MAJUMDAR M.K., BEGGS K.J., SIMONETTI D.W. et al., T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. Journal Biomedical Science, v.12, p.47-57, 2005.

KOO B.K.; PARK I.Y.; KIM J.; KIM JI-H.; KNOW A.; KIM M.; KIM Y.; SHIN C.J.; KIM JONG-H. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stromal cells from human full term placenta. *Korean Medicine Science*, v.27, p.857-863, 2012.

KUTZLER, M.; SAHLFELD, L.; FELLOWS, E. Who let the dogs in: A canine trophoblast invasion model for pre-eclampsia. *Reproduction Domestic Animal*, v. 47, suppl. 6, p. 186–189, 2012 - doi: 10.1111/rda.12037.

LE BLANC K., TAMMIK C., ROSENDAHL K., ZETTERBERG E., RINGDÉN O., HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, v.31, p. 890-896, 2003.

LEE, O. K.; KUO, T. K.; CHEN, W.; LEE, K.; HSIEH, S.; CHEN, T., Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, v.103, n. 5, p.1669-1675, 2004a.

LEE M. W.; CHOI J.; YANG M. S.; MOON Y. J.; PARK J. S.; KIM H. C.; KIM Y. J. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.320, p.273-278, 2004b.

LEE M. W.; YANG M. S.; PARK J. S.; KIM H. C.; KIM Y. J.; CHOI J. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *International Journal of Hematology*, v.81, p.126-130, 2005.

LEE, J.M.; JUNG, J.; LEE, H-J.; JEONG, S.J.; CHO, K.J.; HWANG, S-G.; KIM, G.J. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *International Immunopharmacology*, v. 13, p. 219–224, 2012 - doi:10.1016/j.intimp.2012.03.024

LEE K. S.; NAH J.-J; LEE B.-C; LEE H.-S; SO B.-J; CHA S.-H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical

cord matrix by collagenase digestion. *Research in Veterinary Science*, v.94, p.144-15, 2013.

LIM, J-H.; BYEON, Y-E.; RYU, H-H.; JEONG, Y-H.; LEE, Y-W.; KIM, W.H.; KANG, K-S.; KWEON, O-K., Isolation of canine Cord blood-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced spinal cord injured dogs. *Journal of Veterinary Science*, v.8, n.3, p.275-282, 2007.

LIU, G.; YE, X.; ZHU, Y.; LI, Y.; SUN, J.; CUI, L.; CAO, Y., Osteogenic differentiation of GFP-labeled human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells after cryopreservation. *Cryobiology*, 2011 - doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.05.005.

LIU S.; HOUK.D.; YUAN M.; PENG J.; ZANG LI.; SUI X.; ZHAO B.; XU W.; WANG A.; LU S.; GUO Q. Characteristics of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2013 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.07.001>.

MAJUMDAR M.K., KEANE-MOORE M., BUYANER D., HARDY W.B., MOORMAN M.A., MCINTOSH K.R. et al., Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal Biomedicine Science*, v.10, p.228-241, 2003.

MACHADO, C.V.;; TELLES, P.D.S.; NASCIMENTO, I.L.O. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista Brasileira de Hematologia*, v. 35, n. 1, p. 62-67, 2013.

MANUELPILLAI, U.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C.V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potencial therapeutic tools to combat tissue inflammation ond fibrosis? *Placenta*, v. 32, p. 320-325, 2011.

MARCUS, A.J.; COYNE, T.M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I.B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*, v. 76, p. 130-144, 2008.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*, v. 91, p. 18–24, 2011.

MAURO, A.; TURRIANI, M.; IOANNONI, A.; RUSSO, V.; MARTELLI, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINOCCHI, N.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communication*, v. 34, suppl. 1, p. 25-28, 2010 – doi: 10.1007/s11259-010-9393-2

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T., *Veterinary Embryology*. Blackwell Publishing Ltd. 1^a ed., 2006.

MEREGALLI, M.; FARINI, A.; TORRENTE, Y. Mesenchymal Stem Cells as Muscle Reservoir. *Journal Stem Cell Research Therapy*, v. 1, n. 2, 9 p., 2011.

MIAO Z.; JIN J.; CHEN L.; ZHU J.; HUANG W.; ZHAO J.; QIAN H.; ZHANG X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v.30, p. 681-687, 2006.

MIKI, T.; MITAMURA, K.; ROSS, M. A.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Short communication identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 75, p. 91–96, 2007.

MONTEIRO B.S.; NETO N. M. A.; DEL CARLO R. J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v.40, n.1, 2010 - <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782010000100040>.

MONTI M.; PEROTTI C.; FANTE C.D.; CERVIO M.; REDI C.A.; Stem Cells: sources and therapies. *Biology Research*, v.45, p.207-214, 2012.

MORINI, A. C.; BARBOSA, P. L. G.; MELNIC, R.V.; JUNIOR, J. C. M.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MARTINS, D. S.; PEREIRA, F. T. V.; FAVARON, P. O.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A., Caracterização de membrans fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.9, p.437-445, 2008.

MONTANUCCI, P.; BASTA, G.; PESCARA, T.; PENNONI, I.; DI GIOVANNI, F.; CALAFIORI, R. New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. *Tissue Engineering: Part A*, v. 17, numbers: 21-22, p. 2651-2660, 2011.

NAALDIJK, Y.; STAUDE, M.; FEDOROVA, V.; STOLZING, A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnology*, v.12, n.49, p.1-10, 2012.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY; A.V., Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2008. ISSN 0103-8478.

NAZAROV, I.; LEE, J.W.; SOUPENE, E.; ETEMAD, S.; KANAPIK, D.; GREEN, W.; BASHKIROVA, E.; FANG, X.; MATIHAY, M.A.; KUYPERS, F.A.; SERIKOV, V.B. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Translationalmedicine*, v. 1, p. 359-372, 2012. - www.StemCellsTM.com

NEPAUNE, M.; CHANG, C-C.; KIUPEL, M.; YUZBASIIYAN-GURKAN, V., Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering*, v.14, n.6, p.1007-1015, 2008.

PARK, S-B.; SEO, M-S.; KIM, H-S.; KANG, K-S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. PLoS ONE, v. 7, n. 9, p. 9, 2012. - doi:10.1371/journal.pone.0044693.

PASQUINELLI G.; TAZZARI P.; RICCI F.; VASELLI C.; BUZZI M.; CONTE R.; ORRICO C.; FORONI L.; STELLA A.; ALVIANO F.; BAGNARA G. P.; LUCARELLIE. Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta. Ultrastructural Pathology, v.31, p.23-31, 2007.

PENG, R.; YAO, X.; CAO, B.; TANG, J.; DING, J. The effect of culture conditions on the adipogenic and osteogenic inductions of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. Biomaterials, p. 1-12, 2012 - doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.010

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v.284, p. 143-147,1999.

POLCHOW, B.; KEBBEL, K.; SCHMIEDEKNECHT, G.; REICHARDT, A.; HENRICH, W.; HETZER, R.; LUEDERS, C. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. Journal of Translational Medicine, v. 10, n. 98, p. 17, 2012.

PRATHEESH M. D.; GADE N. E.; KATYIAR A. N.; DUBEY P. K.; SHARMA B. Isolation, culture and characterization of caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid. Research in Veterinary Science, 2012 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.08.002>.

PURANIK S. B.; NAGESH A.; GUTTEDAR R. S. Isolation of mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, v.2, n.3, p. 218-224, 2012.

PUSSE, W. A.; PUSSE, F. D., Células tronco: o alfa e o ômega. Arquivo do Conselho Regional de Medicina do Paraná, v.22, n.86, p.58-75, 2005.

RENZI, S.; LOMBARDO, T.; DOTTE, S.; DESSI, S.S.; DE BLASIO, P.; FERRARI, M. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. Biopreservation and Biobanking, v. 10, n. 3, p. 276-281, 2012 - doi: 10.1089/bio.2012.0005

REQUICHA, J.F.; VIEGAS, C.A.; ALBUQUERQUE, C.M.; AZEVEDO, J.M.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. Stem Cell Reviews and Reports, v. 8, n.4, p. 1211-1222, 2012.

ROCCA, G. L.; ANZALONE, R.; CORRAO, S.; MAGNO, F.; LORIA, T.; IACONO, M.L.; STEFANO, A. D.; GIANNUZZI, P.; MARASÀ, L.; CAPELLO, F.; ZUMMO, G.; FARINA, F., Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. Histochemical Cell Biology, n.131, p.267-282, 2009.

RUTIGLIANO, L.; CORRADETTI, B.; VALENTINI, L.; BIZZARO, D.; MEUCCI, A.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. Stem Cell Research & Therapy , v. 4, p. 133, 2013.

SALEHINEJAD P.; ALITHEEN N. B.; ALI A. M.; OMAR A. R.; MOHIT M.; JANZAMIN E.; SAMANI F. S.; TORSHIZI Z.; NEMOTOLLAHI-MAHANI S. N. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, v.48, p.75-83, 2012.

SEO M-S; PARK S-B.; KANG K-S. Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. Cell Transplantation, v.21, p.1493-1502, 2012.

SINGH J.; MANN A.; KUMAR D.; DUHAN J.S.; YADAV P. S. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, v.49, p.408-416, 2013.

SOARES M.B.P.; SANTOS R.R. Terapia com células-tronco: a medicina do futuro. *Revista Parcerias estratégicas – Edição Especial*, n.16, 2002.

TAGHIZADEH, R.R.; CETRULO, K.J.; CETRULO, C.L. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, v.32, p. 311-315, 2011.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126 , n. 4, p. 663–676, 2006.

TANG, H.; WU, B.; QIN, X.; ZHANG, L.; KRETLOW, J.; XU, Z. Tissue engineering rib with the incorporation of biodegradable polymer cage and BMSCs/ decalcified bone: an experimental study in a canine model. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, v. 8, n. 133, p. 9, 2013.

TEVA, A.; FERNANDES, J.C.C.; SILVA, V.L. *Imunologia – Capítulo 1. In: Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde*, v. 4, p. 19-124, 2010.

TODOROV, P.; HRISTOVA, E.; KONAKCHIEVA, R.; MICHOVA, A.; DIMITROV, J. Comparative studies of different cryopreservation methods for mesenchymal stem cells derived from human fetal liver. *Cell Biology International*, v. 34, n. 5, p. 455-462, 2010. - doi:10.1042/CBI20090127

TSAI, M-S.; LEE, J-L.; CHANG, Y-J.; HWANG, S-M., Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, v.19, n.6, p.1450-1456, 2004.

TYNDALL A., WALKER U.A., COPE A., DAZZI F., DE B.C., FIBBE W. et al., Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005, *Arthritis Research & Therapy*, v. 9, p. 301. 2007.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L., LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E., Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction & Development*, n.78, p.361-373, 2011.

VÄÄNÄNEN, H. K., Mesenchymal Stem cells. *Annals of medicine*, n.37, p.469-479, 2005.

WAN C-D.; CHENG R.; WANG H-B.; LIU T. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreat Disease International*, v.7, n.1, 2008.

WANG, H-S.; HUNG, S-C.; PENG, S-T.; HUANG, C-C.; WEI, H-M.; GUO, Y-J.; FU, Y-S.; LAI, M-C.; CHEN, C-C., Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, n.22, p.1330-1337, 2004.

WENCESLAU C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO C. E.; LIZIER N. F.; PIGNATARI G. C.; KERKIS I. Mesenchymal Progenitor Cells from Canine Fetal Tissues: Yolk Sac, Liver, and Bone Marrow. *Tissue Engineering: Part A*, v.17, n.17-18, 2011- doi: 10.1089/ten.tea.2010.0678.

WOLBANK, S.; PETERBAUER, A.; FAHRNER, M.; HENNERBICHLER, S.; GRIENSVEN, M. V.; STADLER, G.; REDL, H.; GABRIEL, C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Engineering*, v.13, n.6, 2007.

WOODING, P.; BURTON, G. Placentations Fundamentals - Chapter 1. In: Comparative Placentations, Functions and Evolution. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, p. 1-45, 2008.

WU, X.; GOODYEAR, S.M.; ABRAMOWITZ, L.K.; BARTOLOMEI, M.S.; TOBIAS, J.W.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human Reproduction*, v. 27, n. 5, p. 1249–1259, 2012 - doi:10.1093/humrep/des077

XU, X.; LIU, Y.; CUI, Z.; WEI, Y.; ZHANG, L. Effects of osmotic and cold shock on adherent human mesenchymal stem cells during cryopreservation. *Journal of Biotechnology*. v. 162, p. 224– 231, 2012.

YANG, X-F; HE, X.; HE, J.; ZHANG, L-H.; SU, X-J.; DONG, Z-Y.; XU, Y-J.; LI, Y.; LI, Y-L. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*, v. 18, n. 59, p. 9, 2011.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K., Células tronco derivadas de tecido adipose humano: desafios atuais e perspectivas. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

YUAN, W.; ZONG, C.; HUANG, Y.; GAO, Y.; SHI, D.; CHEN, C.; LIU, L.; WANG., J. Biological, immunological and regenerative characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cell isolated using a time-gradient attachment method. *Stem Cell Research*, v.9, p. 110-123, 2012.

YUAN, H.; ZHUANG, Y.; XIONG, J.; ZHI, W.; LIU, L.; WEI, Q.; HAN, P. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model. *PLoS ONE*, v. 8, n.11, 2013 - doi:10.1371/journal.pone.0080959.

YOON J. H.; ROH E. Y.; SHIN S.; JUNG N. H.; SONG E. Y.; CHANG J. Y.; KIM B. J.; JEON H. W. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's Jelly, 2013 - <http://dx.doi.org/10.1155/2013/428726>.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T., Células-tronco, a nova fronteira da medicina. Editora Atheneu, São Paulo, 2006.

ZEIGLER B. M.; SUGIYAMA D.; CHEN M.; GUO Y.; DOWNS K. M.; SPECK N. A. The allantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-allantoic fusion, have hematopoietic potential. *Development*, v.133, p.4183-4192, 2006 - doi:10.1242/dev.02596.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO, D. F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C. E.; PASSOS-BUENO, M. R.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M., Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein- A novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, v.19, n.3, p.395-402, 2010.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H., Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZUK, P. A.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H., Stem cell from adipose tissue. In: *Handbooks of Stem Cells*, v. 2, U.S.A: Elsevier Inc, p. 425-447, 2004.

Trabalho a ser enviado para a revista Stem Cell Research.

Study of the potential for formation of cell bank using canine mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and Wharton's Jelly

Isadora Arruda^{a*}, Amanda Jeronimo Listoni^b, Leandro Maia^a, Camila Macedo Chavier^c, Mariana Sartori Magnoni^d, Marjorie Assis Golim^d, Maurício Furlan Martins^e, Carolina Nogueira de Moraes^a, Fernanda da Cruz Landim^a

^a São Paulo State University (UNESP), Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, District of Rubião Júnior, n/n. Botucatu, São Paulo, Brazil

^b São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences of Botucatu, District of Rubião Júnior, n/n. Botucatu, São Paulo, Brazil

^c Federal University of São Paulo (UNIFESP),

^d São Paulo State University (UNESP), Faculty of Medicine of Botucatu, District of Rubião Júnior, n/n. Botucatu, São Paulo, Brazil

^e São Paulo University (USP), Faculty of Animal Science and Food Engineering, Pirassununga, São Paulo, Brazil

*Corresponding Author: São Paulo State University (UNESP), Department of Animal Reproduction and Radiology, Laboratory of Advanced Reproduction and Cell Therapy, District of Rubião Júnior, n/n. Botucatu, São Paulo, Brazil.

Tel/Fax: +55 14 3880 2119

E-mail adress: isadora.arruda@gmail.com (I. Arruda)

Abstract

In order to form a bank of stem cells, cells derived from the amniotic membrane (AM) and Wharton's Jelly (WJ) of dogs, obtained at the time of cesarean section were evaluated before (BF) and after cryopreservation (AF). In two moments the cells were subjected to characterization and demonstrated similar behaviors to mesenchymal stem cells (MSCs). The samples of AM and WJ showed viability above 90% in both M1 and M2. Samples maintained CD44 expression at satisfactory levels, the AM expressed on average 85,6% in BF and 67,8% in AF and WJ expressed in 86,0% in BF and 82,1% in AF. The absence of CD34 expression was observed in both moments, and the immunomodulatory characteristic was evidenced by the no expression of MHCII, 0,90% and 1,76% of expression for amniotic membrane and Wharton's Jelly respectively, in M1, and numerically even lower in M2, 0,54% for amniotic membrane and 1,29% Wharton's Jelly. Differentiation was observed in osteogenic and adipogenic lineages at both times. However, the negative controls showed spontaneous differentiation, in both lineages and moments. We conclude that the cells after 4 weeks of cryopreservation, maintains the characteristics of MSCs, reasserting the characteristic of immunoantigenicity however extensive studies related to the spontaneous differentiation are necessary.

Key words: Mesenchymal stem cells, extraembryonic membrane, umbilical cord, cryopreservation, dog.

1 Introduction

Basic properties that allow the isolation and cultivation of MSCs are: ease of adhesion on plastic or glass surfaces and the ability to differentiate in vitro and in vivo

into osteoblasts, adipocytes, chondroblasts and myoblasts. This feature is identified as plasticity (Baksh et al., 2004; Zago&Covas, 2006).

Morphologically these cells are fusiform and at the beginning of their growth in vitro exhibit the formation of Colony-Forming Units (CFU) (Friendenstein et al., 1970).

The International Society for Cell Therapy (ISCT) listed some surface markers that aid in the characterization of this cell type. This way, they must express CD105, CD73 e CD90 and don't express CD45, CD34, CD14 or CD11, CD79 α or CD19 e HLA-DR. These markers have been established for human cells, however are correlated to animals cells. Such characteristics have been adopted as the minimum criteria for the characterization of MSCs, which allows a more rapid advancement in the use of these cells in preclinical studies and consequently, therapeutic applications (Dominici, 2006).

In 2006, Miao et al. indicated the placenta as a rich and attractive source of MSCs when compared with bone marrow and Pasquinelli et al. (2007), based on the same comparison, showed that there are structural differences, however, phenotypically similar being this another possible source of HSCs and MSCs.

Amniotic membrane (AM) is a clear or whitish membrane, composed of simple stratified epithelium, avascular (Morini et al., 2008) and thin, forming a cavity that surrounds the embryo and its main function is the protection of the same (McGeadyet al., 2006).

Besides the ease of obtaining and isolation, it is known that the AM cells are able to differentiate into several cell lineages (Ilancheran et al., 2007; Manuelpillai et al., 2011), and still express octamer-4 (Oct-4) in dogs and cats (Uranio et al., 2011; Rutigliano et al., 2013) which is a transcription factor and is closely associated with the "undifferentiated" state of stem cells (Zago&Covas, 2006).

Furthermore, Miki and their collaborators (2007) demonstrated that AM shows heterogeneous to pluripotency antibodies tested, suggesting that it presents cells at different stages of cell differentiation for these reasons that become so attractive for cell therapy.

Umbilical cord is composed by two arteries and two veins, surrounded by extravascular matrix, also called Warton's Jelly (WJ) which is composed of connective tissue (McGeady et al. 2006). The MSCs from umbilical cord can be isolated from blood, blood vessels and WJ. However, studies related to these sources are recent and scarce, although the results are optimistic.

Carlin and collaborators (2006) isolated and characterized by the first time MSCs from WJ in domestic animals, the experimental model used was the pig. However, the authors did not differentiate, concluding that the matrix had unique and primitive cells with undefined potential, a great attraction for research. Subsequently, Uranio et al. (2011) demonstrated that, in dogs, it is possible the isolation, cultivation and in vitro differentiation of MSCs from fetal membranes (WJ, amniotic fluid, and amniotic membrane).

MSCs from WJ are also considered "immune-privileged" because they present immunosuppressive feature and still have a potential of pluripotent and multipotent differentiation, being an important source for cell therapy in the near future (Taghizadeh et al., 2011).

Cell therapy with MSCs is a promising alternative because the differentiation of these cells into mesodermal and not mesodermal tissues enhances the possibility of clinical use, both in humans and in animals (Monteiro et al., 2010). The MSCs are also capable of producing large quantities of hormonal factors, acting as potent paracrine

modulators and still do not induce the formation of tumors in immunocompromised individuals (Nazarov et al., 2012).

Lee et al. (2012) suggested that the placenta has advantages in relation to other sources of MSCs, as the immunomodulatory effect. So the perspectives for the use of these cells for therapeutic purposes are enormous. Studies are underway, primarily in the treatment of diabetes, Parkinson's and heart disease, but without concrete results (Monti et al., 2012).

This immunological behavior increases the perspectives for the use of cellular banks, however, should be considered with caution, since the immunomodulatory mechanisms of these cells are not fully elucidated (Monteiro et al., 2010).

Our objective was to search for a greater knowledge about the behavior of mesenchymal stem cells obtained from the amniotic membrane and Wharton's Jelly of canine neonates obtained from cesarean sections before and after cryopreservation, aiming at the future the formation of banks of stem cells.

2 Material and Methods

2.1 Preparation of AM and WJ samples

The samples were obtained from dogs undergoing cesarean sections (approximately 60 days gestation) performed in the operating center of the Department of Reproduction and Veterinary Radiology FMVZ / UNESP - Botucatu, where they were properly anesthetized, and his collection was approved by the Ethics Committee on the Use Animal (ECUA) from the School of Veterinary Medicine and Animal Science from Botucatu, under protocol n°90/2012- ECUA according to the ethical principles in animal experimentation.

In the operating center the uterus was incised carefully, thus having access to the neonate, the chorionic membrane was removed and the umbilical cord clamped and collected a portion (n = 8), and then it was collected fragments of amniotic membrane (n = 8). Both were placed in a buffer solution containing antibiotic and antimycotic, samples were transferred to the laboratory and immediately processed.

2.2 Isolation of MSCs from AM and WJ

The fragments of AM and WJ were washed in *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS - Gibco®), fractionated (mechanical digestion), with the aid of tweezers and a scalpel and placed in a solution 0,04% (AM) and 0,02% (WJ) of collagenase (Sigma) at a temperature of 37,5°C in bath maria for about 40 minutes.

The cell suspension was centrifuged at 500 g for 10 minutes forming a pellet, which was resuspended in culture medium *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose* (DMEM – low glucose - Gibco®) with 20% Fetal Bovine Serum (FBS - Gibco®) supplemented with antibiotics (1% penicillin and streptomycin solution - Gibco®) and antimycotic (1,2% amphotericin solution - Gibco®) and centrifuged again at 500 g for 10 minutes to complete removal of collagenase solution. The cell pellet was resuspended in 5 ml of the aforementioned medium, placed in 25cm² bottles (T25) and cultured in incubator with 5% CO₂ in air at a temperature of 37,5 ° C. The medium was changed after 48 hours, followed by twice weekly exchange.

When the cells reached 80% confluence, they were trypsinized (0,05% Trypsin-EDTA - Gibco®) and centrifuged at 500 g for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was removed and the cells washed with culture medium. At this moment the cell number was estimated with the help of a Neubauer chamber, and a dye exclusion (Trypan Blue - Gibco®).

2.3 MSCs cryopreservation

After trypsinization, at first passage, cells were counted to estimate the concentration and cell viability then separated into cryotubes containing a concentration of approximately 5×10^5 cells/cryotube with 1,5 ml of cryoprotector medium composed of 90% FBS (Gibco ®) and 10% dimethylsulphoxide (Me2SO-Sigma). The cryotubes were placed in Nalgene™, and maintained for 24 hours at -80°C at Ultra Freezer (Thermo Scientific - Form 8800 Series), gradually cooling the cell to approximately 1°C per minute. Then, the cryotubes were transferred into liquid nitrogen (-196°C).

2.4 Cellular culture after freezing (AF)

The samples were reconstituted after 4 weeks using the protocol previously described by Chaytor et al. (2012), to improve the viability. After, it was done the viability test with Trypan Blue. At the end of secondary culture it was performed characterization by flow cytometry and at the moment of the third passage osteogenic and adipogenic differentiation.

2.5 Flow Cytometry

Phenotypic characterization of MSCs was performed at the second passage before (BF) and after cryopreservation (AF). For this, it was used the cell labeling with canines surface antibodies CD 44 (RatantiDog: AlexaFluor ® 488 - MCA1041A488 - AbDSerotec), CD34 and MHC class II (RatantiDog: FITC - MCA1044F - AbDSerotec) by flow cytometry, using the standard protocol suggested by the manufacturer of each antibody using a minimum of 10,000 cells. The samples were analyzed on FACSCalibur BD® flow cytometer.

2.6 Immunocytochemistry

Analysis was performed with the primary antibody anti-vimentin (mesenchymal lineage) by immunocytochemistry, which was detected by incubation in HIDEfDetection™ System HRP Polymer system (Cell Marque, Rocklinn, CA; USA, 954D-31) labeled with peroxidase, and revealed with diaminobenzidine (Liquid DAB, DakoCytomation, K3468) and counter-stained with hematoxylin of Harris, the negative control was performed by omitting the primary antibody. This analysis was specifically performed only after cryopreservation.

2.7 Differentiation potential of MSCs into mesenchymal lineages

For differentiation into osteogenic cells at the time of the third passage (BF and AF) with osteogenic differentiation medium (Osteogenic Differentiation Kit - *Stem Pro* - Gibco®) at least two wells were maintained with maintenance medium which was named Negative control (NC). The adipogenic lineage, was also taken in the third pass, with adipogenic differentiation medium, Adipogenic differentiation Kit - *Stem Pro* (Life), keeping two wells with maintenance medium (NC).

3 Statistical Analyses

The data of flow cytometry and time of differentiation were analyzed by Statistical Analysis System program (Version 9.2, 2010) using the MIXED procedure, being previously verified the normality of the residuals using the Shapiro-Wilk test and homogeneity of variances compared by the Hartley test. These data were transformed in inversion and then subjected to analysis of variance, which included as causes of variation the effect of treatments (cryopreserved or not) with 5% probability.

4 Results

Cultured cells showed fibroblastoid shape both before and after cryopreservation (Fig. 1A - 1B - 1C - 1D). Cell viability was evaluated at the time the cells were cryopreserved and AM had 97% viability and WJ had 98.8%. After heating it was found values of 94, 6% for AM and 93, 5% for WJ, demonstrating excellent viability after cryopreservation period.

At each passage when obtained a confluence of 80% it was estimated the amount of cells /bottles (T25), of this count it was observed that the cells of amniotic membrane, have a differentiated behavior. Prior to cryopreservation they show a decrease in their growth, ie, the number of cells decreases with each passage. However, after cryopreservation, there is an increase in cell concentration.

Regarding WJ cells, both before and after cryopreservation they present decrease in its concentration. But before cryopreservation the drop was pronounced, indicating greater cell death.

The ability osteogenic differentiation of AM was observed in all (100%) samples before (Fig.1E) and after cryopreservation (Fig.1F), negative controls before cryopreservation of 3 samples (37,5%) showed spontaneous differentiation (Fig.1I), and after the same 3 samples (37,5%) spontaneously differentiated (Fig.1J). The adipogenic differentiation was also positive in all samples (100%) both before (Fig.1M) and after the cryopreservation (Fig.1N). In this case, all negative controls (100%) also showed spontaneous differentiation (Fig.1Q. - 1R) both before and after cryopreservation. It was observed that cryopreservation did not affect ($P>0.05$), the time of adipogenic and osteogenic differentiation of AM (Table 1).

For WJ the osteogenic differentiation was observed in 92% of samples undergoing differentiation before cryopreservation (Fig.1G) and 100% of the samples

after cryopreservation (Fig.1H). In the negative controls spontaneous differentiation was observed in 37.5% before cryopreservation (Fig.1K), and in 62.5% after cryopreservation (Fig.1L), and the same sample that differ before cryopreservation also differentiate spontaneously after. The adipogenic differentiation was positive in 92% of samples submitted to differentiation prior to cryopreservation (Fig.1O) and in 100% of the samples after cryopreservation (Fig.1P). Spontaneous differentiation was observed in 100% of samples (Fig.1S-1T). Considering, WJ was observed that the cryopreservation did not affect ($P > 0.05$) the time of osteogenic differentiation (Table 2). However, adipogenic differentiation was influenced ($P < 0.05$) by cryopreservation, observing an increase in time to differentiation after cryopreservation (Table 2).

It was not observed influence of cryopreservation on the expression of markers used for both AM (Table 3) and WJ (Table 4). The expression of CD44 remained present and high (Fig. 2A-2B-2C-2D), and the expression of CD34 (Fig.2E-2F-2G-2H) and MHC- II remained negative (Fig.2I-2J-2K-2L). Immunocytochemical evaluation was performed at M2 in P2 and was positive for anti-vimentin, confirming the mesenchymal lineage (Fig. 3A-3C) and its (Fig.3b-3D) negative controls.

5 Discussion

For the success of cell therapy is necessary the use of safe protocols where the cells can be kept viable for long periods. Using cells from amniotic fluid Janzet al. (2012), demonstrated that the use of glycerol and DMSO as cryoprotectant maintains cell viability, beyond the characteristics of proliferation and expression of specific markers after cryopreservation for 6 months. The method of cryopreservation is also important for cell viability. Thus, in this experiment the cells were slowly cryopreserved

using "Mr. Frosty" (Nalgene™-Term) also used by other authors (Wolbank et al., 2007; Chaytor et al., 2012; Polchow et al., 2012), with great results.

It was observed that cell viability was higher than 90% both before and after cryopreservation in both tissues studied confirming previous results described in the literature (Lee et al., 2005; Ginis et al., 2012). Furthermore it was not observed influence of cryopreservation on the expression of markers used for both AM and WJ with high expression of CD44 and low expression of CD34 and MHC II. These results agree with those obtained by Janz et al. (2012), by Liu et al. (2011) that froze MSCs from human umbilical cord verifying its positive potential for differentiation and with Angelo et al. (2012) that furthermore demonstrated that cryopreservation did not alter the karyotype of the MSCs obtained from amniotic fluid.

Cells from AM and WJ are known to have change for format fibroblastoid faster compared to bone marrow (Csaki et al., 2008). Likewise, it has already been described that after cryopreservation MSCs derived from umbilical cord blood have acquired fibroblastoid format more quickly (Lee et al., 2005).

In the present study a decreased amount cells in each passage was observed. This was contacted both for the cells of AM and WJ before cryopreservation. However, after cryopreservation cells obtained from AM began to show an increase in cell concentration. These results disagree with those obtained Balci&Can(2013) in a study with human umbilical cord tissue. The authors observed that until the third passage, before and after cryopreservation the number of cells remained constant, and the tendency during consecutive passages was the increase in number. It is noteworthy that three passages may not be sufficient to verify the real tendency of these cells, since most studies use more than six passes (Corradetti et al., 2013, Lee et al., 2013, Rutigliano et al., 2013, Yoon et al., 2013, Gao et al., 2014) to evaluate the cell growth curve.

Among the fundamental characteristics that confirm the identity of the MSCs are plastic adherence, fibroblastoid morphology, the presence of specific markers expressed on the cell membrane and differentiate into mesenchymal tissue lineage (Dominici, 2006). The cells evaluated in this experiment showed a more rapid differentiation (Tables 1 and 2) compared to that described by Requicha et al. (2012) for canine adipose tissue, where it took 35 days for differentiation to occur.

Another interesting characteristic demonstrated by Mauro et al. (2010) is that the differentiation of the cells of the amniotic membrane is more uniform compared to the adipose tissue, which occurs partially. This characteristic is maintained along the passages, representing an advantage for the use of these cells for cell therapy.

In this experiment, the differentiation potential was maintained after cryopreservation independent of cell line. This finding corroborates with the findings of other authors in cells from umbilical cord blood (Lee et al., 2004), amniotic fluid (Janz et al., 2012), in amniotic membrane (Corradetti et al., 2013) and Wharton's Jelly (Giuseppe et al., 2014).

Despite this, an interesting characteristic observed in this study was the self-differentiation from negative controls. This fact occurred less frequently for osteogenic differentiation and in all samples for adipogenic differentiation independent of the cell source (AM and WJ). Something similar was observed by Polchow et al. (2012), at the culture of cells derived from human umbilical cord arteries, where it was observed vacuoles stained with oil red O, in two samples. However, the authors did not associate this finding with the differentiation potential of cells. Moreover, the authors did not negative control of all six samples used in the experiment, being this control carried out only in two.

In this experiment the concentration of FBS in the culture medium was 20% and may have influenced at the spontaneous differentiation, since the means of differentiation (adipogenic and osteogenic) present in its formulation FBS. The concentration and origin of serum may have influence on the differentiation potential of stem cells. Diascro et al. (1998) showed the differentiation of cells of osteogenic lineage into adipocytes, using inactivated rabbit serum, and assigned to the fatty acids the principal function in this process, since they suppress the expression of alkaline phosphatase and the cells begin to display characteristics of adipogenic cell groups.

It is noteworthy that most of analyzed papers do not evaluate the spontaneous differentiation of cultured negative controls with 10% (Csaki et al., 2008; Rocca et al., 2009; Naaldjik et al., 2012; Park et al., 2012; Rutigliano et al., 2013) or with 20% serum (FCS or FBS) (Marcus et al., 2008; Mauro et al., 2010; Gao et al., 2014).

Besides the concentration and type of serum, another important factor observed by Peng et al. (2012) is that the density and the contact between cells positively influence the osteogenic and adipogenic differentiation, ie, the higher the density and the contact between the cells, the greater the potential for differentiation. In our experiment we do not know if the density and the contact between cells could influence the differentiation of the negative controls, but these were grown to a confluence of nearly 100%.

In immunophenotypic analysis the cells of amniotic membrane and Wharton's Jelly labeled with CD44 were considerate positive before and after cryopreservation. However the use of a second positive marker for MSCs (CD90 or CD105, for example), would be required to confirm the mesenchymal origin of cells studied.

Considering the negative markers, CD34 and MHC II, Dominici et al. (2006) suggest that marking to be considered negative must be $\leq 2\%$. In this experiment at the

two moments the samples presented percentages above $\leq 2\%$, but very close to this value. Additionally the classification for negativity or positivity for the markers varies between 2-3% according to the author (Dominici et al., 2006; Seo et al., 2012, Yuan et al., 2013).

With regard to the CD34, results similar to ours was observed by Seo et al. (2012) where cells of canine WJ presented staining near from positive to CD34 (2,62%). However, in the present study there was no cryopreservation of samples. Likewise Miao et al. (2006) demonstrated in placenta-derived samples, positive staining of CD34 in 4,6% of cells, while on MO this index was of 1,8%.

In the present experiment the expression of MHC II was considered negative both before and after cryopreservation. This fact was also observed by Todorov et al. (2010) and Giuseppe et al. (2014) that showed that MHC II expression after cryopreservation between 1,0 and 1,6%. Is known that MHC type II is expressed only in membranes of professional antigen presenting cells (APCs), including dendritic cells, macrophages and B lymphocytes (Teva et al., 2010) and the no expression in MSCs assigns to them an immunomodulatory effect.

6 Conclusion

The cells of amniotic membrane and Wharton's Jelly showed characteristics of MSCs, which remained after 4 weeks cryopreservation. However, it is necessary a depth study related to spontaneous differentiation, and what is its effect on future clinical applications.

7 References

ÂNGELO P. C.; FERREIRA A. C. S.; FONSECA V. D.; FRADE S. P.; FERREIRA C. S.; MALTA F. S. V.; PEREIRA A. K.; LEITE H. V.; BRUM A. P.; PARDINI V. C.; GOMES K. B.; CABRAL A. C. V., Cryopreservation does not alter karyotype, multipotency, or NANOG/SOX2 gene expression of amniotic fluid mesenchymal stem cells. *Genetics and Molecular Research*, v.11, n.2, p.1002-1012, 2012. <http://www.geneticsmr.com/articles/1590>

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S., Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal Cellular and Molecular Medicine*, v.8, n.3, p.301-316, 2004. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x/pdf>

BALCI, D.; CAN, A. The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, n.1, p. 60-72, 2013. <http://www.eurekaselect.com/107098/article>

CARLIN R.; DAVIS D.; WEISS M.; SCHULTZ B.; TROYER D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.4, n.8, 2006 - doi:10.1186/1477-7827-4-8. <http://www.rbej.com/content/4/1/8>

CHAYTOR J. L.; TOKAREW J. M.; KWU L.; LECLERE M.; TAM R. Y.; CAPICCIOTTI C. J.; GUOLLA L.; MOO E. V.; FINDLAY C. S.; ALLAN S. A.; BEN R. N., Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*, v.22, n.1, p.123-133, 2012. <http://glycob.oxfordjournals.org/content/22/1/123.long>

CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARRO, D.; CREMONESI, F.; CONSIGLIO, A.L. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. *Society for*

Reproduction and Fertility, p. 1741–7899, 2013 - Online version via www.reproduction-online.org - doi:10.1530/REP-12-0437.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. N Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. Histochemical Cell Biology, v. 2007, n. 128, p. 507–520, 2007. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00418-007-0337-z>

DIASCRO, D. D. JR., VOGEL, R. L., JOHNSON, T. E.; WITHERUP, K. M.; PITZENBERGER, S. M.; RUTLEDGE, S. J.; PRESCOTT, D. J.; RODAN, G. A.; SCHMIDT, A. High Fatty Acid Content in Rabbit Serum Is Responsible for the Differentiation of Osteoblasts Into Adipocyte-like Cells. Journal of Bone And Mineral Research, v.13, n.1, 1998. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1359/jbmr.1998.13.1.96/abstract>

DOMINICI M.; LE BLANC K.; MUELLER I.; SLAPER-CORTENBACH I.; MARINI F.C.; KRAUSE D.S.; DEANS R.J.; KEATINGS A.; PROCKOP D.J.; HORWITZ E.M. Position Paper: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, v.8, n.4, p.315-317, 2006. <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1080/14653240600855905> - Doi: 10.1080/14653240600855905.

FRIENDENSTEIN A. J.; CHAILAKHJAN R. K.; LALYKINA K. S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell And Tissue Kinetics., v.3, p.393-403, 1970. http://eniac.fmrp.usp.br:8080/servlet/SBReadResourceServlet?rid=1127834658031_214859170_4361

GAO, Y.; ZHU, Z.; ZHAO, Y.; HUA, J.; MA, Y.; GUAN, W. Multilineage potential research of bovine amniotic fluid mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Science*, v. 15, p. 3698-3710, 2014 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975362/pdf/ijms-15-03698.pdf> -

Doi:10.3390/ijms15033698.

GINIS, I.; GRINBLAT, B.; SHIRVAN, M.H. Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Engineering: Part C*, v. 18, n. 6, p. 453 a 463, 2012 - <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/ten.tec.2011.0395> - Doi:

10.1089/ten.tec.2011.0395.

GIUSEPPE, F. D.; PIERDOMENICO, L.; ELEUTERIO, E.; SULPIZIO, M.; LANUTI, P.; RIVIELLO, A.; BOLOGNA, G.; GESI, M.; DI ILIO, C.; MISCIA, S.; MARCHISIO, M.; ANGELUCCI, S. Cryopreservation effects on Wharton's jelly stem cells proteome. *Stem Cell Reviews and Reports*. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12015-014-9501-8> - Doi 10.1007/s12015-

014-9501-8.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E.M.; PERA, M.; MANUELPILLAI, U. Stem Cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potencial. *Biology of reproduction*, v. 77, p. 577-588, 2007.

<http://www.bioreprod.org/content/77/3/577.full.pdf+html> - Doi:

10.1095/bioreprod.106.055244.

JANZ, F.L.; DEBES, A.A.; CAVAGLIERI, R.C.; DUARTE, S.A.; ROMÃO, C.M.; MOR, A.F.; ZUGAIB, M.; BYDLOWSKY, S.P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation.

Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.2012, p. 10, 2012.

<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/649353/> - Doi:10.1155/2012/649353.

LEE M. W.; CHOI J.; YANG M. S.; MOON Y. J.; PARK J. S.; KIM H. C.; KIM Y. J.

Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.320, p.273-278, 2004.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X04008745> - Doi: 10.1016/j.bbrc.2004.04.206.

LEE M. W.; YANG M. S.; PARK J. S.; KIM H. C.; KIM Y. J.; CHOI J. Isolation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. International Journal of Hematology, v.81, p.126-130, 2005.

<http://link.springer.com/article/10.1532%2FIJH97.A10404> - Doi: 10.1532/IJH97.A10404.

LEE, J.M.; JUNG, J.; LEE, H-J.; JEONG, S.J.; CHO, K.J.; HWANG, S-G.; KIM, G.J.

Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. International Immunopharmacology, v. 13, p. 219–224, 2012 .

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576912000975#> - doi:10.1016/j.intimp.2012.03.024

LEE K. S.; NAH J.-J; LEE B.-C; LEE H.-S; SO B.-J; CHA S.-H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. Research in Veterinary Science, v.94, p.144-15, 2013.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003452881200241X> - Doi: 10.1016/j.rvsc.2012.07.033.

LIU S.; HOUK.D.; YUAN M.; PENG J.; ZANG LI; SUI X.; ZHAO B.; XU W.; WANG A.; LU S.; GUO Q. Characteristics of mesenchymal stem cells derived from

Wharton's jelly of human umbilical cord and for fabrication of non-scaffold tissue-engineered cartilage. *Journal of Bioscience Bioengineering*, 2013. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172313002636> - [Doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.07.001](#).

MANUELPILLAI, U.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C.V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*, v. 32, p. 320-325, 2011. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400411001494> - [Doi: 10.1016/j.placenta.2011.04.010](#).

MARCUS, A.J.; COYNE, T.M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I.B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. *Differentiation*, v. 76, p. 130-144, 2008. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468109600591#> - [DOI: 10.1111/j.1432-0436.2007.00194.x](#).

MAURO, A.; TURRIANI, M.; IOANNONI, A.; RUSSO, V.; MARTELLI, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINOCCHI, N.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communication*, v. 34, suppl. 1, p. 25-28, 2010. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11259-010-9393-2> – [doi: 10.1007/s11259-010-9393-2](#).

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T., Foetal Membranes - Chapter 9. In: *Veterinary Embryology*. Blackwell Publishing Ltd. 1^a ed., 2006.

MIAO Z.; JIN J.; CHEN L.; ZHU J.; HUANG W.; ZHAO J.; QIAN H.; ZHANG X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human

bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v.30, p. 681-687, 2006. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1065699506000886> - Doi: 10.1016/j.cellbi.2006.03.009.

MIKI, T.; MITAMURA, K.; ROSS, M. A.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Short communication: Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 75, p. 91-96, 2007. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037807000678> - Doi: 10.1016/j.jri.2007.03.017.

MONTEIRO B.S.; NETO N. M. A.; DEL CARLO R. J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, v.40, n.1, 2010. <http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n1/a409cr1878.pdf> - ISSN 0103-8478.

MONTI M.; PEROTTI C.; FANTE C.D.; CERVIO M.; REDI C.A.; Stem Cells: sources and therapies. *Biology Research*, v.45, p.207-214, 2012. <http://www.scielo.cl/pdf/bres/v45n3/art02.pdf> - Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602012000300002>.

MORINI, A. C.; BARBOSA, P. L. G.; MELNIC, R.V.; JUNIOR, J. C. M.; FRANCIOLLI, A. L. R.; MARTINS, D. S.; PEREIRA, F. T. V.; FAVARON, P. O.; AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A., Caracterização de membranas fetais em búfalas no terço inicial da gestação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.28, n.9, p.437-445, 2008. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2008000900008&script=sci_arttext - Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000900008>.

NAALDIJK, Y.; STAUDE, M.; FEDOROVA, V.; STOLZING, A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnology*, v.12,

n.49, p.1-10, 2012. <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/49> - Doi: 10.1186/1472-6750-12-49.

NAZAROV, I.; LEE, J.W.; SOUPENE, E.; ETEMAD, S.; KANAPIK, D.; GREEN, W.; BASHKIROVA, E.; FANG, X.; MATIHAY, M.A.; KUYPERS, F.A.; SERIKOV, V.B. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. *Stem Cells Translationalmedicine*, v. 1, p. 359-372, 2012. <http://stemcellstm.alphamedpress.org/content/1/5/359.long> - Doi: 10.5966/sctm.2011-0021.

PARK, S-B.; SEO, M-S.; KIM, H-S.; KANG, K-S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. *PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. 9, 2012.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0044693> - Doi:10.1371/journal.pone.0044693.

PASQUINELLI G.; TAZZARI P.; RICCI F.; VASELLI C.; BUZZI M.; CONTE R.; ORRICO C.; FORONI L.; STELLA A.; ALVIANO F.; BAGNARA G. P.; LUCARELLIE. Ultrastructural Characteristics of Human Mesenchymal Stromal (Stem) Cells Derived from Bone Marrow and Term Placenta. *Ultrastructural Pathology*, v.31, p.23-31, 2007. <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/01913120601169477> - Doi: 10.1080/01913120601169477.

PENG, R.; YAO, X.; CAO, B.; TANG, J.; DING, J. The effect of culture conditions on the adipogenic and osteogenic inductions of mesenchymal stem cells on micropatterned surfaces. *Biomaterials*, p. 1-12, 2012. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961212005273> - Doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.010.

POLCHOW, B.; KEBBEL, K.; SCHMIEDEKNECHT, G.; REICHARDT, A.; HENRICH, W.; HETZER, R.; LUEDERS, C. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *Journal of Translational Medicine*, v. 10, n. 98, p. 17, 2012. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/98> - Doi:10.1186/1479-5876-10-98 - Acesso: 05/jun/2014.

REQUICHA, J.F.; VIEGAS, C.A.; ALBUQUERQUE, C.M.; AZEVEDO, J.M.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 8, n.4, p. 1211-1222, 2012. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12015-012-9397-0> – Doi: 10.1007/s12015-012-9397-0.

ROCCA, G. L.; ANZALONE, R.; CORRAO, S.; MAGNO, F.; LORIA, T.; IACONO, M.L.; STEFANO, A. D.; GIANNUZZI, P.; MARASÀ, L.; CAPELLO, F.; ZUMMO, G.; FARINA, F., Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochemical Cell Biology*, n.131, p.267-282, 2009. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00418-008-0519-3> – Doi: 10.1007/s00418-008-0519-3.

RUTIGLIANO, L.; CORRADETTI, B.; VALENTINI, L.; BIZZARO, D.; MEUCCI, A.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, p. 133, 2013. <http://stemcellres.com/content/4/5/133> - Doi: 10.1186/srct344.

SEO M-S; PARK S-B.; KANG K-S. Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, v.21, p.1493-1502, 2012.

<http://www.ingentaconnect.com/content/cog/ct/2012/00000021/00000007/art00013?token=00521cb4f625481f9949383a4b3b2570747b75246c38432c3a634c2a726e2d2954496f642f466fbd46> – Doi: <http://dx.doi.org/10.3727/096368912X647207>.

TAGHIZADEH, R.R.; CETRULO, K.J.; CETRULO, C.L. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, v.32, p. 311-315, 2011. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400411002189> - Doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010.

TEVA, A.; FERNANDES, J.C.C.; SILVA, V.L. Imunologia – Capítulo 1. In: *Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde*, v. 4, p. 19-124, 2010.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L., LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E., Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction & Development*, n.78, p.361-373, 2011. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.21311/abstract> - Doi: 10.1002/mrd.21311.

WOLBANK, S.; PETERBAUER, A.; FAHRNER, M.; HENNERBICHLER, S.; GRIENSVEN, M. V.; STADLER, G.; REDL, H.; GABRIEL, C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue Engineering*, v.13, n.6, 2007. <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.2006.0313> - Doi: 10.1089/ten.2006.0313.

YOON J. H.; ROH E. Y.; SHIN S.; JUNG N. H.; SONG E. Y.; CHANG J. Y.; KIM B. J.; JEON H. W. Comparison of explant-derived and enzymatic digestion-derived MSCs and the growth factors from Wharton's Jelly, BioMed Research International, 2013. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/428726/> - Doi:

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/428726>.

YUAN, H.; ZHUANG, Y.; XIONG, J.; ZHI, W.; LIU, L.; WEI, Q.; HAN, P. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model. PLoS ONE, v. 8, n.11, 2013.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0080959> -

Doi:10.1371/journal.pone.0080959.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T., Células-tronco, a nova fronteira da medicina. Editora Atheneu, São Paulo, 2006.