



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO INDUZIDO E
ESPONTÂNEO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ORIUNDAS DE TECIDO ADIPOSEO E MEDULA ÓSSEA DE
EQUINOS (*Equus caballus*)

ELAINE CRISTINA GALHARDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO INDUZIDO E ESPONTÂNEO
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ORIUNDAS DE
TECIDO ADIPOSEO E MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS
(*Equus caballus*)

ELAINE CRISTINA GALHARDO

ORIENTADORA: Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

CO-ORIENTADOR: Dr. Leandro Maia

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Galhardo, Elaine Cristina.

Potencial de diferenciação indusido e espontâneo de células tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo e medula óssea de equinos (*Equus caballus*) / Elaine Cristina Galhardo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Leandro Maia

Capes: 20601000

1. Terapia celular. 2. Morfologia. 3. Células-tronco. 4. Células da medula óssea. 5. Tecido adiposo.

Palavras-chave: Morfologia; Stem cells; Terapia Celular.

“Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

(Mário Quintana)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha amadíssima avó Malvina Maria da Conceição, que nos deixou há alguns dias. Dedico também à minha família, em especial ao meu pai, José Benedito Galhardo, à minha mãe, Teresinha Francisco Galhardo e irmã Érika, meus maiores apoiadores e incentivadores durante toda a vida. À minha amada avó paterna, Joaquina Guedes Galhardo (in memoriam), e ao meio tio Jair Galhardo, que me auxiliou a dar um importante passo na vida, e à todos os antepassados que construíram minha história.

Minha vitória é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente...

Eterna gratidão à minha orientadora, Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim, pela confiança em mim depositada, por todo apoio, disponibilidade e atenção;

A toda equipe do Laboratório LANÇA, em especial às colegas e amigas Carolina Serrano, Isadora Arruda, Bruna De Vita e ao co-orientador, Dr. Leandro Maia;

Ao Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, em especial aos técnicos Edvaldo, Felipe e Evandro, e ao secretário Edilson;

Ao Departamento de Clínica Veterinária, em especial à querida colega Danielle Jaqueta Barberini, por todo suporte prestado, e ao Prof. Dr. Rogério Amorim, por ceder os animais deste estudo;

À cara colega Josiane Lourenção e à Prof. Noeme Rocha do Departamento de Patologia Veterinária, pelo equipamento emprestado e disponibilidade em ajudar;

A equipe do Departamento de Genética do IBB, em especial à Prof. Dra. Lígia Mota e à Técnica Valquíria Santiloni, que tanta força me deram para o ingresso na Pós-Graduação e por todo apoio e parceria prestados ao longo do experimento;

À equipe do Departamento de Morfologia do IBB, em especial ao Prof. Dr. Robson Carvalho e ao doutorando Juarez Ferreira, parceiros fundamentais neste projeto;

Ao Prof. Dr. Rogério Oliveira do Departamento de Bioestatística do IBB, prestativo colaborador deste estudo;

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e ao Núcleo de Microscopia Eletrônica da ESALQ - USP, por possibilitarem as análises de microscopia;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, em especial à funcionária Claudete, pelo processamento das amostras para análise;

Aos membros constituintes das Bancas examinadoras de Defesa e Qualificação, Prof. Dr. Robson Carvalho, Prof. Dra. Fernanda Landim, Dra. Bruna De Vita, Prof. Dra. Flávia Delela e Prof. Dr. Rogério Amorim;

Ao IBB, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação, em especial aos funcionários da PG;

À FMVZ, por ceder as instalações e animais para realização do experimento;

À CAPES, pela bolsa concedida para o desenvolvimento do projeto;

Aos colegas, colaboradores e funcionários não mencionados e que colaboraram na pesquisa e me acompanharam durante o mestrado;

À minha família, sem a qual eu jamais teria a oportunidade de me dedicar aos estudos e conquistar o título de Mestre;

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
01. INTRODUÇÃO	14
02. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
02.1 Células-tronco Mesenquimais	15
02.2 Tecido adiposo como fonte de CTMs.....	17
02.3 Medula óssea como fonte de CTMs	17
02.4 Potencial de aplicação das CTMs em Medicina Veterinária	18
02.5 Diferenciação das CTMs	18
03. HIPÓTESES.....	21
04. OBJETIVOS GERAIS	22
04.1 Objetivos específicos	22
05. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
06. MATERIAIS E MÉTODOS	24
06.1 Animais	24
06.2 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO.....	24
06.3 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-TA.....	25
06.4 Contagem e plaqueamento das CTMs	25
06.5 Caracterização de CTMs-TA.....	26
06.5.1 Caracterização Imunofenotípica	26
06.5.2 Diferenciação condrogênica.....	26
06.5.3 Análise citogenética	26
06.6 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFCF).....	26
06.7 Indução à diferenciação	27
06.8 Diferenciação não induzida	27
06.9 Avaliação citológica	27
06.10 Análise de ultraestrutura	28
06.11 Avaliação de expressão gênica	28
06.11.1 Genes	28
06.11.2 Extração de RNA total	29
06.11.3 RT-qPCR	29
06.12 Análise estatística	30
07. RESULTADOS.....	30
07.1 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO.....	30
07.2 Coleta, isolamento e cultivo do CTMs-TA.....	30
07.3 Caracterização de CTMs-TA.....	31
07.3.1 Caracterização imunofenotípica.....	31
07.3.2 Diferenciação condrogênica.....	31
07.3.3 Análise citogenética.....	31
07.4 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas	32

07.5	Indução à diferenciação	33
07.6	Diferenciação não induzida	33
07.7	Análise de ultraestrutura	37
07.8	Avaliação de expressão gênica	34
08.	DISCUSSÃO	42
09.	CONCLUSÕES	45
10.	PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSO ORIGINADAS DESTE TRABALHO	46
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12.	ARTIGO CIENTÍFICO - Manuscrito	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo esquemático da diferenciação das CTMs.....	19
Figura 2 - Representação esquemática de fatores mecânicos e alterações morfológicas das CTMs.....	20
Figura 3 - Boxplot: Marcadores imunofenotípicos expressos em porcentagem.	31
Figura 4 - Análise cromossômica. Cromossomos em euploidia ($2n=64$) para <i>E. caballus</i>	32
Figura 5 - Variação de eficiência de UFCF dos grupos CTMs-MO e CTMs-TA em 10 e 20% SFB.....	32
Figura 6 - Diferenciação condrogênica	33
Figura 7 - Diferenciação adipogênica induzida e não induzida	34
Figura 8 - Diferenciação osteogênica induzida e não induzida.....	35
Figura 9 - Amostras avaliadas por eletroforese.....	35
Figura 10 - Representação da expressão gênica nos grupos cultivados em 10 e 20% de SFB ...	36
Figura 11 - Gráficos representativos da expressão gênica	37
Figura 12 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10 e TA20.....	39
Figura 13 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos MO10 e MO20.....	40
Figura 14 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10a, TA20a TA10b e TA20b.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos induzidos e não induzidos à diferenciação.....	24
Tabela 2 - Genes investigados, descrição, ID no genbank e seus respectivos primers.	29

RESUMO

A medula óssea (MO) e o tecido adiposo (TA) são fontes viáveis e amplamente estudadas de células tronco mesenquimais (CTMs), cujo alto potencial de multiplicação e diferenciação, aliado à característica imunomoduladora, permitem ampla aplicação em Medicina Veterinária com resultados satisfatórios na reconstrução de tecidos danificados. Diversos protocolos são descritos para isolamento e cultivo de CTMs, com divergência na porcentagem de suplementação de soro fetal bovino (SFB), componente xenogênico que é indicado como possível facilitador do processo de diferenciação *in vitro*. Este estudo analisou a proliferação e diferenciação induzida e não induzida de CTMs-TA e MO cultivadas em 10 ou 20% de SFB, e demonstrou que CTMs cultivadas em 20% de SFB apresentam maior eficiência de proliferação *in vitro*, e que a proliferação *in vitro* das CTMs-TA são superiores em comparação à CTMs-MO. O potencial de diferenciação das CTMs-TA e MO foi caracterizado por análise citológica e ultraestrutural após ensaio de diferenciação induzido por meios comerciais específicos e ensaio não induzido, onde as CTMs foram mantidas apenas nos meios basais. Esses ensaios foram também submetidos a avaliação de expressão gênica por qRT-PCR, porém estes dados não foram conclusivos. Aparente formação de matriz extracelular nas CTMs-TA cultivadas em 10% de SFB e não induzidas a diferenciação sugere possível ocorrência de diferenciação espontânea nesse grupo, o que foi evidenciado pela análise ultraestrutural. Adicionalmente, foi realizada caracterização imunofenotípica das CTMs-TA, com o objetivo de construir um banco de células aplicáveis *in vivo*. Em conclusão, a importância do SFB para o cultivo de CTMs foi demonstrada pelos resultados de proliferação superiores em células cultivadas em 20% de SFB, bem como a superior proliferação das CTMs-TA. A concentração de 10% de SFB no meio de cultivo pode favorecer a ocorrência de diferenciação espontânea das CTMs-TA, conforme demonstrado pela análise ultraestrutural. O isolamento, cultivo e caracterização de CTMs-TA foram eficientes e possibilitaram a formação de um banco de células viáveis para aplicação *in vivo*.

Palavras-chave: terapia celular, diferenciação celular, ultraestrutura, soro fetal bovino.

ABSTRACT

Bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) are viable sources of mesenchymal stem cells (mSCs), which high potential for proliferation and differentiation, in addition to immunomodulatory property allows wide application in Veterinary Medicine, obtaining satisfactory results in reconstruction of damaged tissues. Several protocols are described for isolation and culture of mSCs, although with divergences in percentage of fetal calf serum supplementation (FCS), a xenogenic component indicated as a possible factor for *in vitro* differentiation process. This study examined the proliferation, induced and non-induced differentiation of mSCs from AT and BM cultured in 10 or 20% FBS, and demonstrated that mSCs cultured in 20% FBS show higher *in vitro* proliferation efficiency, and proliferation *in vitro* of MSC-AT are higher compared to mSCs-BM. The differentiation potential of mSCs-AT and BM were characterized by cytological and ultrastructural analysis after differentiation assay induced by specific commercial media and not induced assay, where mSCs were maintained only in the basal media. These assays were submitted also to gene expression analysis by qRT-PCR, but these data were not concluded. Apparent formation of extracellular matrix in mSCs-AT cultured in 10% FBS and non-induced to differentiation were observed, which suggests possible occurrence of spontaneous differentiation in this group. Additionally, immunophenotypic characterization was performed of MSCs-AT, with the aim of maintain a cell bank to *in vivo* application. During the process of induced differentiation into adipogenic and osteogenic lineages, the mSCs-AT and BM presented morphological and physiological changes; acquire characteristics similar to the pre-adipocytes and osteoblasts, which did not occur when mSCs were not exposed to the inducing differentiation media. The concentration of 10% FBS in the culture medium may induce the occurrence of spontaneous differentiation of mSCs-AT, as demonstrated by ultrastructural analysis, the concentration of 20% FBS in the culture medium promotes cell proliferation of mSCs from both sources. Isolation, culture and characterization of mSCs-AT were efficient and allowed the construction of a cell bank viable for *in vivo* application.

Keywords: cell therapy, cell differentiation, ultrastructure, fetal bovine serum.

01. INTRODUÇÃO

Estudos com células tronco (CT) têm contribuído de forma efetiva para o avanço das possibilidades de terapia celular, devido ao alto potencial dessas células em regenerar tecidos e órgãos lesados. As CT podem ser classificadas, de acordo com seu potencial de diferenciação, em totipotentes, quando são capazes de se diferenciar em todos os tecidos de um indivíduo; pluripotentes, quando podem se diferenciar em todos os tecidos exceto os anexos fetais; multipotentes ou CT adultas, quando se diferenciam em mais de um tipo celular da mesma linhagem; e unipotentes, quando são capazes de se diferenciar em um só tipo celular (WODEWOTZKY, 2008). Conforme o tecido de onde se originam, as CT podem ser classificadas em embrionárias (CTE) ou somáticas. As CTE podem se diferenciar de forma desordenada, constituindo teratomas, além de serem foco de inúmeras discussões éticas. Sendo assim, as pesquisas com CT somáticas, que incluem as CT hematopoiéticas (CTH) e CT mesenquimais (CTMs) têm crescido e revelado grande variedade e potencial de aplicação terapêutica (PEREIRA, 2008).

A medula óssea (MO), é a principal fonte de CTMs estudada e permite a coleta de células com grande capacidade de diferenciação (PEREIRA, 2008), porém o número de CTMs isoladas a partir da MO decresce ao longo da vida dos indivíduos. O tecido adiposo (TA) também tem sido estudado como fonte alternativa de CTMs, da qual é possível obter células semelhantes às da MO, em maior quantidade e com potencial de diferenciação pluripotente ou multipotente (KERN et al., 2006; ZUK et al., 2002).

O potencial de diferenciação das CTMs é demonstrado *in vitro* quando utilizados meios de indução específicos (PITTENGER et al., 1999), porém, foi observado por Polchow et al. (2012), em experimento de cultivo de células de cordão umbilical humano, a presença de vacúolos lipídicos corados por *Oil Red* em CTMs não induzidas a diferenciação. As concentrações de soro fetal bovino (SFB) de 5 e 10% utilizadas pelos autores pode ter influenciado a diferenciação espontânea, porém outros fatores como densidade e contato entre as células também podem influenciar tais diferenciações, conforme observado por Peng et al. (2012) em experimento de cultivo induzido. Além de ser um possível indutor da diferenciação *in vitro*, o SFB, por ser um elemento xenogênico, representa um desafio no contexto da aplicação das CTMs *in vivo*, uma vez que pode influenciar na resposta imunológica do indivíduo receptor (MACKENSEN et al., 2000) e carrear vírus ou prions (MANNELLO & TONTI, 2007). Nesse contexto, este estudo objetivou analisar e comparar o processo de cultivo e diferenciação de CTMs obtidas de TA e MO de equinos, cultivadas em meios suplementados com 10 ou 20% de SFB, e em meio indutório de

diferenciação osteogênica e adipogênica. A eficiência de formação de colônias foi analisada por ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFCF), e após ensaios de diferenciação induzida e não induzida, as CTMs de ambos os grupos foram submetidas à análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de expressão gênica para os genes envolvidos na osteogênese e adipogênese. Adicionalmente, foi realizada caracterização de CTMs-TA, por meio de análise imunofenotípica dos marcadores positivos CD29, CD44, CD90 e Vimentina, e negativos MHC-II e CD34, além de diferenciação induzida na linhagem condrogênica.

02. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

02.1 Células-tronco Mesenquimais

Células tronco mesenquimais (CTMs) são indiferenciadas e apresentam alta capacidade de renovação e plasticidade. De origem embrionária mesodermal, as CTMs podem ser isoladas a partir de vários tecidos adultos, como o adiposo (TA), membrana sinovial, músculo esquelético, derme, osso, polpa dental, anexos fetais e sangue periférico (CHEN et al., 2008b), ou ainda, a partir do estroma da medula óssea, fonte de CT hematopoiéticas e CTMs amplamente estudada (BYDLOWSKI et al., 2009).

Uma das características que favorecem a aplicação das CTMs na terapia celular é sua capacidade migratória, que permite que as células, quando implantadas em um organismo, sejam sensíveis às citocinas liberadas nos sítios de dano tecidual, que incluem tumores, feridas e inflamações; essas citocinas são o gatilho para iniciar a migração das CTMs para os locais onde a reparação tecidual é necessária (UCCELLI et al., 2006). Segundo Caplan e Dennis (2006), as CTMs têm função repositora em tecidos com perda contínua de células e função reparadora em caso de dano tecidual; também são capazes de propiciar um microambiente adequado às células hematopoiéticas na MO. A capacidade de alterar o microambiente pela secreção de citocinas pode ser um fator que contribui mais para o potencial de regeneração de tecidos do que a capacidade de diferenciação das CTMs (PHINNEY e PROCKOP, 2007). Entre os fatores parácrinos secretados pelas CTMs, estão fatores de crescimento e proteínas envolvidas no recrutamento de macrófagos e células de origem endotelial que participam do processo de cicatrização, elementos com potencial de promover grande avanço em terapias para reparação tecidual (CHEN et al., 2008).

Estudos acerca da aplicação de CTMs na Medicina Veterinária e Humana têm buscado novas fontes dessas células, uma vez que o procedimento de colheita de material da medula óssea

é altamente invasivo e o potencial de proliferação destas células decresce com o avanço da idade do animal. Nesse contexto, estudos que isolam CTMs a partir de tecido adiposo têm indicado que este é uma excelente fonte para obtenção de células-tronco com rápida proliferação e senescência tardia, comparada às CTMs-MO.

02.2 Marcadores imunofenotípicos

Os marcadores imunofenotípicos são utilizados na caracterização das CTMs, conforme pré-requisitos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI, 2002). O marcador CD90, referente a uma glicoproteína também conhecida como Thy-1, está localizado na superfície da membrana celular e é expressa em diferentes tipos celulares, como células hematopoiéticas, neurônios, células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos e CTMs. Desempenha papel regulador da adesão, migração, apoptose e interações célula-MEC e célula-célula (KUMAR et al., 2016). Dessa forma, a alta expressão desse marcador é requerida para a confirmação das características das CTMs, assim como a alta expressão de CD44, uma glicoproteína transmembrana relacionada à interação célula-MEC. Seu principal ligante é o ácido hialurônico, e entre suas funções está integrar vias de sinalização que regulam a diferenciação, auto-renovação e migração das CTMs (WILLIAMS et al., 2013). O marcador positivo CD29, relativo à proteína Integrina β -1, também está relacionado aos mecanismos de adesão e transmigração celular, diretamente atuante na formação das protusões da membrana celular (CHEN et al., 2016). Esses marcadores positivos são frequentemente relatados em células tumorais e indicados como reguladores no processo de metástase, com ação de estímulo ou supressão da proliferação e migração dessas células (PHAM et al., 2011; SAALBACH et al., 2005; ZHENG et al., 2016), porém o processo tumorigênico envolve inúmeras vias e interações ainda não completamente elucidadas. A vimentina, isoforma da actina citoplasmática (Actina tipo V), está presente nos filamentos intermediários e é relacionada a plasticidade celular (SCHMITT-GRÄFF et al., 1994). É utilizada como marcador positivo de células mesenquimais, confirmando a origem das CTMs isoladas.

O marcador negativo CD34 é correspondente à proteína sialomucina. Está expresso nas células-tronco hematopoiéticas, células precursoras do tecido epitelial e células satélite do músculo esquelético, no qual desempenha importante papel na migração e regeneração muscular (ALFARO et al., 2011). A sialomucina é uma proteína transmembrana com caráter anti-aderente (SIEMERINK et al., 2016), e por este motivo é esperado que no cultivo *in vitro* de CTMs sua expressão seja baixa ou nula. O MHC-II (*Major Histocompatibility Complex type II*) está presente

nas células de defesa, regula a resposta imunológica e controla a interação célula-célula (COSGROVE et al., 1991). A expressão de receptores de MHC-II não é uma característica desejada em células destinadas à aplicação *in vivo* pois, por intermédio destes ligantes, os linfócitos T e B seriam rapidamente ativados e causariam um quadro de rejeição imunológica. A expressão dos receptores de MHC-II seria regulada por moléculas chamadas Transativadores tipo II (*Class II transactivators* – CIIT) que, quando suprimidas, causariam diminuição de expressão, conforme descrito por HUANG et al., (2016). A interação entre células que expressam receptores de MHC-II, moléculas de CIIT e Interferon- γ resultam em uma via de ativação da resposta imunológica em mamíferos (FAN et al., 2016).

02.3 Tecido adiposo como fonte de CTMs

Existe, no tecido adiposo (TA), uma fração vascular estromal que consiste em uma porção heterogênea, com células endoteliais, células do músculo liso, fibroblastos, mastócitos e pré-adipócitos. Essa fração pode ser isolada e cultivada *in vitro* para obtenção de CTMs (OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006). Zuk et al. (2001) realizaram estudo com população de células isoladas a partir de TA humano, coletados em cirurgia de lipoaspiração (processado lipoaspirado – PLA), e obtiveram diferenciação induzida *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica, miogênica e osteogênica, concluindo que as CTMs oriundas do TA são multipotentes, resistentes à criopreservação e podem ser uma alternativa à obtenção de CT da MO na terapia celular. O TA é uma fonte abundante e renovável de CTMs que apresentam senescência tardia quando comparadas com células da MO, e possuem grande potencial para terapias em patologias como Parkinson, Alzheimer, lesões medulares, artrite reumatóide, enfermidades cardíacas e possibilidade de reposição de tecidos danificados (KOKAI et al., 2014). Estudos que utilizam o TA como fonte de CTMs têm ampliado o campo da pesquisa e indústria, o que leva à necessidade de intensificar a busca de conhecimentos para otimizar e padronizar a aplicação das CTMs no campo terapêutico (BOURIN et al., 2013).

02.4 Medula óssea como fonte de CTMs

As CTMs derivadas de medula óssea (CTMs-MO) são células não hematopoiéticas multipotentes e com capacidade de migração e regeneração de sítios com danos teciduais *in vivo*, conforme reportado por FERRARI et al. (1998) em ratos com degeneração muscular induzida. A MO foi a principal fonte de CTMs descrita (PITTENGER et al., 1999) e amplamente estudada. As

CTMs podem ser isoladas a partir da fração estromal da MO, e sua aplicação *in vivo* demonstrou resultados positivos no tratamento de osteogênese imperfeita em humanos (HORWITZ et al., 1999), revelou grande potencial no tratamento de lesão de tendão em equinos, onde observou-se a diferenciação em tenócitos e regeneração do tendão lesionado após aplicação local (SMITH et al., 2010), e demonstrou o potencial de efeito parácrino dessas células em aplicação experimental de meio condicionado em lesão aguda do rim em ratos (CHENG et al., 2013). Apesar do avanço que as CTMs-MO representam no campo da terapia celular, há um declínio na proliferação e no potencial de diferenciação destas células conforme avanço da idade do animal (MUELLER; GLOWACKI, 2001; KERN et al., 2006). Sendo assim, estudos sobre o isolamento de CTMs a partir de outros tecido, como o adiposo, polpa dentária ou anexos fetais têm apresentado resultados interessantes na busca de cultivos celulares otimizados.

02.5 Potencial de aplicação das CTMs em Medicina Veterinária

A aplicação das CTMs na Medicina Veterinária representa grande avanço no tratamento de equinos com lesão de tendão (SMITH et al., 2010; CROVACE et al., 2010) e no tratamento de cães com osteoartrite (BLACK et al., 2007). Na reprodução animal, existe um potencial de aplicação a ser explorado descrito na regeneração do endométrio de ratas, por meio de CTMs aplicadas na cavidade uterina, com ação moduladora da inflamação local (ZHAO et al., 2015), e no tratamento de éguas com endometrite (FERRIS et al., 2014).

O potencial de restauração de tecidos pela aplicação de CTMs foi descrito experimentalmente em diversos tipos de lesão e com resultados promissores. A restauração do sistema circulatório e coração em cães com isquemia (SILVA et al., 2005) demonstrou que as CTMs se diferenciaram em fenótipo endotelial *in vivo*. Foi descrita também a recuperação de tecido ósseo em lesão cranio-facial de cães (LIU et al., 2013) e, recentemente, a regeneração de lesões renais induzidas em cães foi descrita por LIM et al. (2016), permitindo novas possibilidades para a terapia celular.

02.6 Diferenciação das CTMs

Diferenciação é o resultado de modificações na expressão gênica e no metabolismo celular, com consequente alteração de fenótipo (TAYLOR; CLEGG, 2011), originando um novo tipo de célula, distinto de sua linhagem inicial. A diferenciação das CTMs nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e a secreção de fatores parácrinos são propriedades

relevantes para a aplicação terapêutica dessas células e fundamentais para sua caracterização como CTMs (DOMINICI et al., 2006; MAUMUS et al., 2011). O potencial de diferenciação das CTMs é demonstrado *in vitro* quando utilizados meios de indução específicos, e é dependente da secreção de fatores parácrinos que influenciam o microambiente, favorecendo a proliferação e imunomodulação das CTMs (MAUMUS et al., 2011).

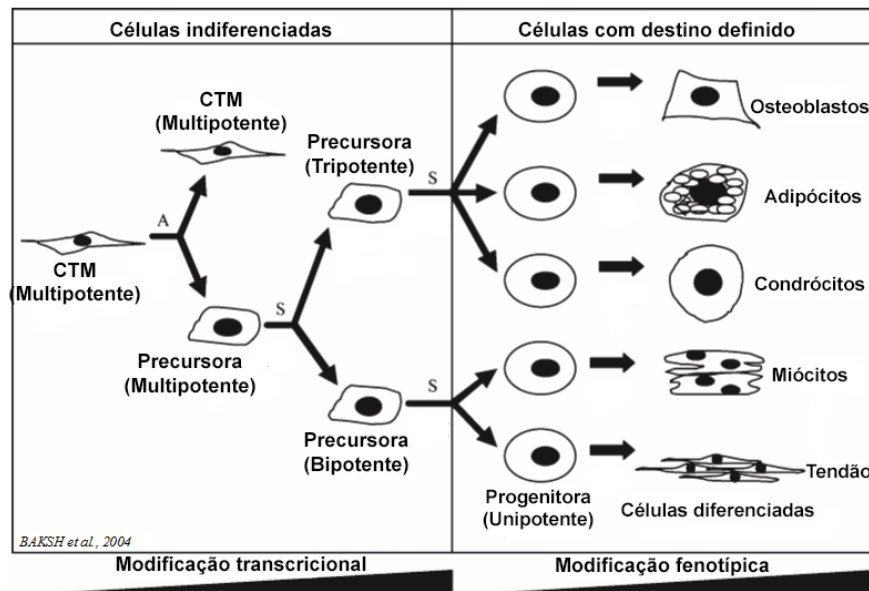


Figura 1- Modelo esquemático da diferenciação das CTMs. Em um primeiro momento, células multipotentes originam população de células menos potentes por divisão assimétrica (A), que originarão, por divisão simétrica (S), uma linhagem com potencial de diferenciação restrito. Em um segundo momento, ocorrem modificações fenotípicas que definem as células totalmente diferenciadas. Esquema adaptado de BAKSH et al., 2004.

Além da indução à diferenciação pela adição de determinados componentes químicos ao meio, existe uma correlação entre as modificações fenotípicas das células comprometidas no processo de diferenciação e as características físicas de seu microambiente, que influenciariam diretamente na capacidade de ancoragem e rearranjo do citoesqueleto. Microambientes com matrizes mais rígidas favorecem a diferenciação osteogênica e matrizes mais macias favorecem a diferenciação neurogênica, por mimetizarem o microambiente ósseo e cerebral (ENGLER et al., 2006). Interações biomecânicas de forças como tensão ou compressão, originadas da matriz extracelular, podem causar estiramento do citoesqueleto ou mudança na concentração de íons e promover sítios de adesão focal ou ativar canais iônicos por osmose (Fig.2), o que pode influenciar no crescimento e diferenciação de CTMs *in vivo* ou *in vitro* (GUILAK et al., 2009).

02.6.1 Diferenciação Adipogênica

Na adipogênese, as CTMs originam os pré-adipócitos, que posteriormente se diferenciam em adipócitos (FERNYHOUGH et al., 2005). O principal dos genes responsáveis por

essa diferenciação é o PPAR γ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*), e sua expressão é regulada por fatores extrínsecos. A diferenciação de CTMs na linhagem adipogênica pode ser induzida na presença de isobutilxantina, dexametasona, insulina, e indometacina (CHAMBERLAIN et al., 2007) e identificada por meio da visualização das gotículas de lipídios

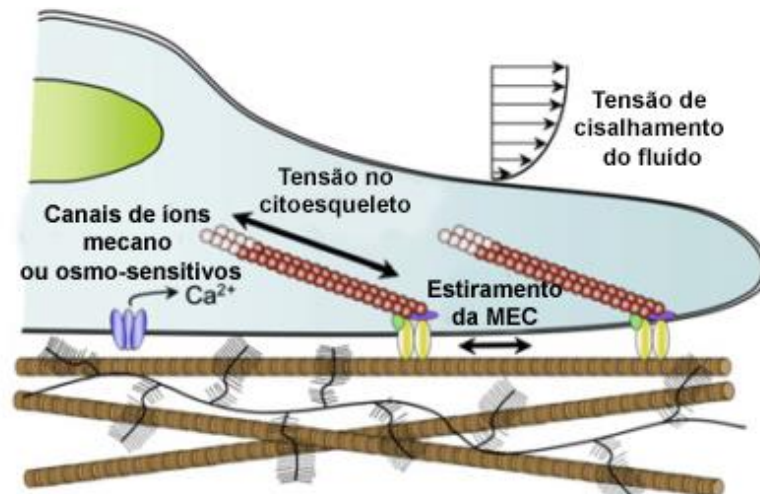


Figura 2 - Representação esquemática de fatores mecânicos e alterações morfológicas das CTMs. Tensão de cisalhamento de fluídos, tensão ou estiramento do meio extracelular influenciam na tensão do citosqueleto e nos canais de íons, com consequente alteração na morfologia e diferenciação celular. Esquema adaptado de GUILAK et al. (2009).

no citoplasma coradas por *Oil Red* (GADE et al., 2013; SINGH et al., 2013), pela expressão gênica de PPAR γ e GLUT4 (FERNYHOUGH et al., 2007) e pela síntese das proteínas leptina, adiponectina (ROCCA et al., 2009), aP2 (*adipose fatty-acid binding protein 2*) (YU et al., 2003), ADAM12 e pela síntese de $\beta 1$ integrina (KAWAGUCHI et al., 2003).

02.6.2 Diferenciação Osteogênica

Na diferenciação osteogênica ocorre deposição de matriz extracelular de cálcio, detectável pela coloração de *Alizarin Red*. A expressão dos genes específicos de Periostina, Osteonectina (ROCCA et al., 2009), GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato), Fosfatase alcalina, BMP (*Bone morphogenetic protein*) (HWA CHO et al., 2006), Colágeno I e RUNX2 (*runt-related transcription factor 2*) (COLOSIMO et al., 2013) estão envolvidos no processo de osteogênese, e a dexametasona é um dos principais agentes externos neste processo (CHENG et al., 1994). Kim et al. (2012) analisaram a ação de quinases ativadas por mitógenos e observaram que o bloqueio das quinases ativas na diferenciação osteogênica resultam na diferenciação adipogênica e na expressão de PPAR- $\gamma 2$ e aP2. Os autores observaram a presença de células adipogênicas nas

culturas *in vitro* tratadas com meio indutor osteogênico e inibidores de MEK quinase, que estaria envolvida na diferenciação osteogênica e seria capaz de regular a diferenciação adipogênica.

A diferenciação osteogênica *in vitro* pode estar sujeita a alterações pela presença de SFB no meio de cultivo, conforme demonstrado por KODAIRA et al. (2006). Os autores descreveram a presença de moléculas similares às BMPs (*Bone morphogenetic protein*), identificadas como BMP-4, no SFB. Essas moléculas, presentes em larga escala em meios de cultivo suplementados com SFB, teriam a ação de inibição da miogênese e estimulação da diferenciação osteogênica. As BMPs são um subgrupo da família TGF- β (*Transforming growth factor betta*), e desenvolvem papel fundamental no desenvolvimento embrionário, ossificação endocondral, diferenciação osteogênica e condrogênica (CARREIRA et al., 2014).

02.6.3 Diferenciação Condrogênica

A diferenciação em linhagem condrogênica ocorre na presença de moléculas da família TGF- β 1 (*Transforming growth factor β 1*), como as BMPs, FGF (*Fibroblast growth factor*) e IGF (*Insulin-like growth factor*) (MASTROGIACOMO et al., 2001) e pode ser identificada pela expressão de marcadores de GAPDH, Colágeno II, Agreccan e SOX9 (BOSNAKOVSKI et al., 2005). Recipientes que permitem cultivo em três dimensões têm se mostrado favoráveis à diferenciação condrogênica quando comparados à cultivos celulares em monocamadas. Tal fato pode estar relacionado à interação-célula-célula, que permite que a cultura *in vitro* ocorra em condições mais próximas ao processo *in vivo* (HWANG et al., 2006).

03. HIPÓTESES

- Durante o processo de diferenciação induzido ocorrem modificações morfológicas em todos os grupos avaliados, com expressão dos genes Colágeno tipo I e Periostina nas CTMs induzidas à diferenciação osteogênica e PPAR- γ e Leptina nas CTMs induzidas à diferenciação adipogênica.

- As concentrações de SFB de 10 e 20% no meio de manutenção não induzem ocorrência de diferenciação espontânea em nenhum dos grupos estudados durante o tempo de observação.

- As CTMs-TA e CTMs-MO equinas apresentam eficiência de UFCF distintas, sendo o grupo cultivado com DMEM suplementado com 20% de SFB o mais eficiente na formação de colônias.

- Os protocolos empregados no isolamento, cultivo e caracterização de CTMs-TA são eficientes e possibilitam a formação de banco de células viáveis para aplicação *in vivo*.

04. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar e comparar o potencial de proliferação e diferenciação das CTMs-MO e CTMs-TA equinas em meio de manutenção suplementado com 10 e 20% de SFB e na presença de meios indutores da adipogênese e osteogênese.

04.1 Objetivos específicos

- Avaliar a diferenciação induzida por meios de cultivo específicos nas linhagens adipogênica e osteogênica por meio de coloração citológica, análise ultraestrutural e expressão gênica.

- Analisar a possível ocorrência de diferenciação espontânea nas CTMs-TA e MO mantidas em meio de cultivo suplementado com 10 e 20% de SFB sem agentes indutores da diferenciação por meio das mesmas ferramentas empregadas na avaliação dos grupos induzidos.

- Avaliar e comparar a proliferação *in vitro* das CTMs-TA e MO cultivadas em DMEM suplementado com 10 e 20% de SFB por meio de ensaio de Unidades Formadoras de Colônias Fibroblásticas (UFCF) com a finalidade de determinar a fonte de CTMs mais eficiente e concentração de SFB mais indicada para otimização do cultivo celular.

- Caracterizar as CTMs obtidas a partir de TA de equinos por análise imunofenotípica, citogenética e diferenciação induzida nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, conforme critérios pré-estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI, 2002), visando a formação de banco de células viáveis para aplicação *in vivo*.

05. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As amostras de TA e MO foram coletadas de 5 equinos hígidos, as CTMs isoladas e cultivadas em 10 ou 20% de SFB. Para melhor organização, este experimento foi dividido em três momentos:

1. Caracterização das CTMs-TA cultivadas em 20% SFB: realizada em segunda passagem, por meio de citometria de fluxo para investigação dos marcadores imunofenotípicos, cariotipagem para confirmação de euploidia e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica induzidas, conforme pré requisitos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI, 2002), com a finalidade de estabelecer um banco de células com potencial de aplicação *in vivo*. As CTMs cultivadas em 10% SFB não foram caracterizadas pois assumiu-se que a concentração de SFB não influenciaria na expressão dos marcadores imunofenotípicos. As CTMs-MO foram previamente caracterizadas por este grupo de pesquisa (MAIA et al., 2013; BARBERINI et al., 2014) e, por este motivo, a caracterização das CTMs-MO não foi realizada.
2. Análise e comparação da eficiência de formação de colônias das CTMs-MO e TA cultivadas em 10 ou 20% de SFB por ensaio de UFCF, com a finalidade de analisar a influência das diferentes concentrações de SFB na proliferação das CTMs.
3. Análise citoquímica, ultraestrutural e molecular das células induzidas e não induzidas à diferenciação, quando as CTMs foram divididas em grupos, conforme tabela abaixo:

GRUPO	DESCRIÇÃO
TA10	CTMs-TA cultivadas em 10% SFB e não induzidas à diferenciação
TA10a	CTMs-TA cultivadas em 10% SFB e induzidas à diferenciação adipogênica
TA10b	CTMs-TA cultivadas em 10% SFB e induzidas à diferenciação osteogênica
TA20	CTMs-TA cultivadas em 20% SFB e não induzidas à diferenciação
TA20a	CTMs-TA cultivadas em 20% SFB e induzidas à diferenciação adipogênica
TA20b	CTMs-TA cultivadas em 20% SFB e induzidas à diferenciação osteogênica
MO10	CTMs-MO cultivadas em 10% SFB e não induzidas à diferenciação
MO10a	CTMs-MO cultivadas em 10% SFB e induzidas à diferenciação adipogênica
MO10b	CTMs-MO cultivadas em 10% SFB e induzidas à diferenciação osteogênica
MO20	CTMs-MO cultivadas em 20% SFB e não induzidas à diferenciação
MO20a	CTMs-MO cultivadas em 20% SFB e induzidas à diferenciação adipogênica

06. MATERIAIS E MÉTODOS

06.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética do Instituto de Biociências de Botucatu (Protocolo nº 758 - CEUA). Foram utilizados 5 equinos hígidos, de ambos os sexos e com idade entre 9 e 15 anos e peso entre 350-450 kg.

06.2 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO

A coleta de MO foi realizada por meio de punção aspirativa, conforme protocolo descrito por SMITH et al. (2010). Para isso, os animais foram contidos em brete e sedados com 0,5 mg kg⁻¹ xilazina (Sedomin®, Köning, ARG). Em seguida, foi realizada a tricotomia de uma área de 5 x 20 cm na região referente ao osso esterno. Após a identificação da quinta esternébra, foi realizada anti-sepsia e bloqueio anestésico local (Xylestesin® 2%, Cristália, BRA). Uma vez bem fixa a agulha de mielograma (Lang®, BRA) dentro do esterno, o mandril é retirado, procedendo-se a aspiração da medula óssea com auxílio de duas seringas de 20 mL contendo 2mL de heparina a 5000 UI/mL (Hemofol®, Cristália, BRA) e 2 mL de HBSS (Invitrogen Gibco®, USA). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 350G por 30 minutos, em solução gradiente Ficoll (GE®, Healthcare Life Sciences, SWE), e a fração mononuclear isolada foi lavada duas vezes e cultivada em meio composto de DMEM alta glicose, 10% ou 20% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina (10µL/mL) e anfotericina (3µg/mL) (Gibco®, EUA), e incubado a 37,5°C em atmosfera úmida, com 95% de ar e 5% CO₂. O meio foi trocado a cada dois ou três dias, e a passagem ocorreu quando as células alcançaram confluência mínima de 80%, por ressuspensão em tripsina (TrypLE™ Express – Invitrogen®, EUA), e incubação durante 3 minutos em estufa a 37°C, procedendo bloqueio com meio de cultura na proporção 1:1, centrifugação a 600G por 10 minutos e novo plaqueamento.

06.3 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-TA

Após sedação do animal, de acordo com protocolo descrito previamente, as amostras de TA foram coletadas da região acima do músculo glúteo dorsal, na base da cauda, após tricotomia, anti-sepsia e bloqueio anestésico com lidocaína a 2%, sem vasoconstritor. A amostra de TA foi, então, acondicionada em tubos de polipropileno de 50 mL estéreis, contendo meio DMEM alta glicose, 10 ou 20% de SFB acrescido de antibiótico e antimicótico. Os tubos foram armazenados e transportados a 5°C no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botutainer (Botupharma®, Botucatu, Brasil) até ao laboratório LANÇA, onde foram lavadas cerca de quatro vezes em DPBS acrescido de antibiótico e antimicótico. Em seguida, as amostras foram fragmentadas utilizando lâminas para bisturi número 24, e submetidos à digestão enzimática, conforme protocolo proposto por ZUK et al. (2002). Os fragmentos foram transferidos para tubo de polipropileno de 50 mL, contendo solução a 0,04% de collagenase tipo I (Gibco®, Invitrogen) e incubadas a 37,0 °C em banho-maria durante trinta minutos, com homogeneização a cada 10 minutos em vórtex. Após o tempo de digestão, as amostras passaram por filtro de 70µm (BD®) e, posteriormente foram centrifugadas com DPBS e 10% SFB na proporção de 1:1 a 350 G por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado e cultivado em meio composto de DMEM alta glicose, 20% de soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina e 1,2% anfotericina (3µg/mL) (Gibco, EUA), no qual foi incubado a 37,5°C em atmosfera úmida, com 95% de ar e 5% CO₂. O meio foi trocado pela metade a cada dois ou três dias, e a passagem ocorreu quando as células alcançaram confluência em torno de 80%, por ressuspensão em tripsina (TrypLE™ Express – Invitrogen®, EUA), e incubação durante três minutos em estufa a 37°C, procedendo bloqueio com meio de cultura na proporção 1:1, centrifugação a 600G por 10 minutos e novo plaqueamento.

06.4 Contagem e plaqueamento das CTMs

Na ocasião das passagens, as CTMs viáveis foram contabilizadas em câmara de Neubauer, preparadas com Trypan Blue (Gibco®, EUA), após serem ressuspensionadas e centrifugadas para formação de pellet. A fórmula empregada para calcular o número de CTMs foi: Média das células contadas nos quatro quadrantes da câmara multiplicada pela diluição realizada, por 10⁴ e pelo volume no qual o pellet foi ressuspensionado. O plaqueamento foi predominantemente realizado na densidade de 10⁴ células/cm² em todas as passagens.

06.5 Ensaio de unidades formadoras de colônicas fibroblásticas (UFCF)

A eficiência de autorrenovação das CTMs-TA e MO foram avaliadas na segunda passagem mediante a realização de ensaio de UFCF, conforme metodologia descrita por Mensing et al. (2011) com modificações. Para isso, as CTMs foram plaqueadas em baixa densidade, em placas de seis Wells (50 células/cm²), com troca de meio a cada três dias. No 4º dia, as culturas foram fixadas e coradas com 1% de cristal violeta em 100% de metanol. As colônias coradas com mais de 20 células foram classificadas como UFCF e contabilizadas. O cálculo da eficiência de colônias formadas foi conduzido utilizando-se a seguinte fórmula: Eficiência de UFCF = (UFCF contadas/ células originalmente plaqueadas) x 100. Os ensaios de UFCF foram realizados em triplicatas.

06.5.1 Análise citogenética

A análise do cariótipo para confirmação da viabilidade de aplicação *in vivo* das CTMs-TA foi realizada em segunda passagem, por meio de técnica de sincronização do ciclo celular pelo método do metotrexato (MTX) / timidina (Tdi). Para preparação das lâminas, as células foram tripsinizadas a 37°C, fixadas, coradas com Giemsa a 5% e posteriormente analisadas em microscopia de luz. Em cada amostra, 12 metáfases foram analisadas.

06.6 Caracterização de CTMs-TA

06.6.1 Caracterização Imunofenotípica

A avaliação imunofenotípica das CTMs-TA foi conduzida na segunda passagem, por citometria de fluxo no citômetro LSR Fortessa (BD®), utilizando como marcadores positivos os anticorpos mouse anti-vimentin: FITC (Creative Biomart, USA), mouse anti-rat CD90 (AbD Serotec, UK), mouse anti-bovine – CD29:AF (BioLegend), mouse anti-bovine CD44 (AbD Serotec, UK), e como marcadores negativos os anticorpos anti-horse MHC–II:FITC (AbD Serotec, UK) e mouse anti-dog CD34 (AbD Serotec, UK). Duzentas mil células foram utilizadas para cada anticorpo, e durante a análise foram contabilizados 10.000 eventos.

06.6.2 Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as CTMs foram ressuspensas em segunda passagem e contadas. Cerca de 400 mil células foram colocadas em microtubo (1 mL) e submetidas

a centrifugação para formação de pellet, que foi cultivado em meio de diferenciação condrogênico STEMPRO® (Invitrogen Gibco®, USA), em arcabouço tridimensional, conforme proposto por ERICKSON et al. (2002). O meio foi trocado a cada três dias, durante doze dias, conforme instruções do fabricante. Após esse período, as amostras foram fixadas em formol, procedendo a análise citológica. A diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica foram realizadas durante o ensaio de diferenciação induzido descrito adiante.

06.7 Indução à diferenciação

A indução à diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica ocorreu em segunda passagem, quando as CTMs foram colocadas em placas de 24 wells, na densidade de 10.000 células/cm². Quando as CTMs atingiram cerca de 60% de confluência, o meio de cultivo foi substituído pelos meios de indução StemPro Osteogenesis e StemPro Adipogenesis (ambos Gibco®, EUA), e mantidas incubadas a 37°C em 5% de CO₂, com trocas de meio a cada 48-72 horas. Os ensaios tiveram duração de 9 dias, conforme padronizado em piloto anteriormente realizado.

06.8 Diferenciação não induzida

Os ensaios de diferenciação não induzida foram conduzidos na segunda passagem, em placas de 24 wells em duplicata, com densidade de 10.000 células/cm² e duração de 9 dias. As CTMs deste grupo continuaram recebendo apenas o meio de cultivo suplementado com 10 ou 20% de SFB.

06.9 Avaliação citológica

Após os ensaios de diferenciação, as CTMs foram fixadas nas placas de cultivo com formol durante 10 minutos, lavadas em água MiliQ e as amostras osteogênicas foram coradas com *alizarin red* 2% diluído em água MiliQ, durante três minutos. As amostras adipogênicas receberam *oil red* 0,5% diluído em isopropanol, durante 10 minutos, e em seguida foram contra-coradas com hematoxilina-eosina (HE). O grupo de amostras não induzidas à diferenciação recebeu o mesmo tratamento descrito. As amostras em diferenciação condrogênica para caracterização de CTMs-TA foram coradas com Azul de Toluidina pH 1 e hematoxilina/eosina (HE), após os pellets serem fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas e incluídos em parafina para realização dos

cortes histológicos em seções de 5 µm de espessura. Após coloração, as amostras osteogênicas, adipogênicas e não induzidas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz invertida com auxílio do software LAS 4.0 (DM IRB, Leica Microsystems, Alemanha) e as amostras condrogênicas em microscópio Axio com auxílio do software AxioVision (v. 4.8, Zeiss, Alemanha).

06.10 Análise de ultraestrutura

A análise de ultraestrutura foi realizada por microscopia de transmissão (MET). As amostras foram processadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu e analisadas no Núcleo de Microscopia Eletrônica da ESALQ-USP.

As CTMs-TA e MO foram fixadas em Karnovisk modificado (pH = 7,4) a 4°C por no mínimo 24 horas. Após a lavagem, no mesmo tampão, o pellet foi submetido a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1% (Koch Instrumentos Científicos Ltda, Brasil) durante três horas a temperatura de 4°C, sendo então, lavado por três vezes em água bidestilada. Após, foi iniciada a desidratação em séries crescentes de acetona (Merck, Brasil) (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 5 minutos cada, repetindo-se a lavagem na concentração 100% por três vezes. A polimerização foi feita com Araldite 502 (Koch Instrumentos Científicos Ltda, Brasil) durante 72 horas a temperatura de 60°C. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Koch Instrumentos Científicos Ltda, Brasil) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão (Philips E.M. 301). Na avaliação ultraestrutural foram observadas possíveis modificações na membrana plasmática, nas organelas e aspectos nucleares em ensaio de diferenciação induzido e não induzido.

06.11 Avaliação de expressão gênica

06.11.1 Genes

Os genes investigados para diferenciação osteogênica foram Colágeno tipo I e Periostina e, para diferenciação adipogênica, PPAR-γ e Leptina. Como controles endógenos foram usados GAPDH e β actina (Tabela 2). Os genes eleitos foram pesquisados para *Equus caballus* na base de dados online GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), em seguida os primers foram desenhados com a ferramenta online Primer-BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

GENE	DESCRIÇÃO	ID	SEQUÊNCIA
Colágeno tipo I	<i>Collagen type I alpha I</i>	COL1A1	F- CCAATGGCGCTCCTGGTATT R- ACCAGGTTACCGCTGTTAC
Periostina	<i>Periostin</i>	POSTN	F- TTGCAAGAAGACACACCCGT R- CACTGAGAACGACCTTCCCTC
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	PPARG	F- CCTTGTTAGCTCCCATCGCT R- TGGTAATTCGTTGAAGGGCAAC
Leptina	<i>Leptin</i>	LEP	F- TTTCACACACGCAGTCAGTCT R- GGGTGAAGCCCAGGAATGAA
GADPH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	GADPH	F- TGTCATCAACGGAAAGGCCA R- CAGCATCGCCCCATTGATG
β - actina	<i>Actin beta</i>	ACTB	F- TTCCCTGGAGAAGAGCTACGA R- ATTCCATGCCCGAGGAAGGAG

Tabela 2 - Genes investigados, descrição, ID no genbank e seus respectivos primers.

06.11.2 Extração de RNA total

Para extração de RNA total, as CTMs submetidas aos ensaios de diferenciação induzido e espontâneo receberam 500 µl de TRIzol® (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (Nanovue - GE Healthcare) e a integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

06.11.3 RT-qPCR

Para cada amostra, 2µg do RNA extraído foi sintetizado em cDNA, usando o kit Reverse Transcript (Applied Biosystems®, EUA), e em seguida, tratada com inibidor de RNase. A amplificação foi realizada em duplicata, usando 0,4µm de cada primer e Power SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EUA). Os ciclos foram programados em 50 °C por dois minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60°C por um minuto, em termociclador (Quantstudio – Applied Biosystems, EUA). A expressão gênica foi calculada usando método comparativo (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), com grupo controle como referência.

06.12 Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises da expressão de marcadores de superfície celular e UFCF foram primeiramente sumarizados em tabela por meio das estimativas das médias, desvios padrão, mínimo, mediana e máximo para cada tratamento. Gráficos foram construídos para facilitar a análise e a interpretação dos resultados encontrados. Posteriormente, realizou-se um estudo de análise de variância (ANOVA) para um modelo de efeitos mistos com medidas repetidas empregando os resultados verificados nas triplicatas de UFCF. O modelo misto consiste em avaliar os efeitos fixos dos métodos (tratamentos) e das medidas (triplicatas), considerando os animais como efeitos aleatórios e especificando a matriz de correlação das medidas repetidas como uma matriz simétrica de correlações com todos os valores iguais. O PROC MIXED do pacote estatístico SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado nas análises estatísticas. O teste de Tukey foi aplicado para verificar quais médias dos métodos apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre si, comparando-as duas a duas. Adotou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$), ou seja, são consideradas diferenças estatisticamente significativas se o valor p do teste estatístico for inferior a 0,05.

07. RESULTADOS

07.1 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO

A coleta de MO foi realizada sem intercorrências, com o mínimo de estresse e dor possível aos animais. O volume de material obtido foi suficiente para executar o protocolo de isolamento de modo eficiente. A primeira observação foi realizada com 48 horas de cultivo, e poucas células estavam aderidas. Dessa forma, as primeiras trocas de meio foram realizadas pela metade, com a finalidade de manter as células que ainda não estavam aderidas. As CTMs-MO demonstraram proliferação lenta, em colônias espaçadas e com células em formato fibroblastóide, porém em tamanho maior do que as isoladas de TA. Colônias de CTMs aderidas foram observadas por volta do sétimo dia no grupo cultivado em meio com 20% de SFB e por volta do nono dia de cultivo em meio com 10% de SFB.

07.2 Coleta, isolamento e cultivo do CTMs-TA

O protocolo de obtenção de TA foi eficiente e permitiu que porções mínimas (aproximadamente 2g) de tecido obtido rendessem células suficientes para culturas com 80% de

confluência cerca de dez dias após isolamento. Os animais responderam bem à sedação e o procedimento foi realizado de forma rápida e sem maiores complicações.

07.3 Caracterização de CTMs-TA

07.3.1 Caracterização imunofenotípica

Médias altas de expressão foram observadas nos marcadores positivos CD29 (99,46% $\pm$ 0,747), CD90 (99,28% $\pm$ 0,722), CD44 (97,82% $\pm$ 2,24) e Vimentina (96,12% $\pm$ 1,92), e baixa expressão dos marcadores negativos MHC-II (21,16% $\pm$ 13,22) e CD34 (6,98 $\pm$ 8,56) (Fig. 3).

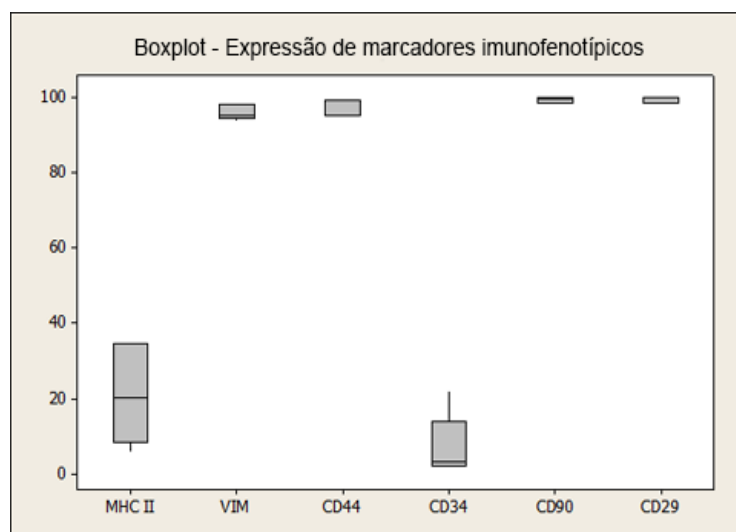


Figura 3 - Boxplot: Marcadores imunofenotípicos expressos em porcentagem. A expressão baixa ou nula dos marcadores MHC-II e CD34, e alta expressão dos demais caracteriza as CTMs-TA.

07.3.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica evidenciou a presença de MEC de proteoglicanos corada por Azul de Toluidina (Fig.6A) e HE (Fig. 6B), o que confirmou a capacidade das CTMs-TA se diferenciarem na linhagem condrogênica, na presença de meio indutor e em um arcabouço 3D.

07.3.3 Análise citogenética

A análise de cariótipo demonstrou euploidia (2n=64) em todos os grupos, sem grandes dificuldades para obtenção de metáfases ao longo do cultivo (Fig.4).

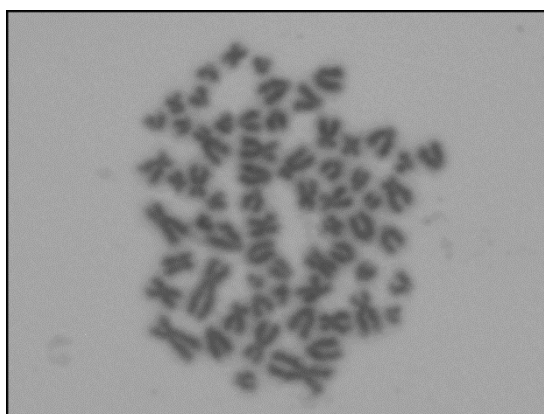


Figura 4 - Análise cromossômica. Cromossomos em euploidia ($2n=64$) para *E. caballus*.

07.4 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas

A análise ANOVA demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre triplicatas de cada amostra. Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os grupos TA10 e TA20 ($p=0,0061$) e entre os grupos MO10 e MO20 ($p=0,0283$), conforme mostra o gráfico 2. O teste de Tuckey mostrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos MO10 e TA10 ($p=0,9965$) e MO20 e TA20 ($p=0,9858$).

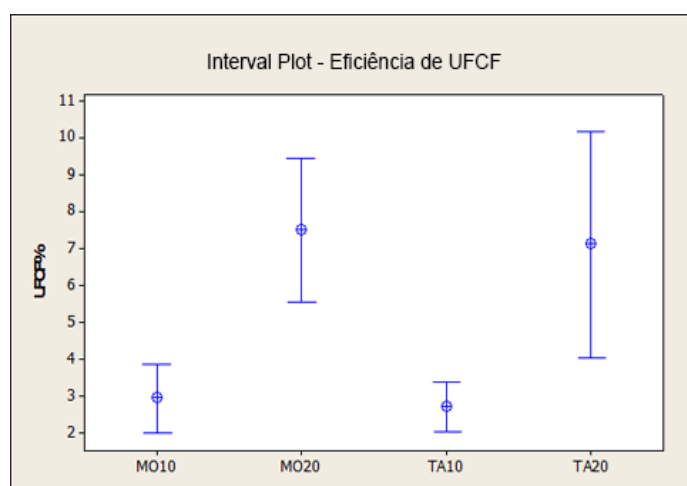


Figura 5 - Variação de eficiência de UFCF dos grupos CTMs-MO e CTMs-TA em 10 e 20% SFB. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos cultivados com mesma concentração de SFB.

07.5 Indução à diferenciação

As células submetidas à cultura em meio específico para diferenciação demonstraram discretas mudanças morfológicas cerca de 4 dias após receber meio indutor em ambos os grupos, porém, as CTMs-MO demonstraram maior fragilidade em relação ao meio de cultura indutor e muitas células em suspensão foram encontradas no terço final do período de diferenciação. As CTMs que receberam o meio indutor da linhagem adipogênica apresentaram tamanho aumentado em relação à cultura sem meio indutório, e se agruparam em pequenas colônias distantes umas das outras. Gotículas de lipídeo foram observadas nas células coradas com *Oil Red* e HE, e a diferenciação adipogênica pôde ser confirmada (Fig.7). Os poços que receberam meio de diferenciação osteogênico apresentaram células de aparência alongada, e a diferenciação osteogênica foi posteriormente confirmada pela evidência de matriz extracelular de cálcio por meio da coloração com *Alizarin Red* (Fig.8).

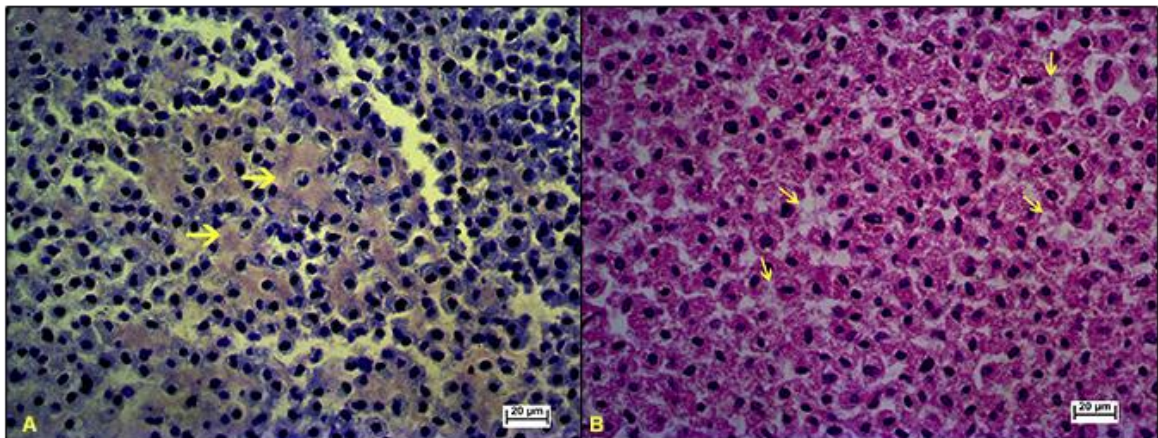


Figura 6 - Diferenciação condrogênica. A: CTMs-TA coradas por Azul de Toluidina, destaque para MEC de proteoglicanos corada em rosa. B: CTMs-TA, coradas por HE. MEC hialina evidenciada em rosa claro. Barra de escala: 20 μm .

07.6 Diferenciação não induzida

CTMs que continuaram recebendo os meios de manutenção sem agentes indutores apresentaram morfologia fibroblastóide ao longo de todo ensaio, com crescimento mais rápido e uniforme quando comparadas às células que receberam meio indutor. Poços corados com *Oil Red* e HE evidenciaram morfologia alongada, com núcleo evidente e ausência de depósito significativo

de lipídeo (Fig.7B, 7D). Na coloração com *Alizarin Red* observou-se ausência de matriz extracelular de cálcio (Fig. 8B, 8D).

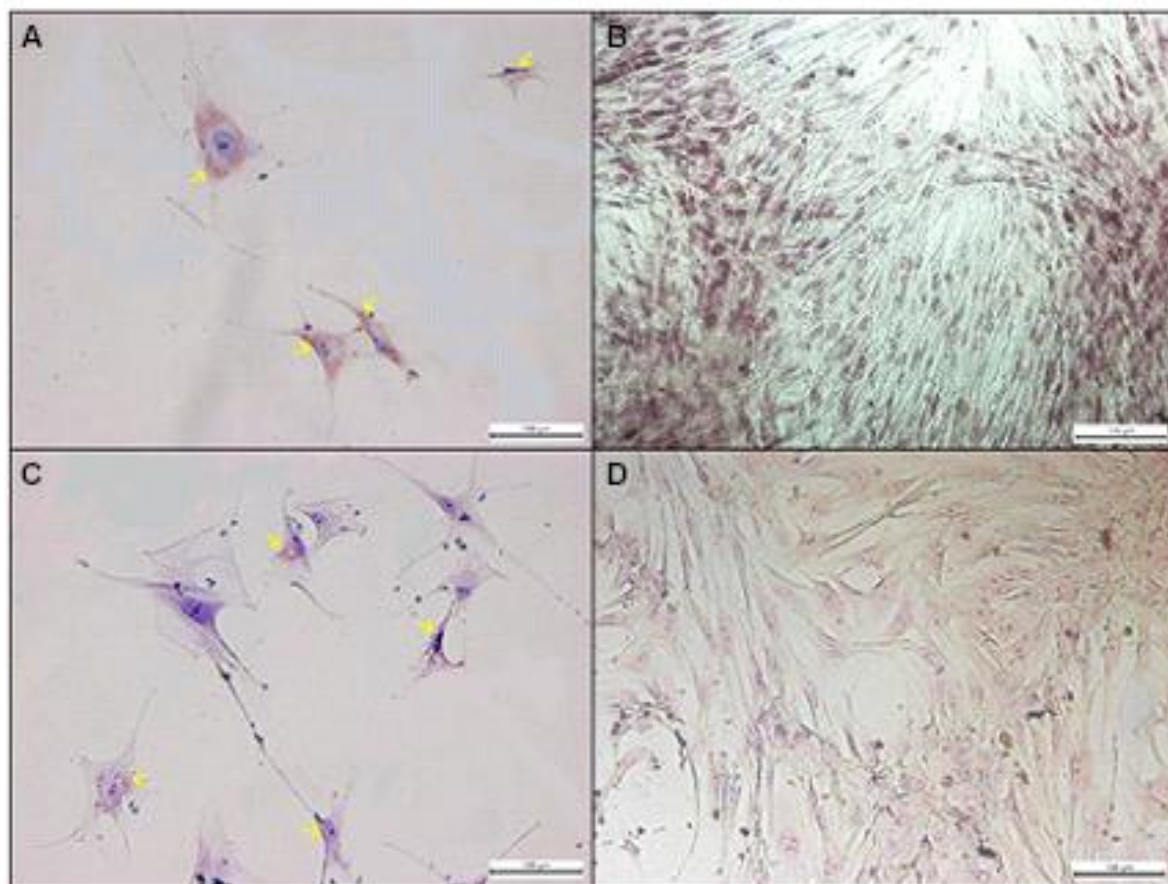


Figura 7 - Diferenciação adipogênica induzida e não induzida. **A:** Grupo TA20a: gotículas de lipídeo coradas no citoplasma, células maiores. **B:** Grupo TA20: morfologia alongada e crescimento em grande colônias. Ausência de depósitos lipídicos visíveis. **C:** Grupo MO20a: gotículas de lipídeo citoplasmática em menor quantidade comparadas ao grupo TA20. **D:** Grupo MO20: morfologia alongada, tamanho maior comparado ao grupo TA20, ausência de depósitos lipídicos visíveis. Barra de escala: 100 μ m.

07.7 Avaliação de expressão gênica

07.7.1 Extração de RNA total

O método adotado foi eficiente para extração de RNA total, porém as amostras de CTMs-MO não foram suficientes para obter amostras de RNA em concentração e integridade ideais para a realização da técnica de RT-qPCR. É possível que, por serem maiores do que as CTMs-TA, o volume de células obtido em placas de 24 poços não tenha sido ideal para a técnica de extração de RNA. Foram obtidas amostras viáveis de RNA dos grupos TA10, TA10a, TA10b, TA20, TA20a e TA20b de apenas dois animais (animais 4 e 5), confirmadas por espectrofotometria e gel de

agarose (Fig.7). Apenas amostras de RNA com integridade confirmada pelas duas técnicas foram submetidas aos procedimentos de síntese de cDNA e técnica de qRT-PCR.

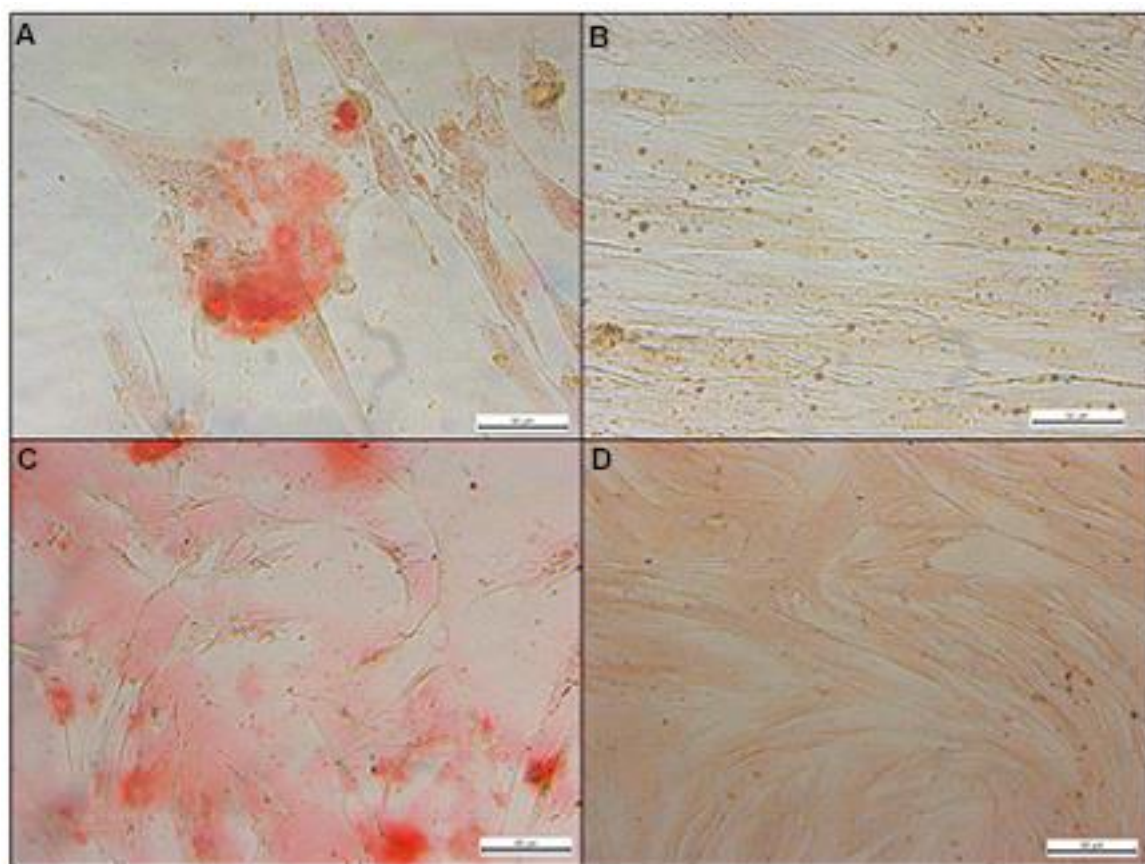


Figura 8 - Diferenciação osteogênica induzida e não induzida. A- Grupo MO10b, MEC de cálcio evidenciada por coloração com Alizarin Red. B- Grupo MO10, ausência completa de MEC. C- Grupo TA10b: MEC de cálcio. D- Grupo TA10: morfologia fibroblástica e ausência de MEC aparente. Barra de escala: 50 µm.

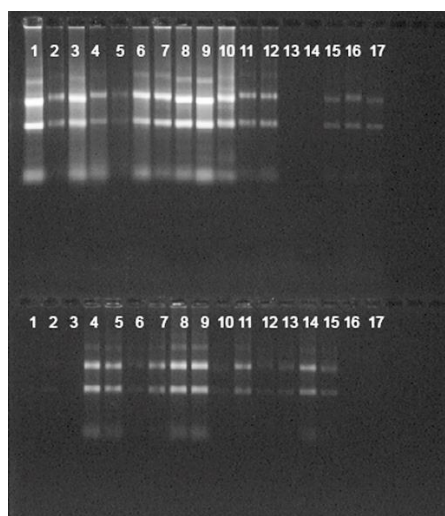


Figura 9 - Amostras avaliadas por eletroforese. Amostras viáveis apresentam bandas bem definidas. Bandas ausentes ou pouco visíveis demonstram RNA com baixa integridade (amostras inviáveis).

07.7.2 RT-qPCR

A técnica de PCR em tempo real foi realizada com sucesso nas amostras íntegras obtidas, porém, apenas grupos de amostras de CTMs-TA com RNA íntegro de dois animais puderam ser obtidos. Por este motivo, os dados de expressão gênica demonstrados não são conclusivos para caracterização do processo de diferenciação celular. Todos os genes investigados foram apontados como expressos, porém nas amostras dos grupos TA10 e TA20 (controles), desvios muito altos foram detectados (Fig.10 e 11). No animal 4, os genes LEP, COL1 e PER estão *down* regulados nos grupos induzidos (tratados), enquanto PPAR está *up* regulado (Fig.11^a e B) em relação aos grupos não induzidos (controle). No animal 5, os genes COL1 e PER estão *down* regulados em relação ao grupo não induzido, enquanto os demais genes estão *up* regulados (Fig.11C e D).

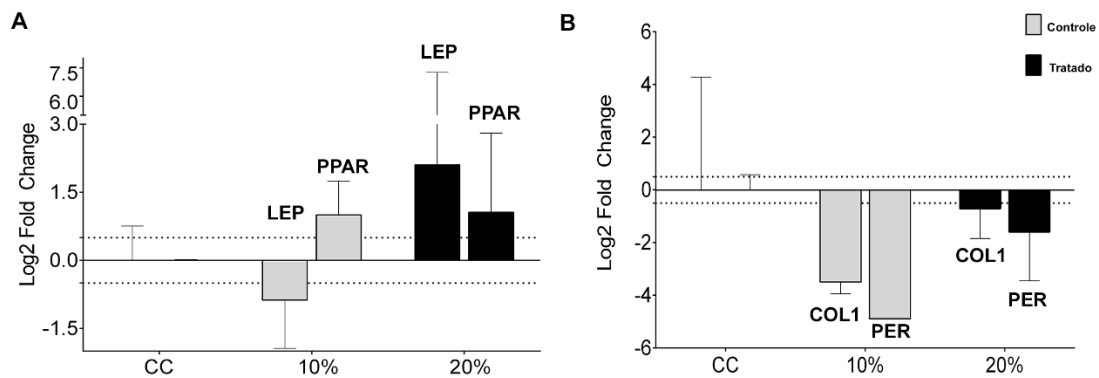


Figura 10 - Representação da expressão gênica nos grupos cultivados em 10 e 20% de SFB. A: Genes da diferenciação adipogênica nos grupos TA10a e TA20a com grupos TA10 e TA20 como controles. **B:** Genes da diferenciação osteogênica dos grupos TA10b e TA20b, com os grupos TA10 e TA20 como controles (CC).

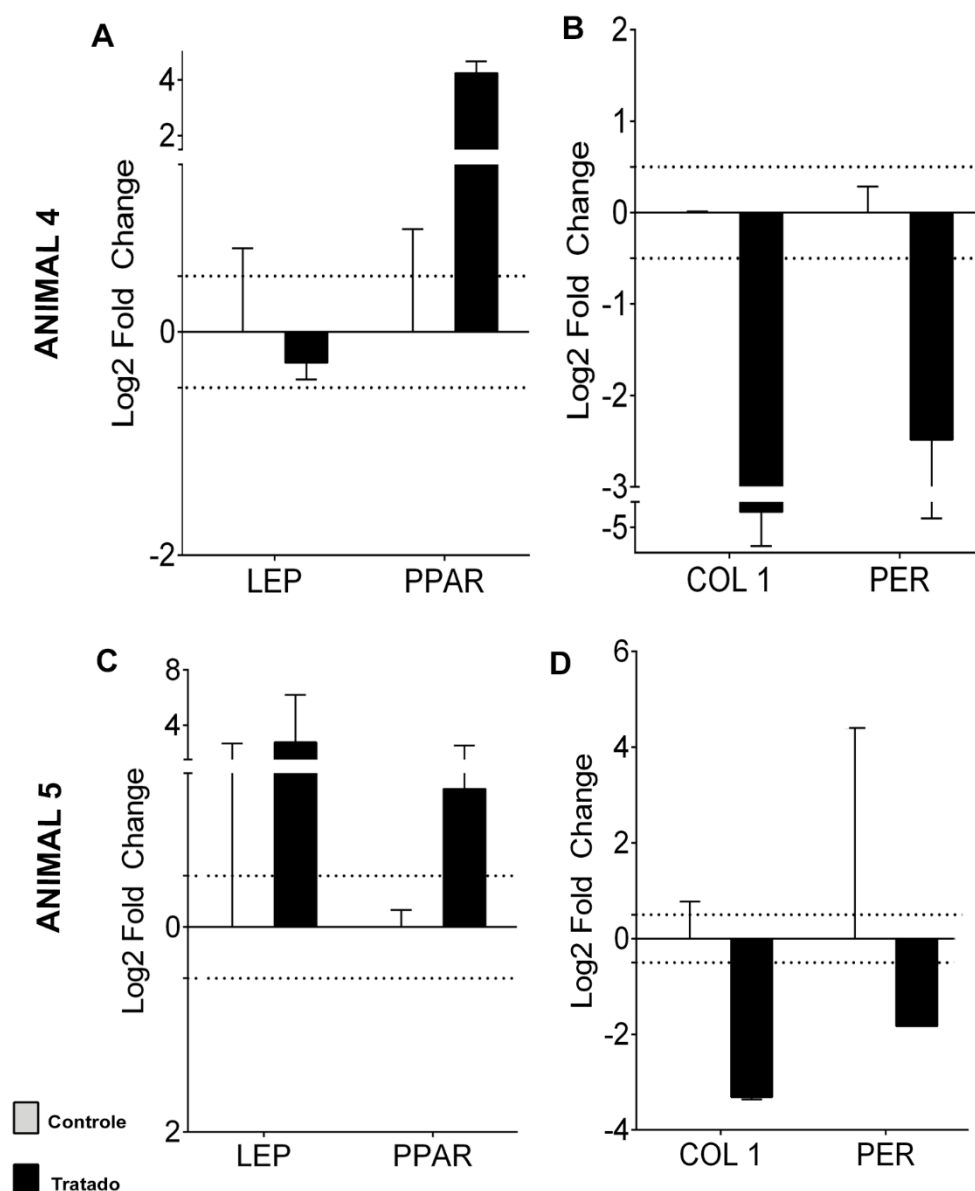


Figura 11 - Gráficos representativos da expressão gênica. Grupos de CTMs não induzidas à diferenciação (TA10 e TA20) foram adotados como controle, e induzidas como tratados (TA10a, TA10b, TA20a e TA20b). Genes da diferenciação adipogênica: Leptina (LEP) e PPAR- γ (PPAR), e da diferenciação osteogênica: Colágeno I (COL 1) e Periostina (PER).

07.8 Análise de ultraestrutura

Nas CTMs-dos grupos TA10 e TA20, observou-se núcleo eucromático, bem delimitado, com formato irregular, padrão de cromatina descondensada, presença de um ou dois nucléolos evidentes, e ocupando a maior parte do citoplasma. A membrana plasmática apresentou grande quantidade de protusões e prolongamentos, principalmente no grupo TA20 (Fig.12-C). Nas células do grupo TA10, observou-se a presença de material fibrilar eletrondenso no citoplasma, e depositado como matriz extracelular (MEC), similar ao colágeno (Fig.12-B). As células do grupo TA20 apresentaram também vacúolos na região periférica do citoplasma e abundância de RER, com algumas cisternas dilatadas (Fig.12-C e D). Os grupos MO10 e MO20 apresentaram núcleo

arredondado ou ovalado, eucromático e com formato regular. As amostras MO10 apresentaram poucas protusões na membrana plasmática em comparação as amostras do grupo MO20 (Fig.13). Mitocôndrias com formato alongado foram observadas principalmente no grupo MO20 (Fig.13C e D).

Os grupos TA10a e TA20a apresentaram diminuição nas protusões da membrana plasmática, formato arredondado, presença de mitocôndrias alongadas e eletrodensas no citoplasma e abundância de RE (Fig.14A). As amostras TA20a apresentaram maior quantidade de lipídeo citoplasmático comparado ao grupo TA10a (Fig.14A e B). Nos grupos TA10b e TA20b, foi evidente a presença de MEC de cálcio (Fig.14C e D), apresentado como material granular eletrodenso, presença de mitocôndrias de baixa eletrodensidade e muitas protusões na membrana plasmática, principalmente no grupo TA20b.

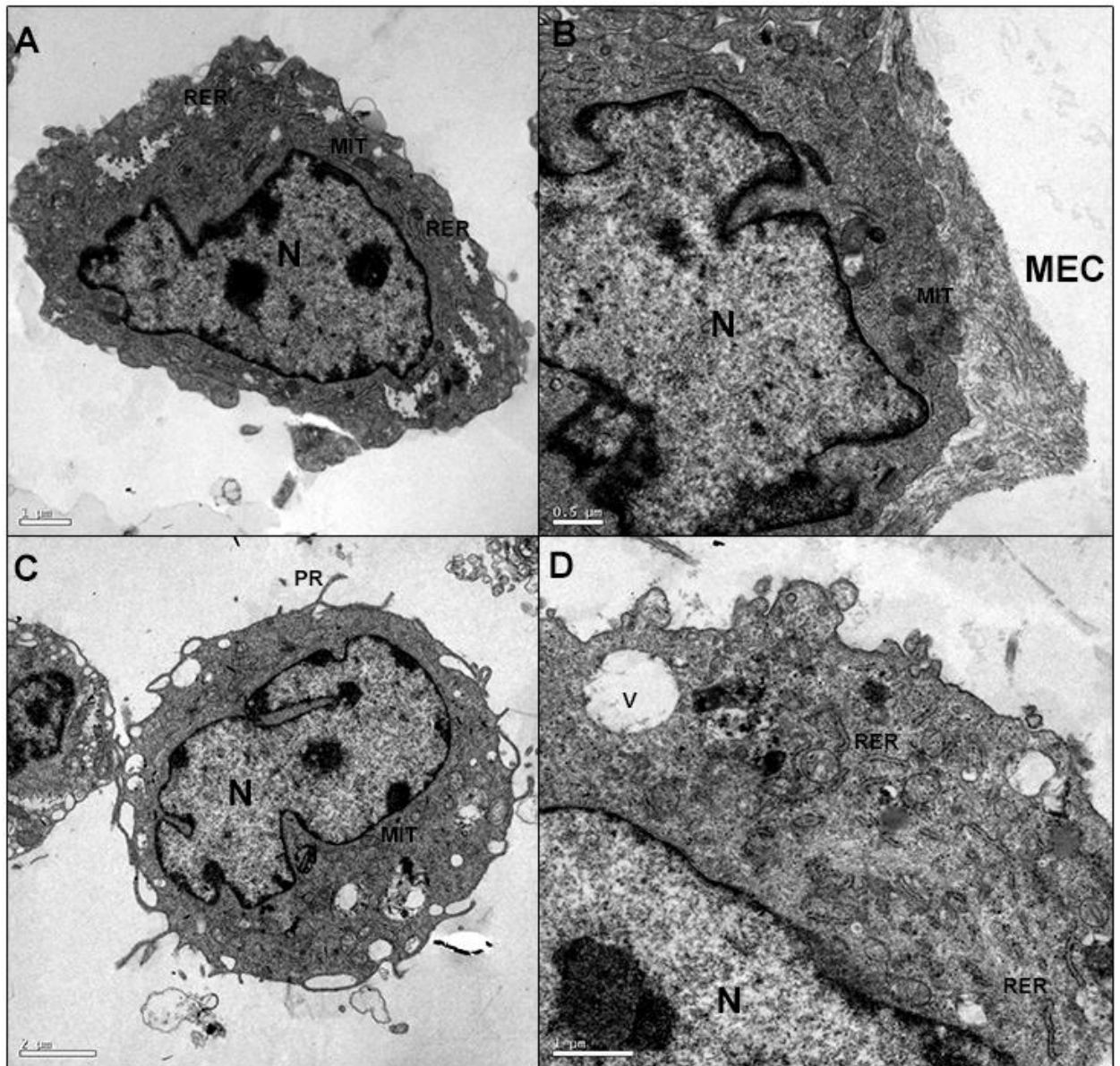


Figura 12 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10 e TA20. A: Grupo TA10 - núcleo irregular, abundância de RER. Barra de escala: 1µm. B: Grupo TA10 - produção de MEC. Barra de escala: 0,5µm. C: Grupo TA20 – Protusões da membrana plasmática, núcleo irregular. Barra de escala: 2µm. D: Grupo TA20 – Abundância de RER, vacúolos na periferia do citoplasma e completa ausência de MEC. Barra de escala: 1µm.

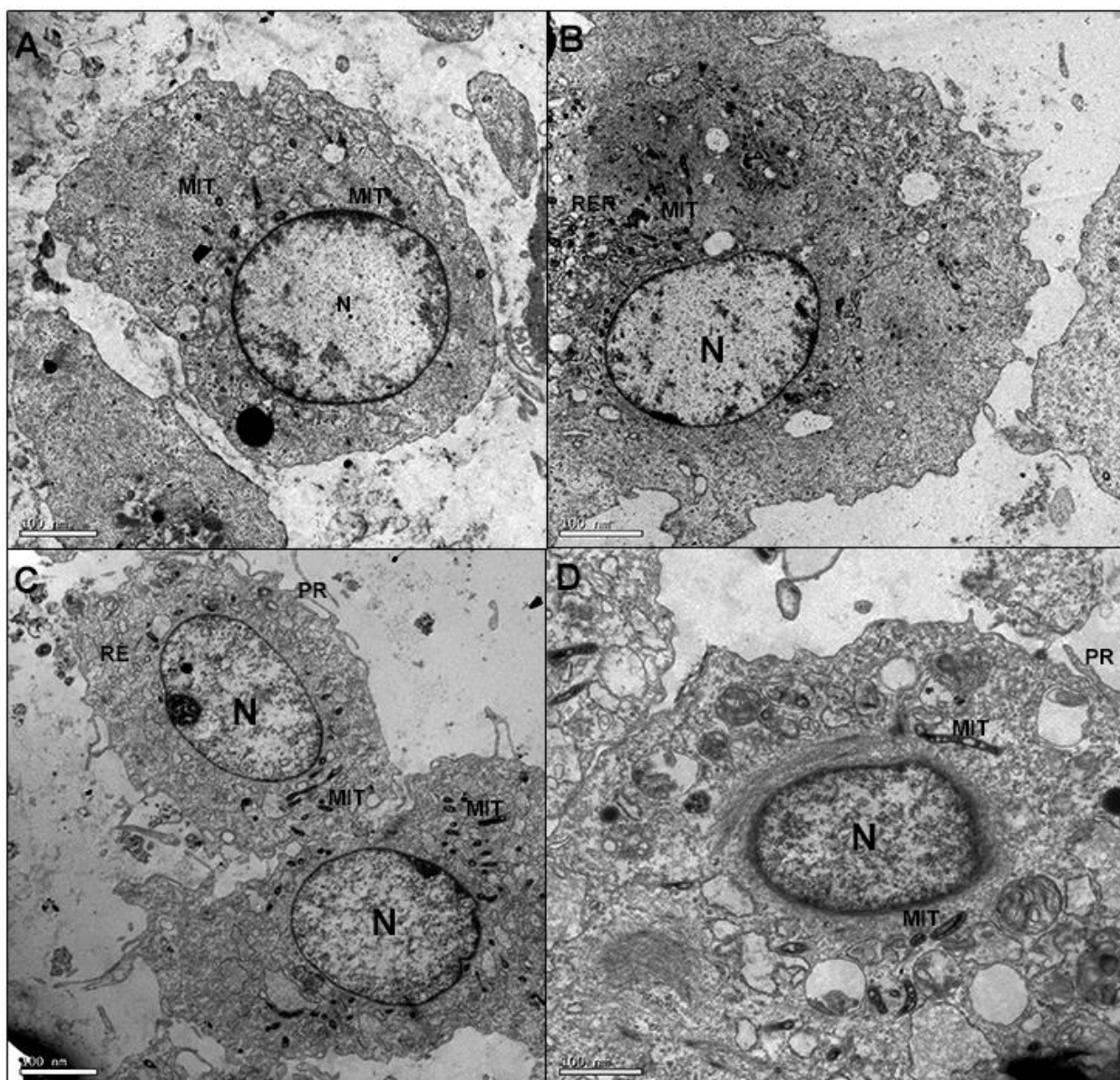


Figura 13 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos MO10 e MO20. A: Grupo MO10 - núcleo regular, poucas protusões na membrana plasmática. Barra de escala: 100µm. B: Grupo MO10 – Mitocôndrias eletrodensas, citoplasma com aspecto granuloso. Barra de escala: 100µm. C: Grupo MO20 – Protusões da membrana plasmática, núcleo regular, mitocôndrias alongadas e cisternas dilatadas do RE. Barra de escala: 100µm. D: Grupo MO20 – mitocôndrias alongadas. Barra de escala: 100µm.

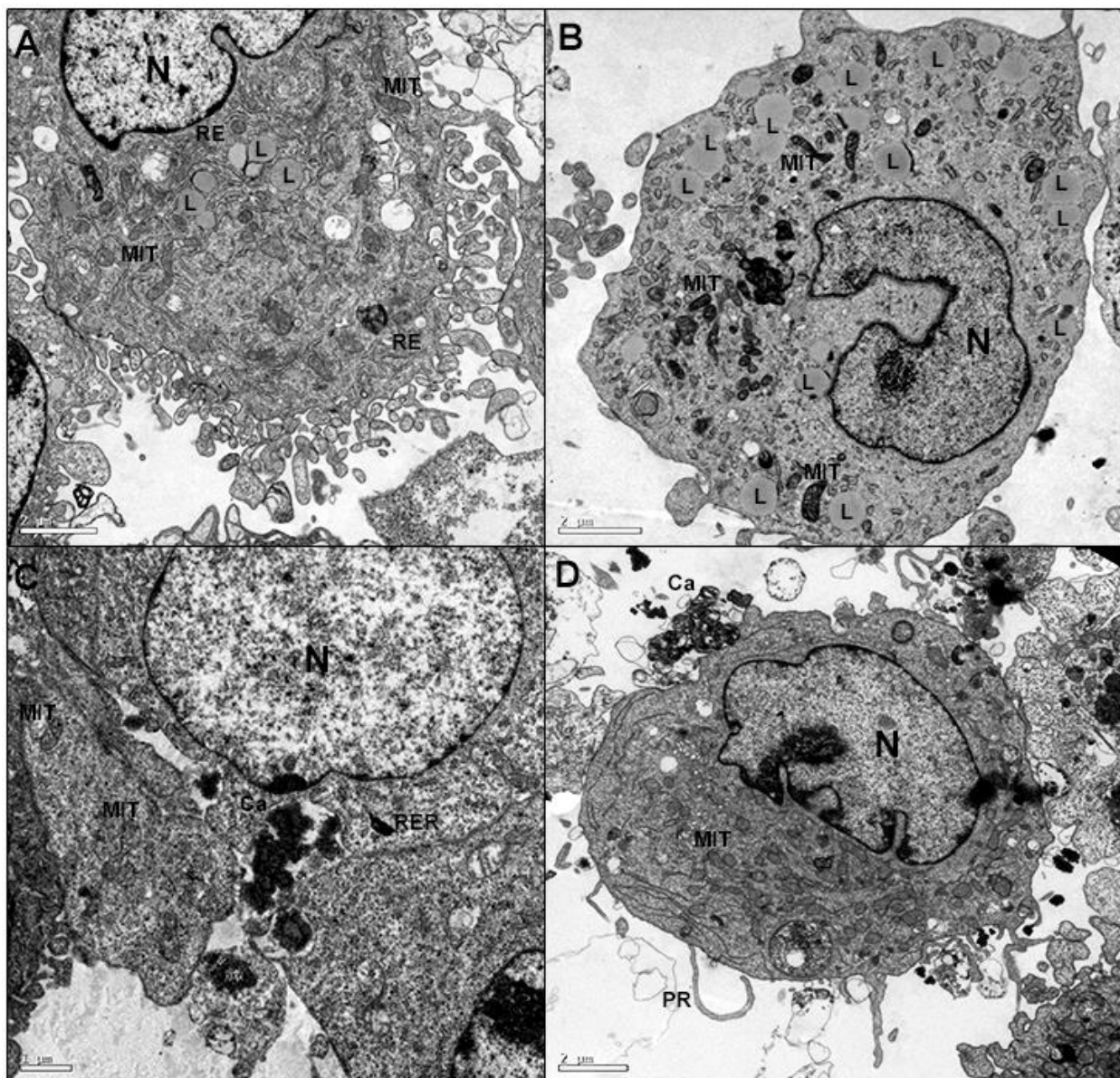


Figura 14 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10a, TA20a TA10b e TA20b. A: Grupo TA10a – Presença de gotículas de lipídeo no citoplasma e abundância de RE. Barra de escala: 2 μ m. **B:** Grupo TA20a – Mitocôndrias eletrodensas, abundância de gotículas de lipídeo no citoplasma. Barra de escala: 2 μ m. **C:** Grupo TA10b – Presença de Ca sendo secretado como MEC, citoplasma com aspecto granuloso. Barra de escala: 1 μ m. **D:** Grupo TA20b – Mitocôndrias de baixa eletrodensidade e formato alongado, deposição de Ca no citoplasma e sendo secretado como MEC.. Barra de escala: 2 μ m.

08. DISCUSSÃO

O tecido adiposo têm sido apontado como fonte viável e abundante de CTMs com alta proliferação *in vitro* e senescência tardia quando comparadas às CTMs derivadas de medula óssea.

Os resultados encontrados na análise de eficiência de formação de colônias apontaram maior eficiência das CTMs-TA quando comparadas às CTMs-MO. Esses dados corroboram o descrito por BARBERINI et al. (2014), que apontaram as CTMs-TA como superiores no potencial de proliferação *in vitro*, e reforçam os resultados descritos por WYLES et al. (2015), que apontaram maior potencial de proliferação e diferenciação osteogênica das CTMs-TA em relação às CTMs-MO. Existe, também, uma correlação entre a idade do animal e a eficiência de UFCF em CTMs-MO (STOLZING et al., 2008), fato que pode justificar a proliferação mais lenta das CTMs-MO e a variação indicada na análise de UFCF entre amostras do mesmo grupo, uma vez que os equinos estudados representam um lote de idade heterogênea.

As CTMs dos grupos TA20 e MO20 demonstraram proliferação superior quando comparadas às CTMs dos grupos TA10 e MO10. O SFB é um componente de grande importância no cultivo celular, pois carrega diversas moléculas, entre as quais fatores de crescimento que constituem o microambiente propício para a proliferação celular. Os resultados descritos na avaliação de UFCF confirmam a otimização do cultivo de CTMs-MO e CTMs-TA suplementadas com 20% de SFB. No entanto, para aplicação das CTMs *in vivo*, a utilização de SFB no cultivo é um fator de risco para o organismo receptor. Como componente xenogênico, o SFB pode carrear elementos infectantes ou causar resposta imunológica. A ocorrência de anticorpos específicos contra o SFB foi descrita em alguns indivíduos, segundo estudo realizado em humanos que receberam transplante de células-tronco hematopoiéticas (SUNDIN et al., 2007). CTMs cultivadas em meio suplementado com SFB também demonstraram proliferação *in vitro* mais lenta e diferenciação osteogênica menos eficiente em comparação a CTMs cultivadas em soro autólogo de ratos (ESLAMINEJAD et al., 2009). No cultivo de CTMs humanas, o lisado de plaquetas é uma alternativa que permite proliferação e manutenção das características das células *in vitro*, e é apontado como substituto do SFB no cultivo (BIEBACK et al., 2009), porém na terapia celular em Medicina Veterinária e em cultivo experimental, essa substituição ainda é inviável devido aos custos, assim como a utilização de produtos comerciais *serum-free*. Os resultados descritos até aqui confirmam a importância do SFB

para a proliferação celular, e sua concentração de 10% de SFB interferiu nas características celulares e levou a indução da diferenciação espontânea, menor proliferação e pior resposta a diferenciação induzida.

O SFB também pode ser um elemento facilitador da ocorrência da diferenciação osteogênica, por carrear moléculas de BMP, apontadas como atuantes nesse processo (KODAIRA et al., 2006), no entanto não foram observadas diferenças nas CTMs dos grupos TA10 e TA20 ou MO10 e MO20 coradas com *Alizarin Red*, de forma que as concentrações de SFB não causaram a ocorrência de diferenciação espontânea com produção de MEC de cálcio nas amostras analisadas. Todas as amostras induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica demonstraram alteração de fenótipo evidenciada por coloração e por análise em microscópio eletrônico. Adicionalmente, as CTMs do grupo TA20 foram induzidas a diferenciação condrogênica para completar os pré-requisitos estabelecidos para caracterização de CTMs. A avaliação citológica por coloração de Azul de Toluidin e HE evidenciaram a presença de matriz de proteoglicanos, confirmando a diferenciação condrogênica, porém as amostras condrogênicas submetidas a análise ultraestrutural apresentaram muitos sinais de degeneração, como citoplasma granuloso, núcleo com membrana dilatada, muitos vacuolos no citoplasma e organelas desorganizadas.

A avaliação ultraestrutural dos grupos não induzidos a diferenciação (TA10 e TA20) demonstrou características típicas das CTMs em estado indiferenciado, entre elas o núcleo grande, ocupando a maior parte do citoplasma e com padrão de cromatina descondensada. As inúmeras protusões verificadas especialmente no grupo TA20 estão relacionadas à adesão celular, também verificada na análise imunofenotípica pela alta expressão de proteínas relacionadas à dinâmica do citoesqueleto. Estas protusões também foram identificadas por microscopia eletrônica por PASCUCCI et al. (2010), que as indicaram como responsáveis pela adesão e também pela ligação célula-célula, o que permite que se forme monocamada no cultivo aderido *in vitro*. No grupo TA10 foi observada a deposição de MEC, característica não esperada nas CTMs indiferenciadas e que está relacionada à concentração de SFB de 10% no meio de cultivo. Outras investigações que envolvam a caracterização da MEC apresentada são pertinentes para refutar protocolos de cultivo que utilizem a concentração de 10% de SFB, uma vez que nos grupos controle (TA10) da análise citológica não foi observada nenhuma alteração que sugerisse produção de MEC. As CTMs dos grupos MO10 e MO20 apresentaram características semelhantes entre si, sendo o grupo MO20 a apresentar maior quantidade

de protusões de membrana, vacúolos e endossomos, sugerindo alta atividade celular. A capacidade de alterar o microambiente das CTMs está diretamente ligada a liberação de fatores de crescimento que modulam as demais células do tecido, induzindo-as a renovação e diferenciação, e esta atividade só é possível devido a liberação de microvesículas e exossomos (AGGARWAL; PITTENGER, 2009; RATAJCZAK et al., 2006), características observadas na presente análise ultraestrutural.

Nos grupos induzidos a diferenciação adipogênica (TA10a e TA20a) foi evidenciado acúmulo de vesículas com lipídeo no citoplasma, característica também demonstrada pela análise citológica com coloração de *Oil Red*. As CTMs do grupo TA20 apresentaram, tanto na análise citológica quanto na ultraestrutural, maior quantidade de vesículas com lipídeo no citoplasma, o que aponta que a concentração de 20% de SFB pode favorecer a diferenciação adipogênica *in vitro*. No grupo induzido à diferenciação osteogênica (TA10b e TA20b), observou-se deposição de MEC de cálcio evidenciada pela análise citológica com coloração de *Alizarin Red* e confirmada pela análise ultraestrutural, onde observou-se material eletrodenso com aspecto granular em vesículas no citoplasma e depositado como MEC, semelhante ao que foi demonstrado em pré-osteócitos por PALUMBO et al. (1990). Em diversas amostras (Fig 13D, 14A) foi observada a presença de mitocôndrias no formato alongado, o que estaria ligado ao processo de diferenciação, conforme resultados de experimento descrito por FORNI et al. (2015), que apontaram a dinâmica de fusão das mitocôndrias como processo inerente a diferenciação celular e, quando suprimido, as células perderiam a capacidade de se diferenciar.

Além dos resultados positivos da diferenciação *in vitro*, a caracterização imunofenotípica das CTMs-TA é requerida entre os critérios mínimos para definição de CTMs multipotentes, que são, entre outros, expressão do marcador CD90 e baixa expressão de CD34 (DOMINICI et al., 2006). Adicionalmente, foram avaliados os marcadores positivos CD29, CD44, considerados importantes por serem relatados com frequência em cultivos de CTMs (PITTENGER et al., 1999; DE SCHAUWER et al., 2011), e vimentina, marcador de células mesenquimais, além do marcador negativo MHC-II, relacionado à histocompatibilidade. A expressão de MHC-II de 21,16% ($\pm 13,22\%$) descrita neste trabalho pode estar relacionada ao fato das CTMs terem sido analisadas em segunda passagem, momento em que a cultura pode apresentar células epiteliais remanescentes do isolamento. Para futuras aplicações, é recomendável que seja realizada nova análise da expressão de MHC-II nas passagens seguintes. No entanto, o

conjunto de dados obtidos na caracterização das CTMs-TA somada à euploidia dos cromossomos indicam viabilidade de manutenção destas células em banco para posterior aplicação *in vivo* em Medicina Veterinária. Resultados semelhantes ao perfil imunofenotípico descrito neste trabalho foram reportadas em CTMs de equinos por BARBERINI et al. (2014), CARVALHO et al. (2009), DE SCHAUWER et al. (2012) e por MAIA et al. (2013).

09. CONCLUSÕES

- Durante o processo de diferenciação induzido nas linhagens adipogênica e osteogênica, as CTMs-TA e MO apresentam modificações morfológicas e fisiológicas; adquirem características semelhantes aos pré-adipócitos e osteoblastos, e o mesmo não ocorre quando as CTMs não recebem o meio indutor da diferenciação.

- A concentração de 10% de SFB no meio de cultivo pode favorecer a ocorrência de diferenciação espontânea das CTMs-TA em linhagem de células que produzem matriz extracelular fibrosa, conforme demonstrado pela análise ultraestrutural.

- A concentração de 20% de SFB no meio de cultivo favorece a proliferação celular das CTMs-TA e MO, e é mais indicado para otimização de culturas celulares em comparação ao meio suplementado com 10% SFB.

- Os protocolos empregados no isolamento, cultivo e caracterização de CTMs-TA foram eficientes e possibilitaram a formação de um banco de células viáveis para aplicação *in vivo*, porém é recomendável a realização de monitoramento da expressão de MHC-II na próxima passagem das células criopreservadas, com a finalidade de minimizar o risco de resposta imunológica do organismo receptor.

10. PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSO ORIGINADAS DESTE TRABALHO

1. GALHARDO, E.C. et al. Isolation and characterization of Stem Cell from Equine adipose tissue. In: XVI Workshop de Genética, 2016 – Botucatu, Anais do Workshop de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, abril de 2016.
2. GALHARDO, E.C. et al. Comparative study of self-renewal capacity of Stem Cell from equine bone marrow cultured in 10 and 20% fetal bovine serum. In: XVI Workshop de Genética, 2016 – Botucatu, Anais do Workshop de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, abril de 2016. Premiação de segundo lugar na categoria apresentação oral.
3. GALHARDO, E.C. et al. Comparação ultra estrutural de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo e medula óssea equina antes e após diferenciação adipogênica. In: XVII Conferência Anual ABRAVEQ, 2016 – Campos do Jordão-SP, abril de 2016.
4. GALHARDO, E.C. et al. Ultra-estrutura de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo equino e cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino. In: XVII Conferência Anual ABRAVEQ, 2016 – Campos do Jordão-SP, abril de 2016.
5. GALHARDO, E.C. et al. Mesenchymal Stem Cell isolation from equine bone marrow. In: IX Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu-SP, maio de 2016.
6. GALHARDO, E.C. et al. Comparação ultra-estrutural da diferenciação adipogênica induzida de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e medula óssea equina. In: XXX Encontro anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE, 2016 – Foz do Iguaçu-PR, agosto de 2016.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Transplantation**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2009.

ALFARO, L. A. S. et al. CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration. **Stem Cells**, v. 29, n. 12, p. 2030–2041, 2011.

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

BARBERINI, D. J. et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem cell research & therapy**, v. 5, p. 25, 2014.

BIEBACK, K. et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2331–2341, 2009.

BLACK, L. L. et al. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints : **A Randomized , Double-Blinded , Multicenter , Controlled Trial ***. v. 8, n. 4, p. 272–284, 2007.

BOSNAKOVSKI, Darko et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell and tissue research**, v. 319, n. 2, p. 243-253, 2005.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A; CASTEILLA, L.; et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–8, 2013.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25–35, 2009.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–84, 2006.

CARREIRA, A. C. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, n. November 2014, p. 64–73, 2014.

CHAMBERLAIN, Giselle et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005–1011, 2001.

CHEN, L.; TREDGET, E. E.; WU, P. Y. G.; WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008.

CHEN, Y.; SHAO, J.-Z.; XIANG, L.-X.; DONG, X.-J.; ZHANG, G.-R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 5, p. 815–20, 2008b.

CHENG, K. et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 3, p. 466–473, 2013.

CHENG, Su-Li et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 277–286, 1994.

COLOSIMO, Alessia et al. Prolonged in vitro expansion partially affects phenotypic features and osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, n. 8, p. 930–950, 2013.

COSGROVE, D. et al. Mice lacking MHC class II molecules. **Cell**, v. 66, p. 1051–1066, 1991.

CROVACE, A. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. **Veterinary medicine international**, v. 2010, p. 250978, 2010.

DE MATTOS CARVALHO, A. et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2–4, p. 303–306, 2009.

DE SCHAUWER, C. et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 81 A, n. 4, p. 312–323, 2012.

DE SCHAUWER, C. et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431–1443, 2011.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, 2006.

ERICKSON, G. R. et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, p. 763–769, 2002.

ESLAMINEJAD, M. B. et al. Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. **Cell Biology International**, v. 33, n. 5, p. 607–616, 2009.

FAN, Z. et al. The arginine methyltransferase PRMT5 regulates CIITA-dependent MHC II transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 5, p. 687–696, 2016.

FERNYHOUGH, M. E.; BUCCI, L. R.; HAUSMAN, G. J.; et al. Gaining a solid grip on adipogenesis. **Tissue & cell**, v. 37, n. 4, p. 335–8, 2005.

FERNYHOUGH, M. E.; OKINE, E.; HAUSMAN, G.; VIERCK, J. L.; DODSON, M. V. PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 367–78, 2007.

FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, p. 1528–1530, 1998.

FERRIS, R. A; FRISBIE, D. D.; MCCUE, P. M. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 36–42, 2014.

FORNI, M. F. et al. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. **Stem Cells**, p. 743–755, 2015.

GADE, N. E.; PRATHEESH, M. D.; NATH, A; et al. Molecular and cellular characterization of buffalo bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, v. 48, n. 3, p. 358–67, 2013a.

GUILAK, F. et al. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 2009.

HORWITZ, E. M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 309–313, 1999.

HWA CHO, Hyun; BAE, Yong Chan; JUNG, Jin Sup. Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. **Stem cells**, v. 24, n. 12, p. 2744-2752, 2006.

HWANG, Nathaniel S. et al. Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 284-291, 2006.

KAWAGUCHI, Nobuko et al. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating $\beta 1$ integrin function. **J Cell Sci**, v. 116, n. 19, p. 3893-3904, 2003.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 5, p. 1294–301, maio 2006.

KIM, Eung-Kyun et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 4, p. 1680-1687, 2012.

KODAIRA, K. et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1224–1231, 2006.

KODAIRA, K. et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1224–1231, 2006.

KOKAI, L. E.; MARRA, K.; RUBIN, J. P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 163, n. 4, p. 399–408, 2014.

KUMAR, A. et al. Multiple roles of CD90 in cancer. **Tumor Biology**, 2016.

LETTRY, V. et al. Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 1, p. 5–15, 2010.

LIM, Chae-Young et al. Evaluation of autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells on renal regeneration after experimentally induced acute kidney injury in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 208-217, 2016.

LIU, G. et al. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2655–2664, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOVATI, A. B. et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 2, p. 103–121, 2011.

MACKENSEN, A et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 49, p. 152–156, 2000.

MAIA, L. et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 6, p. 618–24, jun. 2013.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, nor Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium. p. 1603–1609, 2007.

MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. S36–S40, 2001.

MAUMUS, M.; GUÉRIT, D.; TOUPET, K.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. **Stem cell research & therapy**, v. 2, n. 2, p. 14, 2011.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; et al. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. **BMC veterinary research**, v. 7, p. 42, 2011.

MUELLER, S. M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of cellular biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 583–90, jan. 2001.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J.; HAM, S. M. VAN; KNIPPENBERG, M.; et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v. 8, n. 2, p. 166–77, 2006.

PALUMBO, C. et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. **Acta anatomica**, v. 137, n. 4, p. 350–358, 1990.

PASCUCCI, L. et al. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1277–1285, 2010.

PEREIRA, Lygia da Veiga. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, n. 1, p. 07-14, 2008.

PHAM, P. V et al. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 209, 2011.

PHINNEY, Donald G.; PROCKOP, Darwin J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.

PITTENGER, Mark F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLCHOW, B. et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 98, jan. 2012.

RATAJCZAK, J. et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 20, n. 9, p. 1487–95, 2006.

ROCCA, G. LA; ANZALONE, R.; CORRAO, S.; et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. **Histochemistry and cell biology**, v. 131, n. 2, p. 267–82, 2009.

SAALBACH, A. et al. Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin alphavbeta3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4710–4720, 2005.

SCHMITT-GRÄFF, A; DESMOULIÈRE, A; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 425, n. 1, p. 3–24, 1994.

SIEMERINK, M. J. et al. CD34 Promotes Pathological Epi-Retinal Neovascularization in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. e0157902, 2016.

SILVA, G. V. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. **Circulation**, v. 111, p. 150–156, 2005.

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, n. 6, p. 408–16, 2013.

SMITH, R. K. W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99–102, 2010.

SMITH, R. K. W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal

stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99–102, 2010.

STOLZING, A. et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 163–173, 2008.

STOLZING, A. et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 163–173, 2008.

SUNDIN, M. et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **Haematologica**, v. 92, n. 9, p. 1208–1215, 2007.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. The Veterinary clinics of North America. **Equine practice**, v. 27, n. 2, p. 263–74, 2011.

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European journal of immunology**, v. 36, n. 10, p. 2566–2573, 2006.

VIOLINI, S. et al. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC cell biology**, v. 10, p. 29, jan. 2009.

WILLIAMS, K. et al. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 238, p. 324–38, 2013.

WODEWOTZKY, T. I. CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR: Suporte didático para o Ensino Fundamental e Médio, 2008. Universidade Estadual Paulista.

WYLES, C. C. et al. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Are Phenotypically Superior for Regeneration in the Setting of Osteonecrosis of the Femoral Head. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 10, p. 3080–3090, 2015.

YADAV, P. S.; MANN, A.; SINGH, J.; et al. Buffalo (*Bubalus bubalis*) Fetal Skin Derived Fibroblast Cells Exhibit Characteristics of Stem Cells. **Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 175–182, 2012.

YU, S.; MATSUSUE, K.; KASHIREDDY, P.; et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 1, p. 498–505, 2003.

ZHAO, J. et al. Uterine Infusion With Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Endometrium Thickness in a Rat Model of Thin Endometrium. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 2, p. 181–188, 2015.

ZHENG, W.; JIANG, C.; LI, R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2317–2327, 2016.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □. v. 13, n. December, p. 4279–4295, 2002.

ZUK, P. A.; PH, D.; ZHU, M. I. N.; et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. , v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.

12. ARTIGO CIENTÍFICO – Manuscrito

ISOLATION, IMMUNOPHENOTYPIC AND ULTRASTRUCTURAL CHARACTERIZATION OF STEM CELL FROM EQUINE ADIPOSE TISSUE

Abstract

Mesenchymal stem cells (mSCs) are derived from adult tissues and presents high plasticity, immunomodulatory regulation and potential to migrate and differentiate into mesodermal lineages *in vivo*. Adipose tissue has been pointed as an efficient source of mSC which presents high proliferation *in vitro* and great potential to be applied in regenerative medicine. This study aimed to isolate adipose derived-stem cells (ASCs) and analyze immunophenotypic markers of stemness by flow citometry and *in vitro* differentiation by specific staining and ultrastructure. Results showed osteogenic differentiation with calcium extracellular matrix, adipogenic differentiation with citoplasmatic lipid production, and high cell activity with multiple protrusions, typical of cell adhesion in undifferentiated ASCs.

Introduction

Mesenchymal stem cells (mSCs) has demonstrated new perspectives for studies in cell therapy, tissue recovery and engineering. In Veterinary Medicine, mSCs are pointed as potential treatment for osteoarthritis and ischaemia in dogs (1,2). Equine mSC has been successfully applied in treatment of tendon injury (3,4) and endometritis in mares (5). Moreover, endometrial injection of mSCs in mares and intrathecal autologous transplantation of mSCs in horses were demonstrated to be feasible and safe procedures (6,7), showing new perspectives for treatment of reproductive and neurological disorders. In addition, were described ovarian function recovery by mSCs administration (8) and up-regulation of mSCs multilineage differentiation and immunomodulation capacity by the presence of pro-inflammatory cytokines in inflammatory, degenerative and autoimmune disorders (9).

In vivo application of mSCs demonstrated that these cells are able to migrate to damage tissue sites and start regenerative processes. In addition, mSCs produces and discharges cytokines which regulates tissue microenviroment, acting in inflamatory process and contributing to regeneration more than the mSCs plasticity (10). Studies about conditioned medium demonstrated the action of cytokines in inflammatory regulation *in vivo*. Paracrine action of mSCs was demonstrated by conditioned medium applied to reduce myocardial infart size *in vivo* (11,12) and protect renal cells from induced cytotoxicity (13). Microvesicles released by mSCs in conditioned medium were identified as fundamental during inflammatory response (14), and techniques involving conditioned medium application *in vivo* may promote neuroprotective and immunomodulatory effect and suggest promising advances in stem cell therapy (15).

Multiple sources of mSC have been described, as umbilical cord (16), amniotic fluid (17), gingiva and periodontal ligment (18), and bone marrow, which was the first described source of mSCs (PITTENGER et al., 1999). Among the main sources, adipose tissue (AT) has been pointed as a viable and abundant option to obtain mSCs with higher proliferation *in vitro* compared to bone marrow and umbilical cord (20,21).

Several descriptions of methods to isolate mSCs led the International Society of Cellular Therapy to propose minimal criteria to define human mSCs, as plastic adherence *in vitro*, differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts when maintained under specific stimuli, and negative or positive expression of specific markers identified as Cluster Differentiation (CD). Positive expression of CD105, CD73, CD90 and lack expression of CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a or CD19 are required for human mSCs characterization (22). The positive markers required are related to adhesion, surface enzymes and extracellular matrix, respectively (SALGADO et al., 2010) and negative markers related to leucocytes, epithelial cells and hematopoietic progenitors, monocytes, macrophages, and B cells (24).

In this study, ASCs were isolated, cultured, characterized by investigation of markers CD34, CD44, CD29 and Vimentin, induced to *in vitro* differentiation into adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages and submitted to ultrastructural and cytogenetic analysis, in order to demonstrate the viability to maintain ASCs in a cell bank for allogeneic therapy and morphological changes during differentiation *in vitro*.

Material and Methods

Animals

Five horses (*Equus caballus*) of both genders aged 9-15 years were selected. Experimental protocol (nº 158 - CEUA) were approved by Ethics and Welfare Committee of Institute of Biosciences of Sao Paulo State University – Botucatu, Brazil.

AT collect and ASC isolation

Subcutaneous AT was collected from near the dorsal gluteal muscle below tail. Animals were sedated with 0,5 mg kg⁻¹ xilazin (Sedomin®, Köning, ARG), followed by local anesthetic block with 10mL 2% lidocaine (Cristalia, Brazil). A portion of AT were collected and stromal vascular fraction was isolated by collagenase (Sigma-Aldrich, USA) digestion in a concentration of 0.04% for 30 minutes at 37°C, vortexing every 10 minutes. After digestion, samples were filtered in 70µm (BD - USA), proportion of 1:1 of culture medium was added for washing and centrifuged for 10 minutes. Pellet was resuspended, proceeding plating in 25cm² culture flask. Cells were cultured during two passages, in maintenance culture medium containing DMEM high glucose, 20% FBS, 1% amphotericin, 1.2% penicillin/streptomycin (Life Technologies/Gibco).

Cytogenetic analysis

Cytogenetic analysis was performed at second passage, using methotrexate (MTX)/Thymidine (Tdi) to synchronization of cell division cycle. Cells were resuspended by trypsin (TrypLE™ Express – Invitrogen®, EUA) and incubated at 37°C for 3 minutes, fixed and stained in 5% Giemsa. Twelve metaphases were analysed for sample, by light microscopy.

Immunophenotypic assay

Immunophenotypic characterization was performed by flow cytometry at second passage. Positive markers were investigated using antibodies mouse anti-bovine CD29:AF (BioLegend, USA), mouse anti-rat CD90, (AbD Serotec, UK), mouse anti-bovine CD44 (AbD Serotec, UK), and mouse anti-vimentin: FITC (Creative Biomart, USA); and negative markers: mouse anti-horse MHC-II:FITC (AbD Serotec, UK), mouse anti-dog CD34 (AbD Serotec, UK). Two hundred thousand cells were counted for each antibody, and 10.000 events recorded during analysis.

Statistical Analysis

Results of cell markers expression were first summarized in a table by means, standard deviation, minimum, median and maximum for each treatment. The analysis and interpretation of the results were shown in the boxplot.

Differentiation assays

Cells were plated in 24-well plates at 10⁴/well density, maintained in DMEM culture medium until reach about 50% confluence, when specific media for osteogenic and adipogenic differentiation (STEMPRO, Gibco, USA) were added. Additional culture with maintenance medium were performed as control group. Nine days after induction, positive osteogenic differentiation was confirmed by Alizarin Red S staining (Sigma-Aldrich, USA), to demonstrate calcium extracellular matrix deposition. Adipogenic differentiation was confirmed by Oil Red O staining (Sigma-Aldrich, USA), which evidenced cytoplasmic lipid droplets. Chondrogenic differentiation was conducted in 1mL microtubes, in order to provide a three-dimensional culture condition (HWANG et al., 2006; RADA; REIS; GOMES, 2011; CARDOSO et al., 2012;). Cell pellet was maintained in specific medium for chondrogenic differentiation (STEMPRO, Gibco, USA) during 12 days, with changes each three days, and differentiation was confirmed

by hematoxylin/eosin and Toluidin Blue (pH=1) staining. All groups were observed by inverted light microscopy (DM IRB, Leica Microsystems, Germany).

Ultrastructural analysis

Isolated cells were maintained in standard culture conditions about 20 days (second passage) and ultrastructural analysis was performed after differentiation assay. Cells were resuspended by trypsin and fixed in Karnovisk solution 9H=7.4) for at least 24h. Pellet was submitted to post-fixation in 1% osmium tetroxide after washing. Dehydration was performed by 30, 50, 70, 90 and 100% acetone and polimerization was proceeded in Araldite 502 for 72h at 60°C. Ultra thin sections were obtained with diamond knife and stained in uranyl acetate and lead citrate. Analysis were carried out by transmission electronic microscope (Phillips CM100).

RESULTS

Isolated cells presented plastic adherence and fibroblastoid morphology after 48 hours, and 80% confluence about 10 days after plated. At first passage, cells showed faster growth and reached 80% confluence about 5-6 days. Immunophenotypic analysis performed at second passage showed high expression of positive markers CD29 (=99,46% $\pm$ 0,747%), CD90 (=99,28% $\pm$ 0,722%), CD44 (=97,82% $\pm$ 2,24%) and Vimentin (=96,12% $\pm$ 1,92%); lack of expression of MHC-II (=21,16% $\pm$ 13,22%) and CD34 (=6,98% $\pm$ 8,56%) (Fig.1A). Cytogenetic analysis demonstrated chromosomal euploidy for *Equus caballus* (2n=64) in all samples (Fig.1B). Discrete morphology changes were observed in adipogenic differentiation about 3 days after induction with specific medium, when cells presented slight increase in cytoplasmic size. Lipid droplets were observed into the cytoplasm stained with Oil Red, confirming adipogenic differentiation (Fig.1C). Induced differentiation into osteogenic lineage was noted about 3-4 days in inductor medium, when cells begun to present polygonal morphology. Extracellular matrix of calcium was observed stained by Alizarin Red at ninth day after inicial exposure to inductor medium (Fig 1E). Chondrogenic differentiation was confirmed by deposition of extracellular hyaline matrix containing proteoglycans and collagen stained by HE and toluidin blue, which revealed presence of proteoglycans stained in light pink (Fig.1G, 1H).

Ultrastructural analysis demonstrated in not-induced to differentiation cells several protrusions in plasmatic membrane, rough endoplasmic reticulum (RER) with dilated cisternae, rounded (Fig.2A) and elongated (Fig.2B) mitochondria, vacuoles in the periphery of cytoplasm. Undifferentiated cells also presented large nucleus, occupying most of the cytoplasm area and decondensed chromatin pattern. Osteogenic differentiated cells presented nucleous with irregular shape and several protrusions in plasmatic membrane (Fig.3A). The mitochondria presented rounded and elongated shape and low eletrodensity. Developed endoplasmic reticulum and deposits of extracellular matrix of calcium were also observed (Fig.3A and 3B). Chondrogenic differentiation presentes few collagen fibers and multiple degeneration signals (Fig.4A), as granular aspect on cytoplasm, dilated nuclear membrane, several vacuoles and disorganized organelles. Adipogenic differentiated cells presented reduction of emitted protrusions, abundance og endoplasmic reticulum, small mitochondria and several cytoplasmic lipid droplets (Fig. 4B).

DISCUSSION

Adipose tissue-derived mSCs (ASCs) have demonstrated great potential in treatment of several illness, as inflammatory bowel disease in dogs (28) and kidney acute schemia-reperfusion injury (29), providing new possibilities for cell therapy. Among main advantages of ASCs, high *in vitro* proliferation and lower immunogenicity are characteristics which make ASCs eligible for *in vivo* application. Furthermore, AT harvesting may be performed during elective surgeries and isolated ASCs applied for allogeneic transplantation. The present study found morphological characteristics and changes which confirms high cell activity and differentiation of ASCs. Protrusions in plasmatic membrane observed by ultrastructure analysis in not differentiated ASCs, decondensed chromatin and abundant RER corroborates previous results described by MAIA et al. (2013) and confirms the capacity of ASCs to interact with microenviroment, releasing and absorbing large amount of extracellular elements. Paracrine factor, the ability to change the microenvironment of ASCs is directly linked to release of growth factors that modulate other tissue cells, inducing the renewal and differentiation, and this activity is made possible by the release of microvesicles and exosomes, which were observed in this study.

Cell differentiation is a process mediated by chemical agents in induction medium and also by mechanical interaction between cell and microenvironment (31). Therefore, anchorage and spreading are important characteristics which allows mSCs to start proliferation and differentiation process. Ultrastructural analysis demonstrated cell protrusions in several observed groups, except for chondrogenic differentiation, which was cultivated in a pellet.

The numerous protrusions observed are related to cell adhesion, also seen in the immunophenotypic analysis by high expression of proteins related to cytoskeleton dynamics. These protrusions were previously described in ASCs (32), and pointed as responsible for cell adherence and also by cell-cell interaction, which allows cells to present a *in vitro* monolayer.

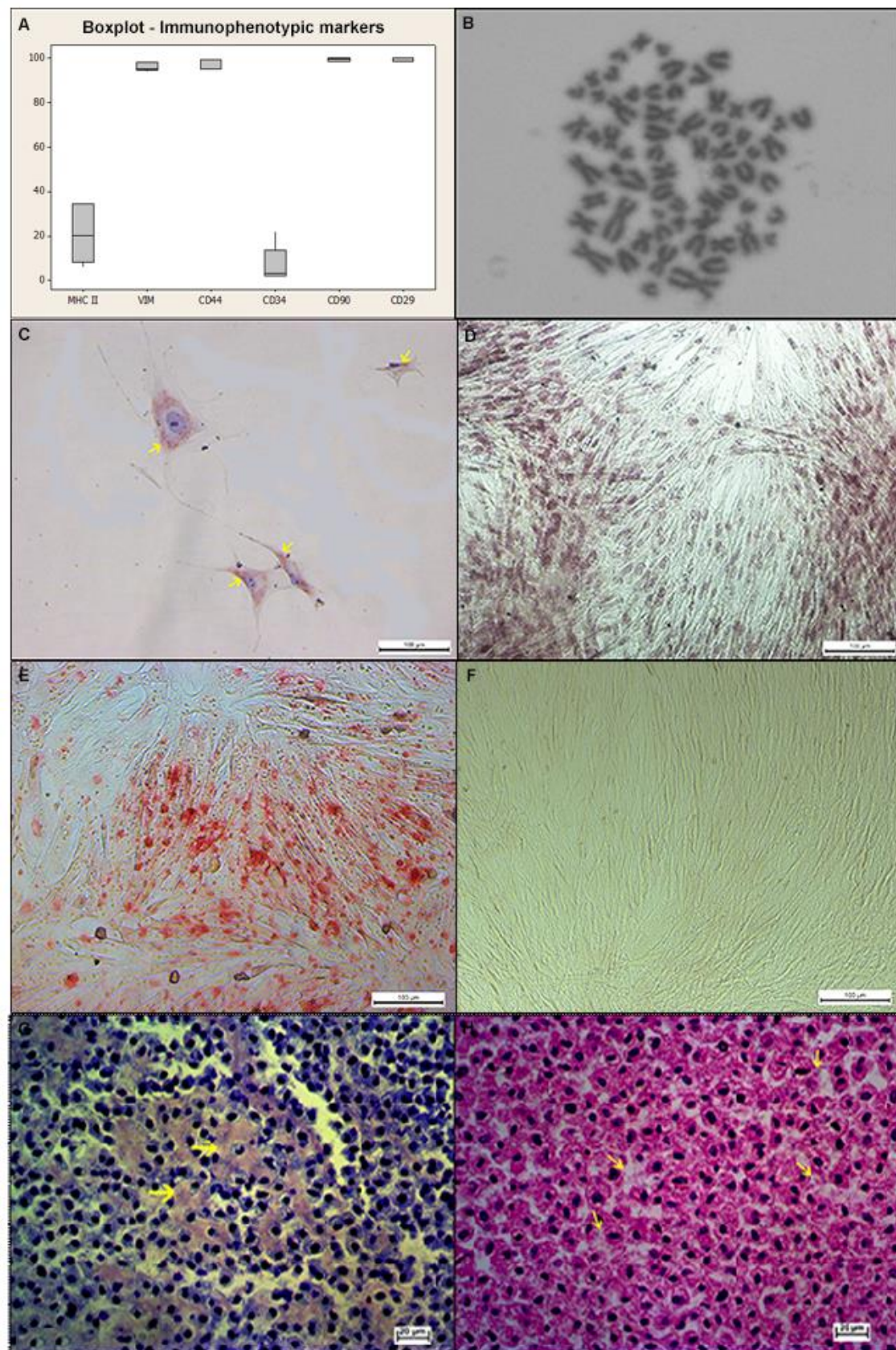


Figure 15 – A: Boxplot: expression of stemness markers. High expression of Vimentin, CD44, CD90 and CD29. B: Chromosomal euploidy (2n=64) for *E. caballus*. C: Adipogenic differentiation confirmed by evidence of lipid droplets stained by Oil Red. D: Control group of adipogenic differentiation: no apparent lipid storage observed. E: Osteogenic differentiation: extracellular matrix stained by Alizarin Red. F: Control group of osteogenic: absence of EM. G: Chondrogenic induced differentiation: hyaline matrix stained in light pink by Toluidin Blue. H: Hyaline matrix stained by HE.

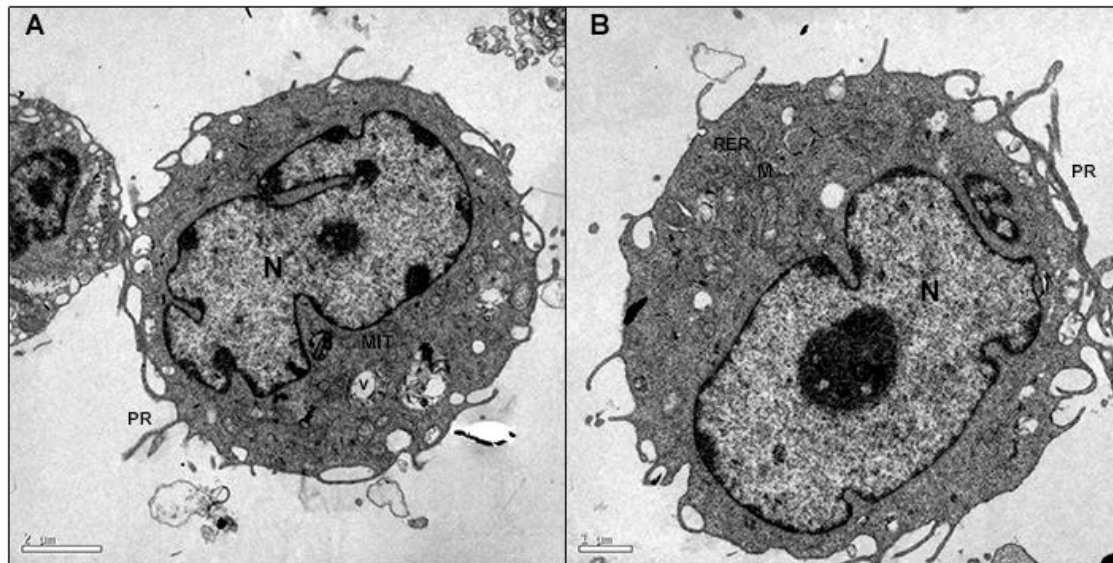


Figure 2 - ASCs not induced to differentiation (control group). Several protrusions (PR) on plasmatic membrane, Irregular nucleus and chromatin decondensed. Rounded shape mitochondria (A) and some presented elongated shape (B). Scale bar = A- 2 μ m, B- 1 μ m.

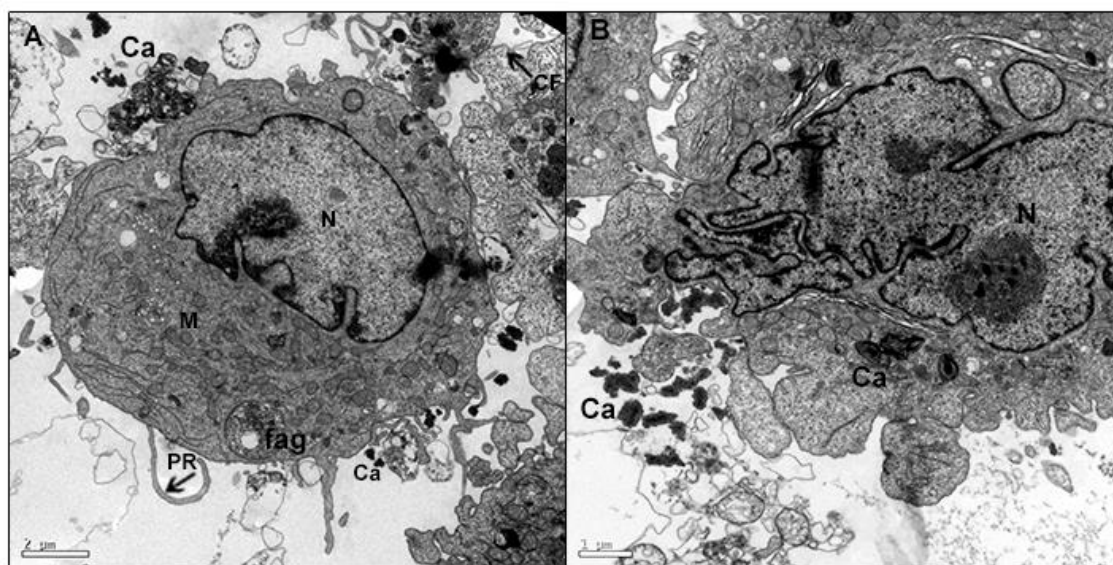


Figure 3 - Osteogenic differentiation: prresence of elongated mitochondria (M), cell protrusions (PR) and extracellular calcium deposition. Scale bar = A- 2 μ m, B- 1 μ m.

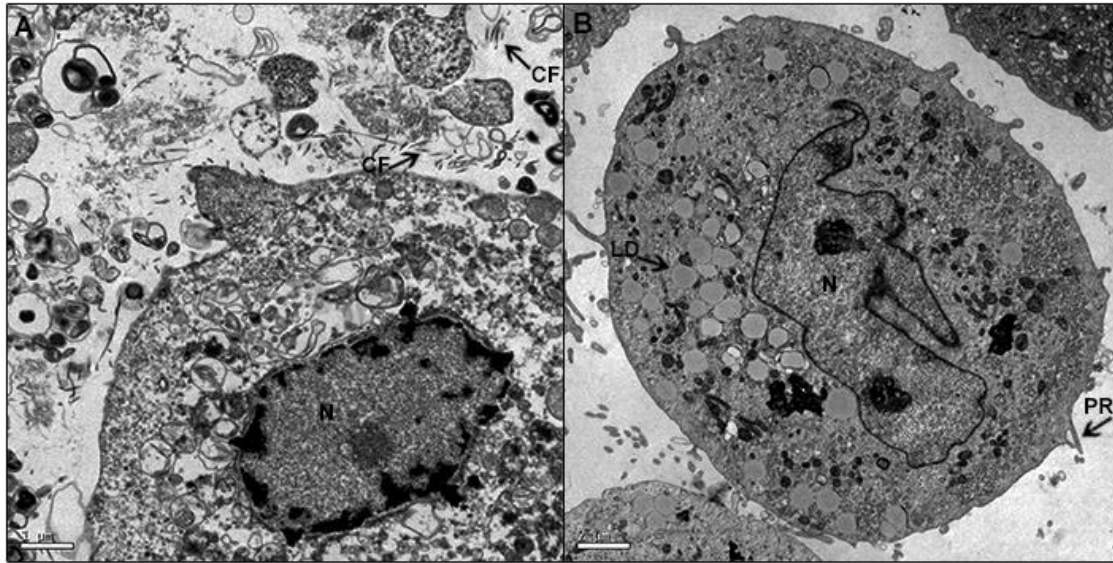


Figure 4 – A: Chondrogenic differentiation: presence of extracellular collagen fibers (CF) and degeneration signals. B: Adipogenic differentiation: presence of several cytoplasmic lipid droplets (LD) and protrusions (PR) in plasmatic membrane. Scale bar = A- 1 μ m, B- 2 μ m.

Induced adipogenic differentiation presented ASCs with cytoplasmic lipid droplets, indicating lipid storage also observed by light microscopy in Oil Red staining. Osteogenic-induced differentiation also resulted in ASCs with morphology similar to preosteocytes (33), with calcium extracellular matrix evidenced by ultrastructure and Alizarin Red staining. Positive chondrogenic differentiation in a three-dimensional environment corroborates results previously observed, which relate the physical condition of cells in pellet and the chemical induction with production of collagen II and proteoglycans as extracellular matrix (ERICKSON et al., 2002). Moreover, chondrogenic differentiation, although have showed hyaline matrix evidenced by staining, also presented signs of degeneration in ultrastructural analysis. These aspects may be due to differentiation protocol or fixation before preparation of the samples to eletronic microscopy.

In addition, this study confirmed the feasibility of *in vivo* application due to immunophenotypic profile described and chromosomal euploidy maintained during *in vitro* culture. According to minimal criteria required by International Society for Cellular Therapy, isolated cells must to present positive expression of CD90 and lack of expression of CD34. Present results are consistent with these requirements and, additionally, CD29 and CD44 were analysed for being frequently reported in mSCs cultures (DE SCHAUWER et al., 2011). CD90 is a marker relate to a glycoprotein also known as Thy-1, located on cell surface. High expression of CD90 may be found in hematopoietic cells, neurons, endothelial cells, fibroblasts, myofibroblasts and mSCs, and play a fundamental role in cell adhesion, migration, apoptosis, cell-cell and cell-matrix interactions (35). Negative marker CD34 is related to sialomucin protein and present positive expression in hematopoietic stem cells, epithelial precursors and satellite cells of skeletal muscle, playing fundamental role in migration and muscle regeneration (36). CD34 is considered a anti-adhesion protein (37) and its expression must be negative for ASCs, which are adherent cells. CD29 is a positive marker related to Integrin β -1, an important adhesion protein also responsible for cell migration and formation of protrusions in cell membrane (CHEN et al., 2016). CD44 is a transmembrane glycoprotein, related to cell-matrix interation and high expression of CD44 indicates self-renewal, differentiation and migration capacity (38). Vimentin, related to mesenchymal cells, and negative marker MHC-II, related to histocompatibility evaluated in this study as presenting negative or low expression, confirmed the possibility of application of obtained ASCs by described protocol. In conclusion, the cytologic and ultrastructural analysis demonstrated that is possible to obtain viable ASCs to be maintained in cell bank to be used for therapy in Veterinary Medicine, however, more attention needs to be given to induced chondrogenic differentiation *in vitro*.

REFERENCES

- Black LL, Gaynor J, Gahring D, Adams C, Aron D, Harman S, et al. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints : A Randomized , Double-Blinded , Multicenter , Controlled Trial *. 2007;8(4):272–84.
- Silva G V., Litovsky S, Assad J a R, Sousa ALS, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111:150–6.
- Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Vet Med Int [Internet]*. 2010;2010:250978. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2859019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Smith R KW, Korda M, Blunn GW, Goodship a. E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J [Internet]*. 2010;35:99–102. Available from: <http://ntserver1.wsulibs.wsu.edu:2123/doi/10.2746/042516403775467388/abstract>
- Ferris R a, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology [Internet]*. Elsevier Inc; 2014;82(1):36–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681213>
- Alvarenga MA, do Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim- Alvarenga FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *J Equine Vet Sci [Internet]*. Elsevier Ltd; 2016;42:12–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.002>
- Maia L, da Cruz Landim- Alvarenga F, Taffarel MO, de Moraes CN, Machado GF, Melo GD, et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC Vet Res [Internet]*. 2015;11(1):1–9. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/63>
- Elfayomy AK, Almasry SM, El-tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell [Internet]*. Elsevier Ltd; 2016;1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.001>
- Pourgholaminejad A, Aghdami N, Baharvand H, Moazzeni SM. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells. *Cytokine [Internet]*. 2016;85:51–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27288632>
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells [Internet]*. 2007 Nov [cited 2014 Jul 10];25(11):2896–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901396>
- Timmers L, Lim SK, Arslan F, Armstrong JS, Hoefer IE, Doevendans PA, et al. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Res*. 2008;1(2):129–37.
- Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AAM, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res [Internet]*. Elsevier B.V.; 2011;6(3):206–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.01.001>
- Cheng K, Rai P, Plagov A, Lan X, Kumar D, Salhan D, et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. *Exp Mol Pathol [Internet]*. Elsevier Inc.; 2013;94(3):466–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.03.002>
- Lange Consiglio A, Perrini C, Tasquier R, Derigibus MC, Camussi G, Pascucci L, et al. Equine amniotic microvesicles and their anti-inflammatory potential in a tenocyte model in vitro. *Stem Cells Dev [Internet]*. 2016;25(8):1–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26914245>
- Yousefi F, Ebtakar M, Soudi S, Soleimani M, Hashemi SM. In vivo immunomodulatory effects of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned medium in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett [Internet]*. Elsevier B.V.; 2016;172:94–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2016.02.016>
- Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S, Miragliotta V, Giannessi E, et al. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int [Internet]*. 2009 Jan [cited 2014 Sep 25];33(1):100–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996215>
- Iacono E, Brunori L, Pirrone A, Pagliaro PP, Ricci F, Tazzari PL, et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction [Internet]*. 2012 Apr [cited 2014 Oct 9];143(4):455–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274885>
- Mensing N, Gasse H, Hambruch N, Haeger J-D, Pfarrer C, Staszky C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Vet*

- Res [Internet]. 2011 Jan;7:42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3161857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. 2001;284(April 1999).
20. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* [Internet]. 2006 May [cited 2014 Jul 11];24(5):1294–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410387>
21. Barberini DJ, Freitas NPP, Magnoni MS, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014;5:25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4055040&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 Jan [cited 2014 Jul 9];8(4):315–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
23. J. Braga Osorio Gomes Salgado A, L. Goncalves Reis R, Jorge Carvalho Sousa N, M. Gimble J, J. Salgado A, L. Reis R, et al. Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2010 Jun 1;5(2):103–10. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1574-888X&volume=5&issue=2&page=103>
24. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. *Theriogenology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;75(8):1431–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.008>
25. Hwang NS, Kim MS, Sampattavanich S, Baek JH, Zhang Z, Elisseff J. Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Stem Cells* [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Oct 12];24(2):284–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109760>
26. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct Stem Cells Subpopulations Isolated from Human Adipose Tissue Exhibit Different Chondrogenic and Osteogenic Differentiation Potential. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(1):64–76.
27. Cardoso TC, Ferrari HF, Garcia AF, Novais JB, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, et al. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 Jan [cited 2014 Oct 6];12(1):18. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
28. Pérez-Merino EM, Usón-Casaús JM, Duque-Carrasco J, Zaragoza-Bayle C, Mariñas-Pardo L, Hermida-Prieto M, et al. Safety and efficacy of allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for treatment of dogs with inflammatory bowel disease: endoscopic and histological outcomes. *Vet J* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;206(3):8–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023315003147>
29. Lin K-C, Yip H-K, Shao P-L, Wu S-C, Chen K-H, Chen Y-T, et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;216:173–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.04.061>
30. Maia L, Landim-Alvarenga FC, Da Mota LSL, De Assis Golim M, Laufer-Amorim R, De Vita B, et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Microsc Res Tech* [Internet]. 2013 Jun [cited 2014 Sep 8];76(6):618–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533133>
31. Guilak F, Cohen DM, Estes BT, Gimble JM, Liedtke W, Chen CS. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. *Cell Stem Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;5(1):17–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.016>
32. Pascucci L, Mercati F, Marini C, Ceccarelli P, Dall'Aglio C, Pedini V, et al. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol*. 2010;25(10):1277–85.
33. Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta Anat (Basel)*. 1990;137(4):350–8.
34. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:763–9.
35. Kumar A, Bhanja A, Bhattacharyya J, Jaganathan BG. Multiple roles of CD90 in cancer. *Tumor Biol* [Internet]. Tumor Biology; 2016; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13277-016-5112-0>
36. Alfaro LAS, Dick SA, Siegel AL, Anonuevo AS, McNagny KM, Megeney LA, et al. CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*. 2011;29(12):2030–41.
37. Siemerink MJ, Hughes MR, Dallinga MG, Gora T, Cait J, Vogels IMC, et al. CD34 Promotes Pathological

- Epi-Retinal Neovascularization in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. PLoS One [Internet]. 2016;11(6):e0157902. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0157902>
38. Williams K, Motiani K, Giridhar PV, Kasper S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp Biol Med* (Maywood) [Internet]. 2013;238:324–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598979>