

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA CÂMPUS DE ARAÇATUBA

CARACTERIZAÇÃO E INFECÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS SEMELHANTES
A NEURÔNIOS, DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL
BOVINO PELO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5 (BoHV-5)

HEITOR FLÁVIO FERRARI

Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA CÂMPUS DE ARAÇATUBA

CARACTERIZAÇÃO E INFECÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS E CÉLULAS SEMELHANTES
A NEURÔNIOS, DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL
BOVINO PELO HERPESVIRUS BOVINO TIPO 5 (BoHV-5)

HEITOR FLÁVIO FERRARI
Mestre em Ciência Animal

Professora/Orientadora:
Profa. Adj. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Professora/Co-Orientadora:
Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

Tese a ser apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – Unesp, campus de
Araçatuba, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal (Medicina Veterinária Preventiva e
Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2013

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Ferrari, Heitor Flavio

F375c

Caracterização e infecção de células tronco mesenquimais e células semelhantes a neurônios, derivadas de cordão umbilical bovino pelo herpesvirus bovino tipo 5 (bohv-5) / Heitor Flavio Ferrari.

Araçatuba: [s.n], 2013

94f. il.; CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013

Orientadora: Profa. Adj. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Co-Orientadora: Profa. Ass. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto

1. Geléia de Wharton. 2. neurônios. 3. herpesvirus bovino tipo 5. 4. cultivo celular. 5. infecção viral

CDD 636.02774

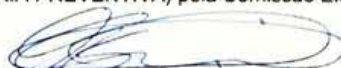
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização e infecção de células tronco mesenquimais e células semelhantes a neurônios derivadas de cordão umbilical bovino pelo herpesvirus bovino tipo 5 (BoHV-5)

AUTOR: HEITOR FLÁVIO FERRARI

COORIENTADORA: Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA) pela Comissão Examinadora.



Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO



Dra. VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI



Dr. CARLOS NORIYUKI KANETÓ



Dra. CARIS MARONI NUNES



Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO

DATA DA REALIZAÇÃO: 27 de junho de 2013.



Presidente da Comissão Examinadora
Dra. MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO
- Coorientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HEITOR FLÁVIO FERRARI – nascido em Loanda-PR, no dia 08 de março de 1982. Em dezembro de 2004 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, *campus* de Araçatuba, Araçatuba-SP. Na mesma universidade, no período de 01 de fevereiro de 2005 a 31 de janeiro de 2006, cursou o Programa de Residência em Medicina Veterinária, junto ao Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal, na área de Anatomia Patológica. Obteve título de mestre em Ciência Animal pela mesma universidade em novembro de 2007. Em março de 2010 ingressou no doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva) da FMVA/UNESP. Foi bolsista FAPESP o que favoreceu a dedicação em tempo integral às atividades relacionadas com o desenvolvimento do projeto com células tronco. Este requisito possibilitou o bolsista solicitar a auxílio BEPE para desenvolver projeto de pesquisa na Michigan State University (EUA) no período de julho de 2012 a janeiro de 2013. Atualmente é professor no curso de Medicina Veterinária na Faculdade Adamantinaense Integrada (FAI), ministrando as disciplinas de Anatomia Patológica Geral e Especial.

“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltara ao seu tamanho original”

(Albert Einstein)

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus PAIS, AMIGOS e PROFESSORES que me ajudaram durante os momentos de dificuldade que enfrentei ao longo dos quatros anos de Doutorado. Obrigado pelo apoio incondicional, conselhos e dedicação não permitindo com que eu desistisse dos meus sonhos.

NÃO CONSIGO EXPRESSAR EM PALAVRAS TODA A MINHA GRATIDÃO PARA COM TODOS.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por colocar as pessoas certas ao longo do meu caminho que considero verdadeiros anjos.

Aos meus Pais pelo apoio incondicional e dedicação que foram fundamentais para que as barreiras do impossível se tornassem possíveis.

À minha noiva Analy que com amor e carinho, sempre me acompanha aonde quer que eu vá e quaisquer que sejam meus planos e metas.

À Profa. Tereza Cristina Cardoso, orientadora, por ter realizado o processamento das amostras, análise dos resultados e publicação dos artigos científicos, referentes a esta tese, antes e durante a realização do Estágio e Pesquisa no Exterior (FAPESP).

À minha Co-orientadora Maria Cecília Rui Luvizotto que para mim é muito mais que uma orientadora e sim uma grande amiga, disposta sempre a ajudar-me para que eu possa atingir os meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Charles D. Mackenzie orientador de estágio e pesquisa no exterior, pessoa extraordinária, tanto profissional quanto pessoal e por toda ajuda e confiança em mim depositada.

À Profa. Dra. Ingeborg M. Langohr, brasileira, docente da Michigan State University, modelo de Pesquisadora e Patologista a ser seguido pela seriedade, dedicação e profissionalismo. Dedico a ela meus sinceros agradecimentos por ser a pessoa que ela é: fantástica.

Ao Prof. Dalen Agnew por ser um grande patologista e por ser uma pessoa extremamente bondosa, de altruísmo imensurável com os estrangeiros brasileiros, africanos e muitos outros.

Ao meu grande amigo e irmão Vinícius Carreira que é o idealizador da minha aventura na terra do tio Sam que nunca deixou de acreditar nesta

viagem mesmo quando eu já tinha desistido. Sou grato pela sua persistência a mim dedicada.

Ao meu amigo Benjamim Addudai (Gana/África) por ser a pessoa maravilhosa que me auxiliou com as adversidades da língua e costumes.

Ao Dr. Luiz Carlos Montezzo por dar todo o suporte necessário para ampliar os meus conhecimentos.

À Prof. Dra. Valeria que em conversas que tivemos ao longo do meu doutorado por ajudar a me tranquilizar e ter discernimento nas minhas decisões.

À Profa. Dra. Juliana e Profa. Dra. Cárís pelos conselhos que foram muito importantes nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Silmara, Andreia, Daniela, Acácio, Ana Carolina e Lívia por serem verdadeiros companheiros.

Aos meus amigos Leandro e Rafael por abrirem as portas de sua casa e por me ajudarem sempre quando eu precisei.

Ao meu irmão pelos conselhos e tentativas de me tranquilizar.

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, representado pelo Diretor Francisco Leydson Formiga Feitosa, por permitir o desenvolvimento do projeto de pesquisa de Doutorado.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa e a bolsa de estudo a pesquisa no Brasil e no exterior (processos nº2010/50626-5 e 2012/05745-1).

Muito Obrigado a Todos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 HIPÓTESES	18
3 OBJETIVOS	18
4 REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 Fontes de células mesenquimais	19
4.2 Modelos animais com células tronco	23
4.3 Propriedades das células mesenquimais	25
4.4 Características do cultivo <i>in vitro</i>	26
4.5 Células semelhantes a neurônios	27
4.6 Modelos virais em células mesenquimais.....	28
4.7 Herpersvírus bovino tipo 5	30
5 MATERIAL E MÉTODO	33
5.1 Coleta da geleia de Wharton	33
5.2 Isolamento, cultivo e propagação	33
5.3 Unidade formadora de colônia e viabilidade celular.....	34
5.4 Caracterização molecular.....	36
5.5 Cromossomos em metáfase e atividade da telomerase.....	36
5.6 Diferenciação em célula óssea/adiposa/cartilaginosa.....	37
5.7 Diferenciação em células neuronais	39
5.8 Imunofenotipagem.....	41
5.9 Citometria de fluxo	41
5.10 Infecção viral	42
5.11 Viabilidade celular pós infecção.....	43
5.12 Hibridização <i>in situ</i>	45
5.13 PCR tempo real quantitativo	46
5.14 Análise estatística	47
6 RESULTADOS	47
6.1 Isolamento e propagação celular.....	47
6.2 Viabilidade das células tronco mesenquimais.....	49
6.3 Diferenciação das células tronco mesenquimais.....	50
6.4 Antígenos de superfície celular e expressão gênica	54
6.5 Susceptibilidade celular ao BoHV-5.....	59
6.6 Viabilidade das células neuronais.....	63
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÕES	71
9 REFERÊNCIAS	71
10 ANEXOS	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- \pm - mais ou menos
- % - por cento
- 3D – Tridimensional
- °C – graus *Celsius*
- Anova – Análise de variância
- AR – Ácido retinóico
- BEK – Bovine embryonic kidney
- BoHV-1 – Herpervírus bovino tipo 1
- BoHV-4 – Herpesvírus bovino tipo 4
- BoHV-5 – Herpervírus bovino tipo 5
- BSA – Soro albumina bovina
- BVDV – vírus da diarreia viral bovina
- CD – diferenciação do grupo de leucócitos
- CEM – Células estromais mesenquimais
- CF – Citometria de fluxo
- cm – Centímetros
- cm² – Centímetros quadrados
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CSN – Células semelhantes a neurônios
- CTE – Célula tronco embrionária
- CTM – Célula tronco mesenquimal
- CTM – MO – Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
- CTM – GW – Células tronco mesenquimais derivadas da geleia de Wharton
- CTM – TA – Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
- CXCR4 - Neuroreceptor CXC 4
- d – Dias

- DAPI – 4',6 Diamino-2-fenilindole
- DMEM – Dubeco meio essencial mínimo
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DO – densidade óptica
- ECP – Efeito citopático
- EHV-1 – Herpesvírus equino tipo 1
- ENE – Enolase Neuronal Específica.
- GAPDH - gliceraldeido-3-fosfato deidrogenase
- gC – Glicoproteína C
- GFAP - Proteína glial fibrilar ácida
- Genbank – Banco de dados de sequência genética
- GW – Geléia de Wharton
- H2A – Histona e beta actina
- HIS – Hibridização *in situ*
- HLA-DR – Antígeno de leucócito humano
- HSV – Virus herpes simples
- IC – Imunocitoquímica
- IgG – Immunoglobulina G
- IgM – Immunoglobulina M
- IL-10 – Interleucina 10
- Kb – Quilobytes
- KCl – Cloreto de potássio
- LTR – Região associada à latência
- MAP2 – Microtubulos associado ao tecido cerebral.
- MDBK – Madin darby bovine kidney
- MEM – Meio essencial mínimo
- mg/mL – Miligramas por mililitros
- MHC – Complexo de histocompatibilidade
- MHC I – Complexo de histocompatibilidade I
- MHC II – Complexo de histocompatibilidade II

- min – Minutos
- mL – Mililitros
- mM – Milimols
- mmol – Milimols
- mmol/L – Milimols por litros
- m.o.i. – Multiplicidade de infecção
- mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
- MSC – Mesenchymal stem cell
- MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5dipheniltetrazolium brometo
- N200 - Neurofilamento
- n – Número
- NaOH – Hidróxido de sódio
- nm – Nanômetros
- NO – Óxido nítrico
- NT3 – Diferenciação Neural
- P – Passagens
- pb – Pares de bases
- PBS – Solução de tampão fosfato
- PCR – Reação em cadeia pela polimerase
- PGE2 – Prostaglandina E2
- p.i.- Pós-infecção
- P-NNP – Nitrofuril fosfatase
- PPAR γ 2 – receptor de proliferação de peroxisomo ativado.
- QPCR – Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
- RNA – Ácido ribonucleico
- rpm – Rotações por minuto
- RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase
- s – Segundos
- SNAP25 – Proteína sinaptosomal

- SSC – Solução salina de sódio citrato
- SFB – Soro fetal bovino
- SNC – Sistema nervosa central
- TAU – Proteína do citoesqueleto
- TCID₅₀/mL – Dose mediana infectiva em cultura de tecidos por mililitros
- TGF- β – Fator de transformação do crescimento-beta
- Tuji – Proteína filamentar
- UFCF – Unidade formadora de colônia fibroblástica
- UI/mL – Unidades internacionais por mililitros
- UV – Ultra-violeta
- v/v – Volume por volume
- μ g/mL – Microgramas por mililitros
- μ L – Microlitros

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO BoHV-5 EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E “NEURON LIKE CELLS” DERIVADAS DE CORDÃO UMBILICAL BOVINO

RESUMO - A infecção pelo herpesvírus Bovino tipo 5 (BoHV-5) resulta em meningoencefalite não supurativa que é responsável por perdas econômicas significativas na América do Sul. Células tronco mesenquimais (CTM) são encontradas em diferentes tecidos fetais, como no cordão umbilical que possui diversos fatores favoráveis para obtenção destas células. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o isolamento e a viabilidade das CTM bovinas e sua capacidade de diferenciação em outros tecidos de origem mesenquimal, como as “neuron-like cells” - células semelhantes a neurônios - (CSN), e avaliar a possibilidade da utilização das mesmas como modelo de infecção experimental com BoHV-5. As CTM foram isoladas da geleia de Wharton e diferenciadas em tecido adiposo, cartilagem, ósseo e CSN. As linhagens celulares foram caracterizadas pela expressão genica e imunofenotipicamente, utilizando a técnica de PCR, imunocitoquímica e citometria de fluxo, respectivamente. O conjunto de *primers* e painel de anticorpos primários, empregados na experimentação, permitiu caracterizar as células tronco e sua diferenciação em células neuronais. Após a adaptação e diferenciação, ambas as células foram infectadas pelo BoHV-5, exibindo efeito citopático e taxa de replicação viral aumentada 72 h pós infecção. A técnica de hibridização *in situ* identificou as partículas virais no interior das CSN e no meio extracelular. Os resultados demonstram a capacidade de diferenciação das CTM em outros tipos celulares e a possibilidade da utilização das mesmas como modelo de infecção *in vitro* de células neuronais pelo BoHV-5. Estes resultados corroboram o uso de MSC como fonte de NLC para uso no estudo da patogênese da infecção experimental pelo BoHV-5.

Palavras-chave: Geléia de Wharton, neurônios, herpesvirus bovino tipo 5, cultivo celular, infecção viral.

EXPERIMENTAL BoHV-5 INFECTION OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND NEURON LIKE CELLS DERIVED FROM BOVINE UMBILICAL CORD.

SUMMARY - Bovine Herpesvirus type 5 (BoHV-5) infection results in non-suppurative meningoencephalitis which underlies significant economic losses in South America. Mesenchymal stem cells (MSCs) are found in fetal tissues, such as the umbilical cord. The goal of this research was to characterize the isolation and viability of bovine umbilical cord MSCs for in vitro differentiation into "neuron-like cells" (NLC) to be used as a model for experimental infection with BoHV-5. MSCs were isolated from Wharton's jelly and differentiated in vitro into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic cells as well as NLC. The cell lines were characterized molecularly and immunophenotypically, using PCR, immunocytochemistry, and flow cytometry. The set of primers and panel of primary antibody used in the experiments confirmed the isolation of mesenchymal stem cells and their differentiation into neuronal-like cells. After adaptation and differentiation, the cells were infected with BoHV-5, exhibiting typical cytopathic effect and increased viral replication rate 72 h post-infection. Viral particles were identified in the NLC and in the extracellular environment by *in situ* hybridization. These results corroborate the use of MSCs as a source of NLC which can be used to study the pathogenesis of the experimental in vitro infection with BoHV-5.

Keywords: Wharton's jelly, neurons, bovine herpesvirus-5 (BoHV-5), herpesvirus, cell culture, viral infection

1 INTRODUÇÃO

As células tronco são definidas pela sua capacidade funcional de auto renovação e a possibilidade de gerar um grande número de diferentes linhagens celulares. Por serem indiferenciadas, têm a capacidade de constituir qualquer tecido e até um organismo completo. Durante a embriogênese, o desenvolvimento tecidual se constitui na morfogênese das células proliferadas, migração e diferenciação, porém nem todas as células se diferenciam durante esse processo, restando células quiescentes que se acredita serem responsáveis pela renovação celular tecidual e pela formação de novas células indiferenciadas. As células tronco podem ser isoladas de embrião e de tecidos específicos já diferenciados, mas seu potencial para diferenciação, em todos os tipos celulares, torna-se restrito a partir do momento que as células, ao longo do tempo, passam a constituir os tecidos, nos quais estas células compõem (SANCHEZ-RAMOS, 2002).

Pesquisas têm mostrado que células tronco de tecidos específicos são capazes de dar origem a uma linhagem celular diferente daquela encontrada no tecido de origem. Um exemplo típico, são as células troncos neuronais que podem ser originadas de linhagem de células sanguíneas (BJORNSON et al., 1999), ou a partir do cordão umbilical do homem e de bovinos (RAOUFI et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Células estromais da medula óssea, tecido adiposo e da geleia de Wharton podem dar origem a tecido muscular esquelético, músculo cardíaco, adipócitos, condrócitos, matriz óssea (VIEIRA et al., 2010), hepatócitos (ANZALONE et al., 2010), células da glia e outras semelhantes a neurônios (LI et al., 2009). A existência de células indiferenciadas, após o nascimento, com capacidade de ampla proliferação e diferenciação, tem possibilitado o seu uso no tratamento autólogo de doenças degenerativas, pós-traumáticas e hereditárias (SANCHEZ-RAMOS, 2002).

As células tronco mesenquimais (CTM) derivadas da medula óssea têm sido amplamente estudadas, mas a obtenção destas células envolve procedimentos invasivos. Além disso, o potencial de diferenciação das células

tronco mesenquimais da medula óssea diminui drasticamente com o avançar da idade (BIEBACK et al., 2004). O tecido adiposo é outra fonte abundante de células tronco, facilmente acessível, com grande concentração de células indiferenciadas. No entanto, a obtenção dessas células para a realização do isolamento também requer procedimentos invasivos (KERN et al., 2006).

O cordão umbilical é considerado importante fonte de CTM, as quais são derivadas das células sanguíneas, mas tem baixa taxa de isolamento em cultivo, e seu potencial de diferenciação mostrou-se falho após indução do processo de diferenciação em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso (KERN et al., 2006; LEE et al., 2004).

A procura de uma nova fonte para se realizar o isolamento das células tronco mesenquimais se faz necessária e a geleia de Wharton (GW) do cordão umbilical é considerada rica em CTM (MARESCHI et al., 2001). Devido à fácil obtenção, por não requerer processos invasivos e ser isenta dos aspectos éticos, a geleia de Wharton mostra-se uma boa fonte para obtenção de CTM. Possui outras vantagens como a rápida proliferação em cultura e possibilidade de criopreservação, logo após a colheita (ZHANG et al., 2011)

O Herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um Alphaherpesvirus associado à meningoencefalite não supurativa em bovinos jovens. Diferente do BoHV-1, cuja distribuição é ampla por todo o mundo, o BoHV-5 mostra-se restrito a América do Sul. As razões para esta particular distribuição são ainda indeterminadas, sendo os surtos mais freqüentes no Brasil e Argentina (SALVADOR et al., 1998; PEREZ et al., 2002).

As propriedades inerentes do crescimento do BoHV-5 *in vitro* permitem a identificação de linhagens de células susceptíveis à infecção viral e o estabelecimento de suas curvas de crescimento (SCHUDEL et al., 1986). A experimentação animal, a partir da inoculação de duas linhagens de BoHV-5, resultou no desenvolvimento de alterações neurológicas, que são fatais para os animais jovens, ou ocorrência de infecções latentes (MEYER et al., 2001). Estas pesquisas foram realizadas de forma independente em diferentes

condições de experimentação, sem a comparação da patogenia dessas linhagens (LADELFA et al., 2011).

Donofrio et al. (2005) fizeram uso das CTM da medula óssea de bovino para estudar o comportamento dessas células frente a infecção viral causada pelo BoHV-4, pois evidências de sua patogenia tem sugerido que o local de persistência da infecção natural ou experimental em bovinos tem sido monócitos, macrófagos ou CTM da medula óssea (DONOFRIO; VAN SANTEN., 2001).

Com o intuito de compreender as interações virais durante a infecção, a pesquisa objetivou realizar o isolamento das CTM do cordão umbilical bovino, promover a diferenciação em outros tipos celulares como a CSN e promover a infecção *in vitro* com BoHV-5.

2 HIPÓTESES

2.1 O cordão umbilical bovino pode ser uma fonte viável de células mesenquimais indiferenciadas derivadas da geleia de Wharton.

2.2 O cocultivo desses componentes pode resultar em uma monocamada de células heterogêneas, com propriedades de diferenciação em células ósseas, condrócitos, adipócitos e células semelhantes a neurônios (CSN).

2.3 A diferenciação em CSN e a sua subsequente manutenção *in vitro* apresentam susceptibilidade à infecção pelo *Herpesvirus* bovino tipo 5.

3 OBJETIVOS

3.1 Promover o isolamento e manutenção de células mesenquimais indiferenciadas, obtidas a partir do conteúdo do cordão umbilical bovino.

3.2 Realizar a diferenciação e a caracterização osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica, bem como realizar cariótipo e detecção de antígenos de superfície celular por citometria de fluxo acústica e imunocitoquímica.

3.3 Induzir a diferenciação em CSN, padronizar o seu cultivo *in vitro* e caracteriza-las, imunofenotipicamente por citometria de fluxo acústica para antígenos de superfície.

3.4 Promover a infecção experimental com o *Herpesvirus* bovino tipo 5 e observar efeitos citopáticos, títulos virais e expressão da glicoproteína C (gC) pela técnica de PCR em tempo real em diferentes períodos pós-infecção.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. FONTES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS

As CTM foram isoladas pela primeira vez da medula óssea como precursores de fibroblastos ou células estromais. Estas células indiferenciadas têm potencial para se diferenciarem em células mesenquimais, mesodermal, neuroectodermal ou da linhagem endodermal (JIANG, et al., 2002). Estas células têm sido isoladas de várias espécies incluindo a humana (PITTINGER, et al., 1999), camundongos (PEREIRA, et al., 1995), ratos (WAKITANI, et al., 1995), cães (KADIYALA, et al., 1997), babuínos, suínos, ovelhas, cabra, coelhos (MOSCA, et al., 2000) e felinos (MARTIN, et al., 2002). Khatri et al.(2009) foram os primeiros a realizar os isolamentos de CTM em aves após eclosão dos ovos, existindo relatos do isolamento dessas células de ovos embrionados.

A CTM da medula óssea (CTM-MO) é geralmente conhecida como precursor das células estromais deste órgão, as quais podem auxiliar na hematopoese. É reconhecido que seu potencial de diferenciação em células

mesenquimais é marcante, podendo se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, miócitos cardíacos, entre outras células (PITTINGER et al., 1999). Além disso, é possível fazer a diferenciação dessas células em neurônios, os quais derivam do ectoderma (WOODBURY et al., 2000). Em modelos experimentais a CTM melhora o curso de encefalites autoimunes crônicas como na esclerose múltipla e outras desordens neurodegenerativas (KASSIS et al., 2008).

A CTM da medula óssea expressam fatores de transcrição como PouV, Sox2 e Nanog e se diferenciam em linhagem osteócitos e adipócitos quando cultivadas em condições apropriadas. PouV é um homólogo do Oct4 dos mamíferos e está relacionado com a inibição da diferenciação genotípica e regulação da renovação celular e pluripotencialidade (PAN et al., 2002). Oct4 interage com outros genes reguladores embrionários, tais como o Sox2 e Nanog, os quais estão também envolvidos na regulação da pluripotencialidade e inibição da diferenciação (BOIANI; SCHOLER, 2005). A diferenciação de muitas linhagens de células tronco está correlacionada com a presença de Oct4 que regula a expressão de vários genes expressos nessas células, tais como o fator de crescimento fibroblástico e a transcrição do Rex1 e Sox2 (BEN-SHUSHAN et al., 1998).

A diferenciação adiposa pode ser induzida com associação de diversos produtos como: insulina e dexametasona que são utilizados, rotineiramente para estimular a transformação das células tronco em adipócitos (KHATRI et al., 2009). Após a indução observa-se a presença de vacúolos repletos de lipídeos e a expressão dos genes de aP2 e PPAR- γ 2. O PPAR- γ 2 é um fator de transcrição específico para adipócito, induzido durante os estágios iniciais da diferenciação, sendo fundamental na diferenciação e estabilização das funções metabólicas (LAZAR, 2002; ROSEN et al., 1999).

A fonte mais comum para o uso clínico de CTM no homem e nos animais é a medula óssea (FRASSONI et al., 2002). Embora esta fonte esteja disponível e não tenha problemas com questões éticas, a frequência e capacidade de diferenciação das CTM diminuindo ao longo do tempo. Como o

uso de tecido fetal para terapia com células tronco apresenta restrições e está associado com alta taxa de contaminação bacteriana e fúngica (IN'T ANKER et al., 2004), os tecidos extra embrionários, incluindo a placenta e o cordão umbilical (KOGLER et al., 2004), fluído amniótico (PRUSA et al., 2003) e matriz do cordão umbilical (RIORDAN et al., 2007) são recrutados como fontes adequadas de CTM.

O sangue do cordão umbilical representa a principal fonte de células tronco imaturas, incluindo hematopoiéticas e mesenquimais. Devido ao alto potencial dessas células serem cultivadas e diferenciadas *in vitro*, elas têm despertado grande interesse no seu uso para terapia celular e gênica, clonagem e métodos biotecnológicos (DONOFRIO et al., 2005). As células mesenquimais isoladas do cordão umbilical de bovinos exibem morfologia semelhante a fibroblastos, capacidade de aderir e proliferar extensivamente *in vitro* e manter seu aspecto morfológico, associado às características de crescimento ao longo das passagens (RIORDAN et al., 2007).

É relatado que as células mesenquimais do cordão umbilical humano apresentam alta tendência à diferenciação osteogênica e adipogênica, em comparação com as CTM da medula óssea (CHANG et al., 2006). As células mesenquimais bovinas do cordão umbilical apresentam capacidade osteogênica mais marcante do que potencial para a diferenciação adiposa (RAOUFI et al., 2011). A proliferação e expansão das células mesenquimais do cordão umbilical bovino foram similares a do homem e em maior número quando comparado com as células mesenquimais da medula óssea (CHANG et al., 2006; RAOUFI et al., 2011).

A possibilidade de isolar as células tronco para o seu uso em terapia celular motivou os pesquisadores veterinários a direcionar suas linhas de pesquisas às novas fontes de obtenção de células tronco, na tentativa de minimizar os riscos para doadores e receptores dessa nova terapia (CARLIN et al., 2006). Em 2006, realizou-se o primeiro relato em medicina veterinária do isolamento das células da geleia de Wharton (GW) do cordão umbilical de suíno. O alto potencial dessas células, quando cultivadas e diferenciadas *in*

vitro, tem gerado grande interesse para seu uso como célula indiferenciada, terapia gênica, clonagem, virologia e estudos biotecnológicos (CARLIN et al., 2006).

Pesquisas têm sugerido que a GW contém CTM que podem se diferenciar em linhagem de células derivadas da ectoderme, mesoderme e endoderma e também serem cultivadas *in vitro* e criopreservadas (MAJORE et al., 2011). Tais células não são derivadas das células sanguíneas do cordão umbilical, mas da matriz tecidual que envolve os vasos do cordão umbilical. Para evitar confusões, estas células são denominadas de “células troncos mesenquimais da matriz do cordão umbilical”, para distinguir daquelas células do endotélio ou do sangue do cordão umbilical (MITCHELL et al., 2003).

As CTM derivadas da GW têm propriedades gênicas muito semelhantes às CTM-MO, além de expressar marcadores de superfície similares como CD117 (FONG et al., 2011). Suas características imunes são parecidas com as CTM-MO, pois CTM-GW expressa complexo de histocompatibilidade I (MHC I), mas não a expressão MHC II. Alguns pesquisadores têm demonstrado que tais células apresentam moléculas que podem exercer atividades imunomoduladoras (WEISS et al., 2008).

Esta fonte de células tronco tem como vantagem o isolamento inicial rápido de um grande número de células, evitando a necessidade de extensivas multiplicações e danos de potencial epigenético. As CTM-GW têm a vantagem de serem isoladas de estruturas fetais durante o período que antecede o nascimento, permitindo que as células sanguíneas do cordão umbilical possam ser bem transplantadas para outro organismo sem o desenvolvimento de respostas adversas contra as células transplantadas (BOQUEST et al., 2006).

O tecido adiposo é uma fonte abundante e acessível de células tronco. Estas células, denominadas de células tronco estromais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA), são semelhantes a fibroblastos na sua morfologia, sendo capaz de diferenciar em vários tecidos, característica essa encontrada em diferentes espécies (TORRES et al., 2007). Vários pesquisadores têm demonstrado que as células mesenquimais humanas, encontradas no estroma

vascular do tecido adiposo subcutâneo, são capazes de diferenciar em múltiplas linhagens, na presença de meio indutor específico para a linhagem. As CTM-TA podem ser coletadas a partir de um processo rápido, sendo um importante passo para o estudo da terapia celular (SEO et al., 2005).

Com o uso de metodologia desenvolvida por Viera et al. (2010), foi possível coletar células tronco do tecido adiposo subcutâneo de 10 cães, a partir da lipossucção e por biópsia, com taxa de 100% de sucesso. Durante a experimentação foi observado que as células mantêm as mesmas características de outras células tronco, como aderência na superfície plástica do cultivo celular, o que possibilitou a multiplicação *in vitro*, atingindo número suficiente para utilização terapêutica. Notou-se também, a manutenção do número de cromossomos e a possibilidade CTM-TA serem criopreservadas em nitrogênio líquido sem ocorrência de morte celular (VIERA et al., 2010).

4.2 MODELOS ANIMAIS COM CÉLULAS TRONCO

Os primeiros trabalhos utilizando células tronco ocorreram em equinos pelo uso destas células em injúrias causadas em tendões e cartilagem (SMITH et al., 2003), mas sabe-se que estas células eram derivadas, na sua grande maioria, de células tronco embrionárias (CTE), que foram classificadas em totipotente e pluripotente, sendo que estas últimas só poderiam ser diferenciadas em tecidos de origem mesodérmica, ectodérmica e endodérmica.

O cordão umbilical representa a principal fonte de células tronco imaturas tanto da linhagem hematopoética quanto células mesenquimais. Este material, durante muito tempo, foi considerado como um resíduo bioinfectante, após o nascimento (DONOFRIO et al., 2005). Com a descoberta desta fonte de células tronco e seu potencial de diferenciação *in vitro*, o uso de CTEs, passou a ter papel secundário na terapia utilizando CTM do cordão umbilical (Figura 1), principalmente no homem e no equino (SCHAUWER et al., 2011).

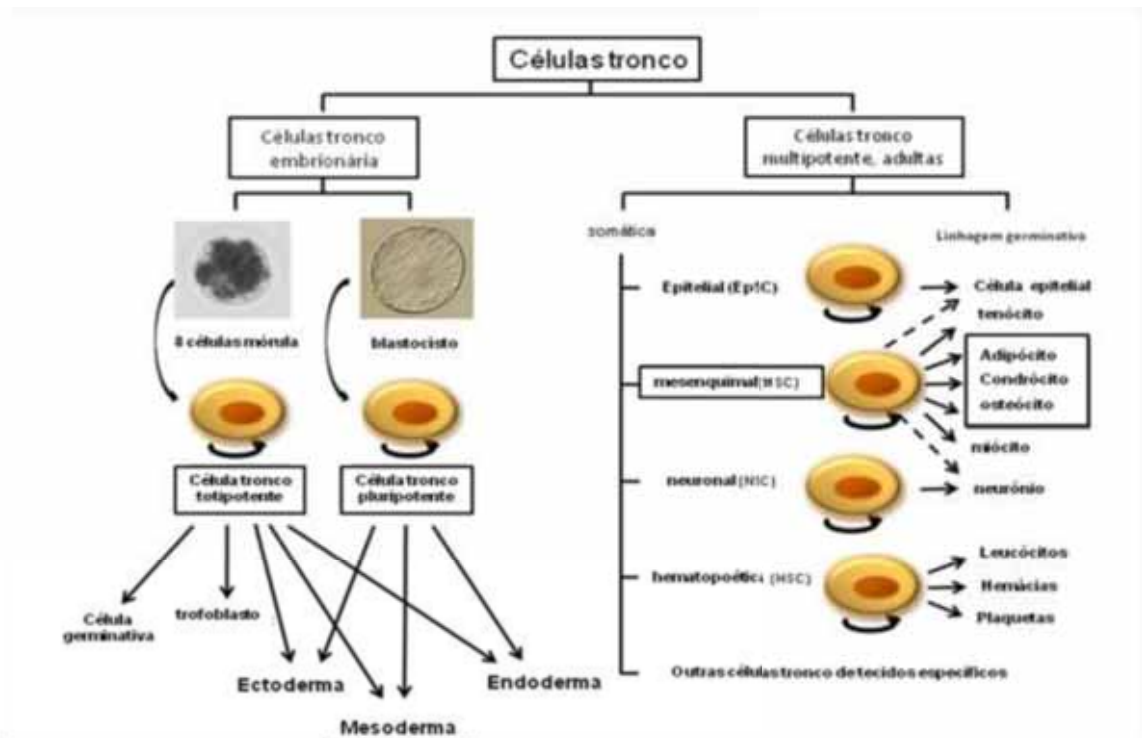


FIGURA 1-Classificação das células tronco. Detalhes específicos das CTEs e outros tipos de células tronco, com ênfase nas CTM e sua capacidade de diferenciação em tecido mesodermal e linhagem de células não mesodérmicas. (Esquema adaptado SCHAUWER et al., 2011).

A CTM do cordão umbilical equino derivadas de células hematopoiéticas e coletadas em bolsas de sangue, foram cultivadas e diferenciadas em condrócitos, osteócitos e adipócitos. Estas células indiferenciadas mostram, já desde o início, capacidade de serem congeladas e descongeladas, sem alteração na sua morfologia e propriedades de replicação em cultivo celular (KOCH et al., 2007). Devido à importância que estas células possuem para o seu uso na terapia autóloga, se faz necessário que as células tronco equinas necessitem ser caracterizadas para ser classificadas como CTM, independente de sua localização. Critérios para esta classificação são apresentados por Schauwer et al. (2011): i- As células tem que ser aderentes no cultivo celular; ii- expressarem CD73, CD90 e CD105; iii- serem capazes de diferenciar-se em outros tecidos como ósseo, cartilaginoso e adiposo. No entanto, esta caracterização se mostra difícil pela falta de anticorpos específicos para animais.

Um dos primeiros trabalhos que utilizou CTM do cordão umbilical de ovinos foi realizado por Fuchs et al. (2005), no qual a partir do uso das células tronco diferenciadas em células cartilaginosas foram comparadas com células da cartilagem de fetos. A cartilagem derivada das CTM mostrou significativa quantidade de matriz extracelular, que se constitui de glicosaminoglicanos, colágeno e elastina, estando esta última em menor quantidade quando comparado com a cartilagem de origem fetal. A partir desses resultados os autores afirmam que este tecido pode ser utilizado no tratamento de anomalias congênitas.

As pesquisas utilizando as células tronco de bovinos são escassas, o primeiro relato de isolamento, cultura, caracterização e diferenciação é de Raoufi et al. (2011) que, devido as características de fácil obtenção e baixa imunogenicidade das células hematopoiéticas, isolou células de 7 cordões umbilicais bovinos. Estas células, após serem isoladas em cultura, mostraram morfologia fusiforme, tendo a capacidade de se diferenciar em tecidos mesodérmicos e apresentando mRNA para Oct-4 e CD73, determinados pela técnica de RT-PCR.

4.3 PROPRIEDADES DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células mesenquimais formam uma população de células clonais com características muito semelhantes aos fibroblastos e à capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens de células de mesma origem (FRIEDENSTEIN, 1976). De acordo com suas características Caplan (1991) denominou estas células de “células tronco mesenquimais”, outro termo frequentemente utilizado é “células estromais mesenquimais indiferenciadas”. As CTM-MO são capazes de aderir à superfície plástica da cultura celular, caracterizam-se pelo longo período de sobrevivência, pela auto renovação, e pela propriedade de se diferenciar em tecidos conectivos tais como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (SECCO et al., 2009). Outros estudos têm demonstrado que estas células podem se diferenciar em outros tipos

teciduais derivados do mesoderma (neurônios), do endoderma (tais como hepatócitos e células pancreáticas), expandindo o seu potencial para uso clínico (ANZALONE et al., 2010).

Todas as populações compartilham alta similaridade fenotípica com as células mesenquimais da medula óssea, com algumas exceções, particularmente para os marcadores de superfície que diferenciam as linhagens celulares e a capacidade imunomoduladora. Todas as linhagens, no entanto, são capazes de se diferenciar em células mesenquimais e não mesenquimais (ANZALONE et al., 2010).

4.4 CARACTERÍSTICAS DO CULTIVO *IN VITRO*

Estudos recentes têm mostrado que as CTM do cordão umbilical apresentam muitas das suas propriedades imunofenotípicas semelhantes as propriedades CTM-MO, incluindo um conjunto de marcadores de diferenciação, neuronal e moléculas de adesão extracelular. Os marcadores de superfície das CTM do cordão umbilical do homem quando comparados com a CTM-MO, exibem em comum a expressão de CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD146. Além disso, apresentam o mesmo ciclo celular, diferenciação em adipócitos, osteogênica, citocinas, bem como o desenvolvimento de funções hematopoiéticas (MALGIERI et al., 2010).

A diferença entre as duas linhagens celulares está relacionada com: unidade formadora de colônia fibroblástica (UFCF) que é maior nas células do cordão umbilical do que nas células da medula óssea. A UFCF representa as células mesenquimais progenitoras, o que sugere maior concentração de CTM no cordão umbilical quando comparado com a medula óssea (BAKSH, et al., 2007). A proliferação da CTM do cordão umbilical é duas vezes mais rápida ao longo do tempo, e não mostra mudanças significativas após a 30ª passagem. Em contraste, CTM da medula óssea exibe proliferação mais lenta, sofrem transformações, as quais se tornam mais significantes após a sexta passagem (MALGIERI et al., 2010).

A comparação da expressão de alguns marcadores de superfície entre as CTM-MO e CTM do cordão umbilical tem mostrado diferenças quanto a expressão do CD106 e do antígeno de leucócito humano (HLA-DR), quando se comparam os dois tipos de linhagem celular. A diferente expressão do CD106 nas CTM do cordão umbilical e da medula óssea pode representar um indicador específico para identificação das CTM periféricas derivadas da medula óssea, devido à baixa expressão do CD106, em outros tipos de células tronco. Além disso, Lu et al. (2006) verificou a baixa expressão do HLA-DR nas CTM do cordão umbilical, o que pode favorecer o seu uso na terapia celular alogênica.

Células tronco estromais derivadas do tecido adiposo de cães foram isoladas e caracterizadas por Vieira et al. (2010) e foram cultivadas em meio DMEM e suplementadas com soro fetal bovino, o que tem se mostrado importante para o estabelecimento e proliferação da cultura *in vitro*. Observa-se que esta linhagem celular é facilmente cultivada *in vitro* e exibe morfologia semelhante a fibroblastos, o que é similar ao encontrado na linhagem humana. As células tanto humanas quanto caninas nas passagens iniciais e tardias, mantem a característica diploide do cariótipo somando-se 78 cromossomos (VIEIRA et al., 2010).

4.5 CÉLULAS SEMELHANTES A NEURÔNIOS

Dois paradigmas do desenvolvimento biológico têm sofrido reformulações nos últimos anos. O primeiro deles é que neurônios em cérebro já desenvolvido não regeneram. Esta afirmação tem sofrido mudanças pela evidência de que novos neurônios são formados a partir das zonas germinativas do hipocampo e zona subventricular em roedores e humanos ao longo da vida (GAGE, 2000). O segundo conceito é sobre a transformação de uma célula diferenciada com fenótipo específico, em outro tipo celular com características e fenotipicamente diferente. Evidências experimentais têm provado que as células derivadas de um tecido adulto podem se diferenciar em

um tipo celular fenotipicamente que não é normalmente encontrado no tecido de origem (SANCHEZ-RAMOS, 2002).

Segundo as observações de Li et al. (2009) as CTM são capazes de se diferenciar em osteoblastos e células neuronais, quando induzidas *in vitro*. Este potencial pode representar uma nova fonte para a terapia celular, relacionada com doenças do sistema nervoso e osteóide. O trabalho desenvolvido por Li et al. (2009), investigou a morfologia e a diferenciação fenotípica dos osteoblastos e de células neuronais, a partir de células tronco mesenquimais, derivadas da medula óssea de patos. Entretanto, estudos futuros ainda precisam identificar as características funcionais dessas células e sua viabilidade para os procedimentos de transplantes celulares.

Por outro lado, a diferenciação das células tronco para o uso na terapia de lesões neuronais continua sendo o grande desafio para os pesquisadores, pois ainda não foram obtidos resultados promissores. Progenitores neuronais podem ser gerados a partir de células tronco indiferenciadas, usando somente os estágios iniciais de diferenciação em meio de cultura (BILLON et al., 2002). A fim de se obter oligodendrócitos a partir de células tronco indiferenciadas, Chua et al. (2009) utilizaram condições de cultivo específicas para criar microambientes similares ao *in vivo*, a fim de se obter a diferenciação temporal dos oligodendrócitos. Após 21-30 dias em cultura, as células exibiram características morfológicas de oligodendrócitos, com múltiplas ramificações irregulares e projeções que lembram muito as observadas em culturas de oligodendrócitos de origem neuronal.

4.6 MODELOS VIRAIS EM CÉLULAS MESENQUIMAIS

As células tronco também podem se destinar ao isolamento e caracterização das infecções virais. Khatri et al. (2010) foram os primeiros a caracterizar as células estromais mesenquimais (CEM) de pulmão de aves. Estas células exibiram morfologia fibroblástica, expressaram marcadores de células pluripotentes e diferenciaram-se em adipócitos e osteócitos,

evidenciando a indiferenciação celular. Como outras CTM da medula óssea de aves e de outras espécies, as do pulmão também apresentaram inibição da proliferação *in vitro* de células T quando estimuladas por alguns mitógenos e susceptibilidade a infecção ao vírus da influenza aviária.

A infecção promovida pelo BoHV-4 demonstra o comprometimento de muitos tecidos, o que sugere que a persistência viral pode ocorrer em células da linhagem monocítica/macrocítica de animais infectados experimentalmente e de forma natural (DONOFRIO; VAN SANTEN, 2001). A partir das observações de que macrófagos circulantes são derivados das células da medula óssea e que as células estromais da medula óssea promovem a diferenciação e proliferação das células hematopoiéticas neste órgão, Donofrio et al. (2005) hipotetizaram que as CTM poderiam ser alvo da infecção pelo BoHV-4. A comprovação dessa hipótese ocorreu quando se isolou e infectou as CTM, comparando-as com as células MDBK (“Madin Darby Bovine Kidney”) e BEK (“Bovine Embryonic Kidney”) também infectadas, e constatou-se que a titulação viral foi maior na linhagem de células tronco do que nas demais.

AS CTM do homem, bem como de outras espécies de mamíferos, revelou funções imunorregulatórias e anti-inflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo*. As células mesenquimais suprimem a proliferação de células T, provavelmente via mecanismos que são independentes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Vários fatores solúveis tais como o TGF- β , fator de crescimento de hepatócitos, óxido nítrico (NO), e prostaglandina E2 (PGE2), são mencionados como mediador de supressão das células T por CTM (IYER; ROJAS, 2008; MAJUMDAR et al., 1998).

A cultura de CTM autólogas *in vitro* é infundida por via intravenosa sem o desenvolvimento de reações autoimunes. Estudos preliminares mostraram que a infusão de CTM promoveu redução da resposta inflamatória pós transplante em pacientes transplantados de intestino e fígado (LE BLANC et al., 2004). A resposta imunomodulatória é deletéria segundo Sudin et al.(2006) pela transmissão de algumas doenças virais tais como vírus do Epstein Barr, citomegalovírus, herpes simples tipo 1, entre outros. De acordo com suas

observações estes vírus podem ser detectados nas CTM por meio da sorologia, mas a amplificação do DNA viral, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), se torna prejudicada. Embora a detecção molecular seja falha, estas células mesenquimais expressam, na sua superfície, receptores virais como CD13, CD21 e CD46, relacionados à infecção pelo citomegalovírus, Epstein Barr e herpes simples 1, respectivamente (PESSINA et al., 2009; SUDIN et al., 2006).

4.7 HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5

O BoHV-5 é o agente infeccioso membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Alphaherpesvirinae*, muito semelhante ao vírus da pseudorraiva suína, responsável pela meningoencefalite necrótica em animais jovens, que acarreta significantes perdas econômicas no gado de corte no Brasil e por todo o mundo (FAUQUET et al., 2004). Como destacado por Del Médico Zajac et al. (2010) as perdas econômicas exatas causado pelo BoHV-5 ainda não estão bem definidas, devido ao subdiagnóstico.

A distribuição geográfica deste vírus é limitada, com alta incidência de doenças neurológicas em países da América do Sul, principalmente Brasil e Argentina, sendo o seu relato esporádico em outras partes do mundo (PESHEV et al., 1998).

É importante ressaltar que o BoHV-5 já foi, ocasionalmente, isolado de cérebro de bovinos acometidos por outras doenças neurológicas, tal como a raiva (SPILKI et al., 2003). No estudo realizado por Campos et al. (2009) para determinar a prevalência do BoHV-5 e BoHV-1 em fragmentos do nervo trigêmeo de 200 bovinos (sem sinais clínicos das doenças) no estado do Rio Grande do Sul, notou-se latência de ambos os vírus em 75,9% das amostras. Neste trabalho a prevalência do BoHV-5 no rebanho foi de 93,1%, revelando a importância desta enfermidade para o rebanho nacional.

Testes sorológicos de rotina utilizando uma cepa viral, muitas vezes, são incapazes de distinguir entre o BoHV-1 e o BoHV-5, devido a sua baixa

sensibilidade e principalmente pela semelhança antigênica. O emprego de diversas estirpes virais do BoHV-5 no desenvolvimento da soroneutralização tem demonstrado aumento de sensibilidade da técnica, podendo-se fazer a diferenciação entre os dois vírus que apresentam homologia antigênica, e ser utilizado como ferramenta na caracterização e erradicação do vírus de determinadas regiões (VARELA et al., 2010).

Esta característica de homologia foi sugerida como a responsável pela proteção cruzada entre os vírus, através da imunização ativa e passiva, que já fora demonstrada experimentalmente em bovinos (CASCIO et al., 1999). Essa reatividade cruzada tem sido responsabilizada, em parte, pela baixa prevalência do BoHV-5 e, pela ocorrência rara da enfermidade neurológica, em países que vacinam bovinos regularmente contra o BoHV-1 (D'OFFAY et al., 1995), mas segundo Del Médico Zajac et al. (2010) a baixa prevalência dos casos de BoHV5 se deve ao não reconhecimento da doença que é subdiagnosticada.

O BoHV-5 é neuroinvasivo e neurovirulento tanto na infecção natural como na infecção experimental em bovinos (PEREZ et al., 2002), ovelhas (SILVA et al., 1998), coelhos (CARON et al., 2002) e em cabras jovens, que podem atuar como transmissores da enfermidade para bovinos, em condições naturais, nos momentos de imunossupressão, pois o vírus desenvolve latência nessa espécie, e é comum a prática de bovinos e caprinos em mesmo pasto no Brasil (DIEL et al., 2005).

No isolamento viral, o sistema de cultivo celular contínuo, os *Alphaherpesvirus* replicam-se rapidamente e produzem efeito citopático característico. As células mais utilizadas para este propósito são as derivadas de células bovinas, como a MDBK (CARDOSO et al., 2007). Entretanto, trabalhos revelam a baixa sensibilidade deste método, no que se refere ao isolamento direto do BoHV-5 de amostras clínicas (BLANCO-VIEIRA et al., 1998). Porém segundo Vogel et al. (2003) esta baixa sensibilidade está relacionada com a região escolhida do SNC para o isolamento, pois a concentração viral difere de uma região do encéfalo para outra.

A meningoencefalite causada pelo BoHV-5 em bovinos tem algumas características em comum com outras encefalites herpéticas em humanos e outras espécies animais. Herpesvírus humano tipo 3 (conhecido como Varicella-Zoster Vírus 1), Virus Herpes Simples (HSV) e Herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) induzem a uma intensa reação inflamatória perivascular e resposta celular, semelhante ao BoHV-5. Há grande número de relatos descrevendo as lesões histológicas associadas com a infecção natural e experimental desenvolvida por estes agentes, no entanto, os mecanismos imunopatológicos para o desenvolvimento das lesões neurológicas não são completamente entendidos (CARDOSO et al., 2010a).

Cardoso et al., (2010b) ao utilizarem a imunoistoquímica aliada a hibridização *in situ*, correlacionaram a presença BoHV-5 com as proteínas do estresse oxidativo, expressão de proteínas sinápticas e metaloproteinase-9 em regiões do SNC que apresentavam infiltrado mononuclear, satelitose e manguitos perivasculares. A compreensão da expressão destes mecanismos proporciona novas perspectivas para o entendimento da patogênese e estratégias de interação vírus/hospedeiro para comprometimento do SNC. Pacientes infectados pelo Herpesvírus humano tipo 3, desenvolvem alterações neurológicas características de esclerose múltipla, tendo como mecanismo patogênico para o desenvolvimento da lesão a participação de resposta inflamatória humoral mediada por linfócitos B, associada a produção de IgG (BRETTSCHEIDER et al., 2009).

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem auxiliado no diagnóstico específico, em animais e humanos, da infecção pelos diversos *Herpesvirus*. A amplificação do material genômico viral pela PCR representa o método mais sensível para a identificação de material genético em amostras de encéfalo e tecidos fixados em parafina (FERRARI et al., 2007). A PCR em tempo real é utilizada de forma adequada para determinação dos diagnósticos laboratoriais na microbiologia. A técnica tem maior destaque na virologia veterinária, sendo utilizada para a quantificação dos patógenos virais (GUNSON et al., 2004). Abril et al. (2004) desenvolveram a técnica de PCR tempo real (taqma) que

possibilita a detecção e a quantificação do gene da glicoproteína B do BoHV-1 e BoHV-5.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 COLETA DA GELÉIA DE WHARTON

A geleia de Wharton do cordão umbilical bovino foi coletada de neonatos bovinos da raça nelore (n=5), produtos de inseminação artificial, mantidas no mesmo ambiente e submetidas à cesariana, após atingir de 36 a 38 semanas de gestação. A cesariana foi realizada devido às novilhas apresentarem distocias, realizando-se incisão no flanco ipsilateral ao corno uterino gestante. Imediatamente após a incisão, os cordões umbilicais foram coletados de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista-UNESP/Araçatuba. Os cordões umbilicais foram acondicionados nas seguintes condições de transporte até FMVA-UNESP/Araçatuba: temperatura de -2°C, em tubos de polipropileno (Falcon[®]), com capacidade para 50 mL de tampão fosfato estéril (PBS), suplementado com penicilina 100µg/mL, estreptomicina 10µg/mL e anfotericina B 250µg/mL (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). O processamento ocorreu em menos de 3 horas.

5.2 ISOLAMENTO, CULTIVO E PROPAGAÇÃO

Os cordões umbilicais (5-12 cm) foram dissecados em fluxo laminar, para expor a GW. Algumas incisões foram feitas com escalpe estéril na matriz do cordão umbilical para aumentar a superfície de contato com o plástico da garrafa (Figura 2) (DE BRUYN et al., 2011). As secções do cordão umbilical (5 cm) foram transferidas para garrafas de cultivo de 25cm² (TPP, Zollstr, SW) e mantidas por 5 dias com adição de Stemline meio de expansão para células tronco mesenquimais (Sigma-Aldrich[®]) e 2mM L-glutamina (Glutamax,

Invitrogen[®], Grand Island, NY, USA) e incubadas a 38.5°C, 5% de CO₂ em câmara úmida. O meio de cultivo foi trocado a cada 24h após o isolamento e fotos foram tiradas para observar a morfologia a cada 5 dias de intervalo (Figura 4). As passagens (P) das células P1-10; P15-20; P25-30; P35-40; e P45-60 foram cultivadas e recultivadas em placas de 24 poços nas mesmas condições de densidade celular. Após o estabelecimento das células, o meio de cultura foi trocado a cada 4 dias e foi analisada a dinâmica celular. As cinco linhagens de células tronco mesenquimais foram cultivadas até alcançar subconfluência de (80-90%). Neste estágio as células foram coletadas após a ação de tripsina 0,25%, durante 5 min (Invitrogen[®]) e recultivadas em garrafas 75cm² (TPP# 90025), na proporção 1:5 células/meio. No momento em que as células atingiam o número de 1x10⁶ células/mL, eram novamente recultivadas em garrafas de cultivo de 25cm², nas mesmas condições de cultivo para o isolamento das células tronco do cordão umbilical. As células até a passagem de P60 foram consideradas como sendo a linhagem derivada do cordão umbilical, especificamente da GW.

5.3 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA E VIABILIDADE CELULAR

Na análise do número de células progenitoras derivadas da GW do cordão umbilical, as passagens P1-10; P15-20; P25-30; P35-40 e P45-60 foram submetidas à avaliação da unidade formadora de colônia (UFC). A quantidade de 1x10⁶ células foi cultivada em placas de Petri nas mesmas condições do item 5.2, acrescido de 2mM de L-glutamina e incubados a temperatura de 38.5°C com 5% de CO₂ em estufa umidificada. Após 20 dias descartou-se o meio e as células aderentes foram coradas com 1% de cristal violeta, durante 10 minutos. Lavaram-se as placas e, as colônias com mais de 50 células, foram classificadas usando microscópio invertido (Olympus IX 70, Tokyo, Japan).

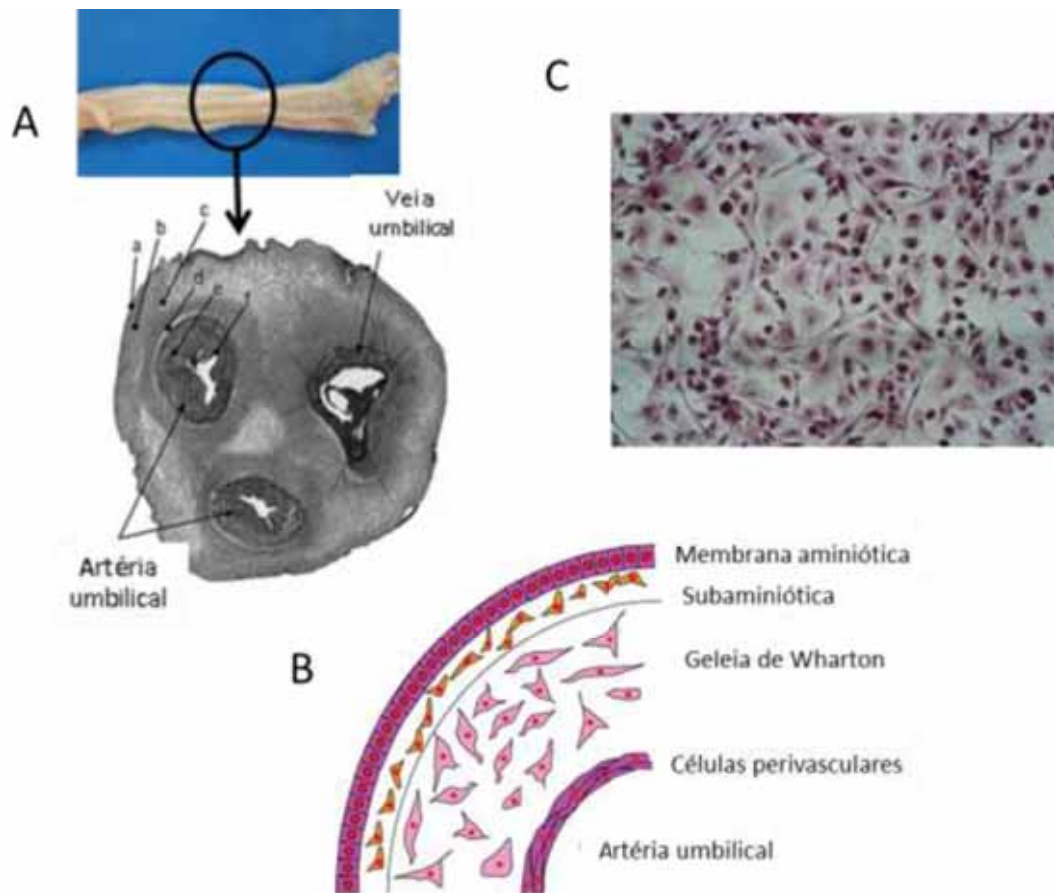


FIGURA 2-Esquema do isolamento das células mesenquimais do cordão umbilical. (A) Cordão umbilical bovino para o isolamento CTM. Fotomicroscopia do cordão umbilical; a-epitélio amniótico; b-região subamniótica; c- geleia de Wharton; d/e- musculatura endotelial; f endotélio vascular. (B) Diagrama representativo dos possíveis locais para isolamento das células tronco (C) Células tronco mesenquimais isoladas do cordão umbilical.. (adaptado de: KITA et al., 2010; MAURO et al., 2010).

A viabilidade da proliferação celular para as CTM bovinas foi avaliada a partir da atividade mitocondrial. Após o cultivo por 3 dias em 2mL de meio de cultura, realizou a técnica do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5 dipheniltetrazolium brometo], mensurando a formação de cristais de formazan,, segundo as recomendações do fabricante (In vitro toxicology Assay[®] Kit MTT based, Sigma-Aldrich[®] # 070m61471). Absorbância foi de 600nm de comprimento de onda, medido espectrofotômetro (Eppendorf[®], Hamburg, Gemany). Os valores apresentados são resultantes da média de triplicatas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O RNAm foi isolado das CTM bovina durante os períodos (P1-10; P15-20; P25-30, P35-40 e P40-60) e das “neuron-like cells” após 28 dias de cultivo, usando-se TRIzol (Invitrogen[®]) de acordo com Chomczynski e Sacchi (1987). As concentrações de RNA foram mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260nm (Eppendorf[™]), e 2 µg do RNA total foram usados para a transcrição reversa usando “Superscript II reverse transcriptase” (Invitrogen[®]). O cDNA foi amplificado usando Taq Platinum High Fidelity (Invitrogen[®]) para as CTM e a PCR foi realizada para as células neuronais conforme as instruções do fabricante da JumpStart[™] Taq ready mix (Sigma-Aldrich[®]). Os “primers” utilizados na reação da PCR estão descritos na tabela 1 e foram desenhados de acordo com as informações contidas no banco de dados GenBank. Amostras do CDNA foram amplificadas sob as seguintes condições: 33 a 45 ciclos, 94°C (30s), 58°C a 61°C (30s), 72°C (1min), seguido da amplificação a 72°C por 10 min. O gene da histona e beta actina bovina (H2A) foi usada como controle da reação positivo da reação. Os produtos da PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 12% corados com brometo de etídio.

5.5 CROMOSSOMOS EM METÁFASE E ATIVIDADE DA TELOMERASE

A cariotipagem das culturas das células do GW derivadas do cordão umbilical bovino nos períodos P1-10; P15-20, P25-30; P35-40; e P45-60 foi realizada de acordo com o procedimento padrão (CREMONESI et al., 2008). As células foram processadas com Colcemid (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 1 µg/mL em meio de cultura (garrafas de 25 cm²), por 2h na temperatura de 37°C. As células em metáfase foram coletas por desprendimento, utilizando 0,25% (v/v) solução de tripsina-EDTA (Gibco[®] - Invitrogen[™] # 25200) e agitação das garrafas. O material obtido do cultivo foi centrifugado em tubo cônico a 402,48 g, lavado duas vezes com PBS 1x. O pellet foi ressuspendido

em pequena quantidade de PBS. O volume de 10 mL de 0,075M KCl (Gibco® - Invitrogen™ #10575) foi vagarosamente adicionado e a suspensão incubada a 37°C, durante 2 horas. A recuperação das células realizou-se pela centrifugação a 152,94 g e o pellet foi ressuspenso delicadamente duas vezes consecutivas em 10 mL de solução de metanol:ácido acético (3:1), usado como fixador. Gotejou-se a solução sobre lâmina de microscopia, previamente aquecida e os cromossomos foram corados com iodeto de propídio (Sigma-Aldrich® # P 4170) e Giemsa (MERK® #10920401000). O número de cromossomos foi contado em microscópio Axion Vision 4.8.3 (Carl Zeiss®) e fez-se a comparação com o cariótipo padrão do *Bos indicus* (LI et al., 2009).

O kit de detecção da telomerase TRAPEze® (Millipore™, CA, USA) foi utilizado, segundo as recomendações do fabricante, para avaliar a atividade da telomerase que resulta na amplificação da região alvo telomérica, de seqüências repetidas. Esta reação foi mensurada com luz ultravioleta (UV) (280nm) em espectrofotômetro (Eppendorf®). O controle positivo foi constituído por células “Madin-Darby bovine kidney” (MDBK) mantidas no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP. O controle negativo foi o extrato de células MDBK que foram incubadas a temperatura de 85°C por 10 min., para inativação da telomerase. As amostras foram consideradas positivas quando a densidade óptica (DO) foi ≥ 0.2 e foram negativas quando a DO foi ≤ 0.2 .

5.6 DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS ÓSSEA/ADIPOSA/CARTILAGINOSA

O potencial de diferenciação das CTM derivadas da GW foi examinado durante P1-10; P15-20; P25-30; P35-40; e P45-60. As diferenciações: adiposa, osteogênica e condrogênica foram realizadas com (STEMPRO meio de diferenciação, Gibco® - Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante. As CTM bovinas foram cultivadas na quantidade de 1×10^6 células/mL em placas composta de 6 poços (TPP, Zollstr, SW) nas mesmas

condições de cultura como descritas no item 5.2. Após o cultivo de 48h o meio foi substituído pelo meio de diferenciação STEMPRO (Gibco® -Invitrogen™ # A10072-01) 2mL por poço, durante quatro dias o meio foi trocado. Após 20 dias do início da diferenciação as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%. (Sigma-Aldrich®) A diferenciação das células ósseas foi avaliada pela deposição de sais de cálcio foi avaliada pela coloração de Alizarin Red (Sigma-Aldrich®). A atividade da fosfatase alcalina foi mensurada pela p-nitrofenil fosfatase (p-NNP) reações de substrato usando ALP™ reagente (Sigma-Aldrich®). As células foram lavadas com 2mL de PBS mais 0,2% de Triton X-100, sob agitação de 20 min. Incubou-se as células com 500 µl do substrato (10mM p-NPP, 1mM MgCl₂) por 30 min na temperatura de 37°C. A reação foi parada pela adição de 100mL de NaOH 1mmol. O p-NNP formado foi mensurado usando o leitor de microplacas com filtro de 405nm (Multiskan®, Labsystems, NY, USA).

A diferenciação das células adiposa foi realizada pelo cultivo de 1×10^6 células/mL que foram cultivadas da mesma forma da diferenciação osteogênica. O meio de cultura foi mudado para a adição de 2mL de STEMPRO® (Gibco® - Invitrogen™ # A10070-01) meio de diferenciação adiposo, o qual foi trocado a cada 24 h. Após 15 dias da diferenciação as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com Oil Red (0,3% de Oil Red dissolvido em 60% de isopropanolol) (Sigma-Aldrich®) por 10 min. A diferenciação adiposa foi constatada pelo acúmulo de vacúolos ricos em lipídeo que apresentam afinidade pela coloração de Oil Red (Sigma-Aldrich # 0625).

A indução da diferenciação condrogênica foi similar às condições descritas para a indução das células adiposa e óssea. No entanto, 3×10^6 células/mL foram cultivadas e suplementadas com meio de diferenciação STEMPRO® (Gibco® -Invitrogen™ # A10070-01) associado a suplementação com 100mL de indutor de condrócitos (Invitrogen®). As células foram mantidas sobre estas condições durante uma semana, substituindo o meio a cada 24 h. As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e coradas com Safranina

O para evidenciação glicosaminoglicanos (Sigma-Aldrich® Sigma-Aldrich # 58884).

5.7 DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS NEURONAIS

Para a diferenciação neurogênica das CTM foram adotados dois protocolos com indutores neuronais diferentes:

O primeiro protocolo de diferenciação foi dividido em três estágios. No estágio I, CTM foram ressuspensas na concentração de 2.8×10^4 células/mL em meio Neurobasal™ (Gibco® - Invitrogen™ # 12348), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich®) por 24 h. O estágio II consistiu na substituição do meio de cultura Neurobasal™ e suplementação com 50% de B27 (Gibco® - Invitrogen™ # 12348) e O troca do meio depois de 24 h da indução. O estágio III foi iniciado com a substituição do meio Neurobasal™ e suplementação com neuro diferenciador e ácido retinóico (Invitrogen®), mantido por 15 dias consecutivos e as CSN foram cultivadas em Lab-Tek (Nunc™ Rochester # 177437), para a realização da técnica de imunocitoquímica. Todos os meios foram suplementados com penicilina (100 IU/mL) e streptomina (100mg/mL). Os cultivos foram mantidos a temperatura de 38.5°C em 5% de CO₂ com 95% de umidade.

O segundo protocolo de diferenciação seguiu os mesmos procedimentos semelhantes aos descritos acima, mas com algumas modificações (CHUA et al., 2009). As células foram cultivadas na concentração de 3×10^6 células/mL. A indução foi realizada com a reposição do meio de cultura Neurobasal™ mais a suplementação com B-27 e suplemento neural (neurotrophin-3; Invitrogen®), 20% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich®) e 3 µM de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich® # M7154) por 24 h, lavado três vezes com PBS, e diferenciadas com meio livre de soro, contendo 2% dimetilsulfox (DMSO, Merk – Darmstadt # K 25742052) e 200 mmol/L hidroxianisolebutilado (BHA, Sigma-Aldrich®). As CTM do grupo controle foram incubadas com meio contendo soro fetal bovino.

Tabela 1 – Marcadores da superfície da CTM e “neuron-like cells” analisado por RT-PCR

Genes	Número de Acesso	Sequência dos primers (5'-3')	pb
Bov- beta actina	AF191490	AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG GAAATCGTCCGTGACATCAA	126
POU5F1	AY490804	ACCCAGGCTGATGTGGGGCTC TGTGGCTAATTTGCTGCAGGGTG	300
ITSN1SH3	GJ060426	ATGCAGTCAAGTTTACCACAG TGACTGAGGAACAGCCCCACTCTGC	128
Nestin	AB257750	AGACTTCCCTCAGCTTTCAGG GCCTGGAGGAATTCCTTGGTT	209
N200	NM174121	TAGCACATTTGCAGGAAGCA CGGCCAATTCCTCTGTAATG	208
β -tubulin III	NM001077127	AGATTCCGCTATTAGCTA CGGTACCCGGTTAATAGTAGT	207
GFAP	L19867	TGCAGACCTGACAGACGGCTGTTG CTGCTAGAGGGCGGAGGAGAACG	209
NT3	NM001077988	ATGCCGTAGCCGGTTAATGCA TAGGCCCTTAATCGATCGTAA	208
H2A	AW461431	GTCCTTGAGTACCTGACCCGC AGTCCTTCTCCGGGAGCAACA	209

5.8 IMUNOFENOTIPAGEM

Após a diferenciação, as células neuronais com 28 dias de cultura foram fixadas com paraformaldeído por 15 min na Lab-Tek (Nunc™ Rochester # 177437) contendo quatro poços. As células foram permeabilizadas por 10 min, em temperatura ambiente, com 0,4% Triton X-100 diluído em solução de tampão fosfato (PBS). A caracterização fenotípica ocorreu pela imunomarcção de antígenos de superfície, incubando as células fixadas com os anticorpos primários (Tabela 2) que foram diluídos com diluente de anticorpo (Dako®#S3022), na temperatura 4°C por 12 h. Após várias lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário na diluição de 1:100, “anti-mouse” ou “anti-rabbit” ou “anti-chicken” FITC (Isotiocianato de fluoresceína, Sigma-Aldrich®) por duas horas, protegido da luz, na temperatura de -4°C. As lâminas foram contra coradas com DAPI (4-6-diamidino-2-fenilindole, Sigma-Aldrich # D9542) 1mg/mL em meio de montagem Fluormount (Sigma-Aldrich # F4680), incubado por 15 min, até a observação. Para o grupo controle, células indiferenciadas sofreram o mesmo procedimento de imunomarcção para avaliação das reações cruzadas entre os anticorpos. O controle negativo da reação foi adição 0,01 mol/L de PBS, usado para substituir o anticorpo primário específico para cada etapa. Todas as imagens do mesmo conjunto foram obtidas a partir dos mesmos parâmetros fotográficos de tempo de exposição. As imagens foram obtidas usando Axio Imager® A.1 microscópio fluorescente conectado a câmera AxioCam® MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). As imagens foram processadas utilizando software AxioVision® 4.8 (Carl Zeiss) para cada antígeno e a determinação visual do número de células positivas foi estabelecido a seguinte classificação: (-, 0%; +, 0-25%; ++, 25-50%; +++, 50-75%; +++++, 75-100%).

5.9 CITOMETRIA DE FLUXO

Após o estabelecimento e a diferenciação das células neuronais, com 28 dias de cultura, 1×10^6 células CMT e “neuron-like cells” diferenciadas foram coletadas depois de serem desprendidas com 0,25 % (v/v) solução de tripsina-

EDTA (Sigma-Aldrich[®]) e agitação das garrafas. Após o desprendimento da monocamada, a suspensão foi lavada duas vezes com PBS-tween, centrifugadas 81,5 g por 5 minutos. O pellet foi ressuspensado em 200 μ L de PBS-tween e fixado com paraformaldeído a 4%. As células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal por 18 h na temperatura de 4°C, nas mesmas condições descritas para imunocitoquímica (Tabela 2), acrescido de 1% de Triton X-100 e 0,5% de soro albumina bovina (BSA). Após incubação realizou-se duas lavagens com PBS-tween, centrifugações de 81,5g e ressuspendeu o “pellet” em 100 μ L PBS-tween. Em seguida, adicionou-se a 1:50 do anticorpo secundário, incubado a 37°C por 30 min. A suspensão celular foi novamente lavada, como previamente descrito. Após a lavagem final, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%. As imunomarcações foram avaliadas pela citometria de fluxo (Attune Acoustic focusing cytometer system, Applied Biosystems[™], Foster City, CA, USA) e 50,000 eventos foram contados. O controle negativo foi realizado pela incubação da mesma suspensão celular com imunoglobulina G e M (IgG e IgM) bovina e os resultados foram incluídos na compensação global para excluir a auto-fluorescência. O filtro BL1-A (488 nm) foi utilizado em cada análise.

5.10 INFECÇÃO VIRAL

Depois da diferenciação das “neuron-like cells”, estas foram mantidas em meio Neurobasal[™] (Invitrogen[®]) e suplementação com B27 sem soro fetal bovino. A cepa viral do BoHV-5 usada na experimentação foi isolada de bovinos com meningoencefalite que fora previamente caracterizada e estudada em surto ocorrido durante o ano de 2005 (CARDOSO et al., 2007; FERRARI et al., 2007). Esta cepa tem 90% da sua sequência similar ao EVI99, quando comparado com a região US9 (número de acesso GenBank AY064172). Para a infecção das CTM e células neuronais procedeu-se o cultivo nas Lab-Tek (Nunc[™] Rochester # 177437) e quando foi atingido a confluência de 70%, realizou-se a infecção da monocamada com 100 μ L da suspensão do BoHV-5 ($10^{3.2}$ TCID₅₀/ml), correspondendo a multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,1. A suspensão viral foi submetida à adsorção por 1 h, na temperatura de 38.5°C.

Depois da incubação, a suspensão viral foi removida e a monocamada foi suplementada com o mesmo meio. As células inoculadas foram monitoradas com relação ao desenvolvimento de efeito citopático (ECP) em microscópio de luz confocal (Olympus® IX 70).

A primeira fase do crescimento da curva de infecção para CTM e CSN pelo BoHV-5 foi analisada pela multiplicação experimental cinética, após atingir 80% de confluência, as células foram infectadas com multiplicidade de infecção de 1. A adsorção foi realizada na temperatura de 38,5°C, o inoculo foi removido e novo meio foi adicionado. As células foram incubadas com o vírus em diferentes momentos (24, 48, 72, 96 e 120 h p.i.). Depois da incubação, o sobrenadante e o lisado de células que foram coletados e analisados para a presença do vírus infectante nas células MDBK, foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM). As células foram infectadas com a dose de 50µL do vírus cultivado nas células neuronais, seguido da titulação. Toda a experimentação foi realizada em triplicata. Os respectivos títulos foram calculados pela metodologia de Reed e Muench (1938), os valores expressos na unidade de \log_{10} (TCID₅₀/mL).

5.11 VIABILIDADE CELULAR PÓS INFECÇÃO

Análise da proliferação celular foi realizada com kit “in vitro Toxicology Assay®”, para o grupo de células neuronais infectadas e não infectadas durante os tempos de cultivo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h pós a infecção (p.i.) (TOXI-1 KIT; Sigma-Aldrich® # M5655). Para cada período de p.i., o sobrenadante da cultura foi removido e 2mL de MTT foram adicionados, seguindo as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich®). Absorbância foi mensurada em comprimento de onda de 600nm com espectrofotômetro (Eppendorf®, Hamburg, Germany). Todos os valores apresentados são resultantes da média de triplicatas.

Tabela 2 - Especificações dos anticorpos primários utilizados para a citometria de fluxo (CF) e imunocitoquímica (IC).

Sigla	Anticorpo	Diluição		Espécies	Empresa
		CF	IC		
CD34	Precursor Hematopoético de células MS	1:50	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD45	Anti-células linfóides da medula óssea	1:50	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD44	Receptor celular para ácido hialurônico	1:30	1:50	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD90	Anti- antígeno THy1	1:30	1:50	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD105	Anti-endoglina	1:50	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD29	Anti-integrina β 1	1:50	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich®
CD73	Anti-nucleotidase	1:25	1:25	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-Vimentin	Anti-vimentina clone V9	1:50	1:500	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-cytokeratin	Anti-Pan cytokeratina clone PCK-26	1:100	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich®
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida	1:50	1:500	Camundongo	Dako®
CXR4	Neuroreceptor CXC 4	1:50	1:150	Camundongo	Calbiochem®
SNAP-25	Proteína Sinaptosomal de 25kDa.	1:50	1:100	Camundongo	Prestige Antibodies™
Anti-N200	Neurofilamento de 200 Kda	1:100	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-Nestin	Expresso por células tronco do SNC	1:100	1:100	Coelho	Sigma-Aldrich®
Anti-NT3	Diferenciação neuronal	1:50	1:50	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-TuJ1	Estrutura filamental	1:100	1:100	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-MAP2	Microtubulo associado ao tecido cerebral	1:20	1:20	Camundongo	Sigma-Aldrich®
Anti-ubiquitin	Regulação da expressão genica	1:200	1:200	Galinha	Sigma-Aldrich®
Anti-Tau	Proteína do citoesqueleto	1:200	1:200	Coelho	Sigma-Aldrich®

5.12 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Para estimar o número de neurônios que ativamente apresentava infecção e replicação do DNA viral, as células neuronais foram previamente cultivadas em placas com 6 poços (TPP[®]) e infectadas conforme descrição anterior, incubadas por 24, 48, 72, 96 e 120 h p.i. e fixadas com 95% ácido acético glacial, acrescido de etanol (3:1) durante 30 min, em banho de gelo. A hibridização *in situ* (HIS) foi realizada, como descrito previamente (CARDOSO et al., 2010b; SILVA-FRADE et al., 2010). A sonda de DNA foi preparada a partir do produto da amplificação da PCR, a partir do gene da glicoproteína C do BoHV-5 de acordo com estudos prévios (SILVA-FRADE et al., 2010; VOGEL et al., 2003). Procedeu-se a amplificação de 159 pares de base (pb), após a utilização do “primer” gl + (5'- GTG CTC TTC TCC ATC GCC - 3') e “primer” gl – (5' – GCG GAG GAG GAG TTG TCG G – 3 – bio') (Invitrogen[®], Brasil). Depois da purificação do DNA a partir do gel de agarose, o produto da PCR foi inserido em vetor TA (pGEMTEasy, Promega, Madison, WI, USA) e os produtos foram introduzidos em *E. coli* por “heat shock”. As colônias positivas foram confirmadas pelo sequenciamento do DNA. A colônia positiva foi cultivada e o DNA plasmidial foi preparado utilizando-se kit comercial (Promega Mini - Prep[®], Promega, Madison, WI, USA). A sonda foi gerada pela reação da PCR (SILVA-FRADE et al., 2010), tendo como gene alvo a gC, localizada no plasmídeo como descrito anteriormente, utilizando-se “primer” reverso biotilado (Invitrogen[®]).

As células neuronais infectadas e não infectadas foram, centrifugadas a 81,5 g, e a partir do sedimento, as células foram transferidas para lâminas de microscopia (EasyPath[®]) pré-tratadas com poly-L-lysina (Sigma-Aldrich[®]) e fixadas com 4% (w/v) paraformaldeído (Sigma-Aldrich[®]), durante 24 h, a 4°C. As lâminas foram tratadas com proteinase K (10 µg/mL, Invitrogen[™]), por 10 min na temperatura ambiente e lavada com PBS. A sonda biotilada desnaturada de 159 – pb, no volume de 2 µL (2 ng/mL) de sonda e 98 µL de tampão de pré-hibridização (50% formamida, 5% de soro albumina bovina, 1%

N-lauroilsarcosina e 0.02% de sódio dodecilsulfato, Sigma-Aldrich[®]) foi aplicado nas lâminas. As lâminas foram incubadas a 37°C por 12 h em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com solução de 1X SSC (solução salina de citrato de sódio) e 0.1x de SSC por 10 min, a 42°C. A visualização da reação consistiu da incubação com anticorpo monoclonal imunomarcado com FITC (Sigma-Aldrich[®]) e o núcleo contra corado com DAPI (Sigma-Aldrich[®]). As lâminas foram montadas com meio de Fluormount (Sigma-Aldrich[®]) e observadas em microscópio fluorescente (Carl Zeiss).

5.13 PCR TEMPO REAL QUANTITATIVO

A monocamada e sobrenadante de células foram coletadas nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 p.i. O RNA foi extraído usando o protocolo do Trizol LS[™] (Invitrogen[®]) de acordo com as instruções do fabricante. Em média 150ng do RNA total foram usados para síntese do cDNA com Enhanced Avian RT First Strand Synthesis (Sigma-Aldrich[®] # STR-1). O qPCR foi realizado e analisado pelo aparelho e software Step One Plus[®] PCR tempo real (Applied Biosystems[™]). A reação de PCR foi realizada com 50 µL de volume, contendo 1.2 µg de cDNA, 400nM de primers e 200nM de probes. As probes foram desenhadas para a sequência do gene da glicoproteína C e marcadas com FAM, de acordo com o relato de Diallo et al. (2011). A PCR foi iniciada pela amplificação de 40 ciclos à 95°C (15s) e 60°C (60s). Os resultados foram obtidos da média de triplicatas para cada amostra e tentando eliminar os erros de pipetagem. A expressão do gene GAPDH bovino (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi também quantificada de forma similar para normalização. O método comparativo $\Delta\Delta C_t$ foi utilizado para análise dos resultados. A expressão do gene da glicoproteína C do BoHV-5 para as células neuronais infectadas e não infectadas foram quantificadas em comparação com os valores do GAPDH C_t .

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística foi realizada em “software” Prisma 5 (Graphpad). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. Os itens comparativos foram realizados em triplicata. Para a estatística foi selecionado o teste para análise de variância ANOVA, e pós teste de múltipla comparação Newman-Keuls. As diferenças encontradas foram consideradas significantes quando $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ISOLAMENTO E PROPAGAÇÃO CÉLULAR

As células da GW foram coletadas do cordão umbilical de bovinos, e o cultivo foi realizado baseado nas propriedades das CTM bovina, após aderir à superfície plástica, sem a necessidade de digestão enzimática, remoção dos vasos do cordão ou dissecação (Figura 3A–C). O cordão umbilical foi seccionado em cortes longitudinais para expor a GW e incisões foram realizadas para expor de forma ampla a matriz do cordão umbilical e este ficar em contato com a superfície plástica (Figura 3C). Os segmentos do cordão foram plaqueados e as colônias de células observadas apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 4A). A cultura foi realizada até as células alcançarem subconfluência (Figura 4A–B). As células foram cultivadas por sucessivas passagens (P60) não apresentando diferenças no número de células entre as passagens (Figura 4C–D). No início, o crescimento e a diferenciação foram lentos (confluência de 30%, após o terceiro dia de isolamento), mas a partir do quarto dia as células proliferaram rapidamente (confluência de 60% no quinto dia do isolamento). As células cultivadas tinham como característica principal seu aspecto fenotípico mesenquimal com características homogêneas, muito semelhantes a fibroblastos e aspecto fusiforme bipolar. Aproximadamente após uma semana, as características

morfológicas das células eram similares e 80% de confluência alcançada. Todos os cultivos derivados dos cinco cordões umbilicais produziram células viáveis até a passagem P60. As CTM não alteraram a sua morfologia e foram estáveis em suas propriedades fenotípicas, após as passagens subsequentes (Figura 4A-D).

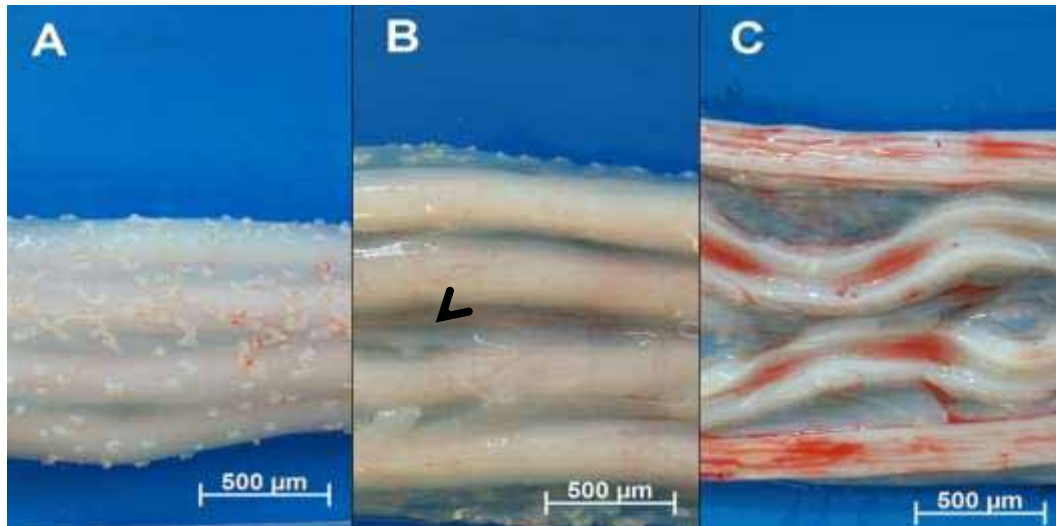


FIGURA – 3. Detalhe macroscópico de cordão umbilical bovino. A - Cordão umbilical íntegro revestido pelo epitélio amniótico. B - Abertura do epitélio amniótico exibindo 3 vasos sanguíneos e substância gelatinosa incolor (cabeça de seta), geleia de Wharton. C - Detalhe dos vasos que compõem o cordão umbilical bovino, formado por duas artérias , uma veia e uraco.

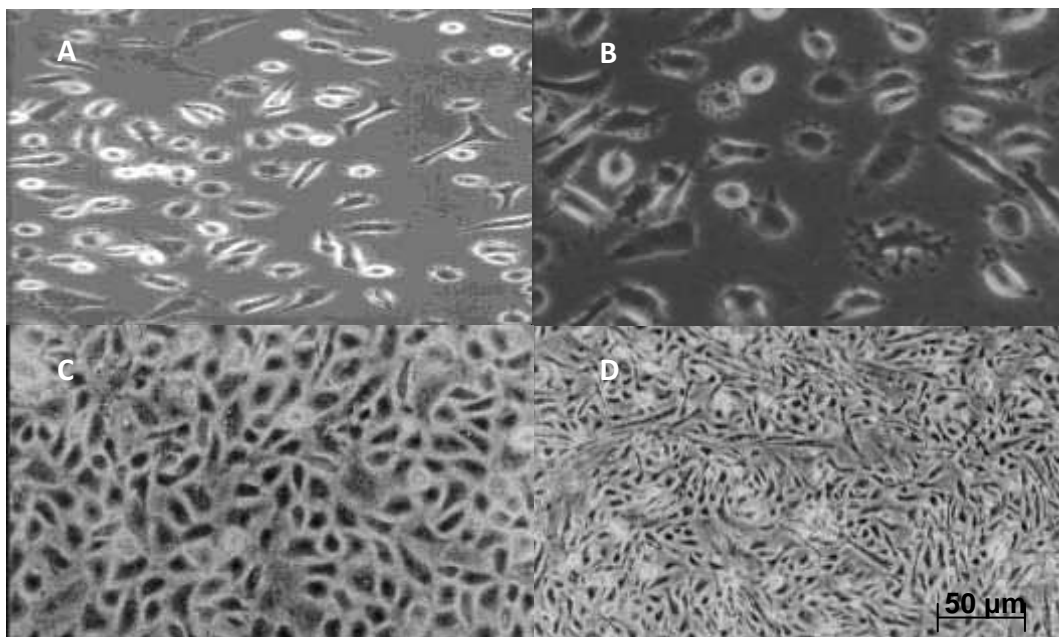


FIGURA – 4. Aspecto morfológico das células mesenquimais bovinas . A - 1º dia do cultivo, células com formato arredondado, algumas vezes fusiforme. B - Detalhe em maior aumento das CTM. C -10º passagem da cultura primária, células poligonais, fusiformes, semiconfluência. D - CTM, morfologia semelhante a fibroblasto, homogêneas.

6.2 VIABILIDADE DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Após 15 dias de cultura, a primeira passagem (P1) foi realizada e para as passagens P1-10, P15-20, P25-30, P35-40 e P45-60 o MTT e a unidade formadora de colônia foram avaliados. No período de P1-10, após 5 dias de cultura, a concentração média de células obtidas foi de $1,8 \times 10^3$ células/mL, não diferindo da concentração de células observada para o período de P60. A concentração entre o primeiro e o último período se manteve entre $1,5$ e $2,0 \times 10^3$ células/mL, assim como, UFC que foi de 300 unidades por placa. A viabilidade das CTM bovina derivadas do cordão umbilical em condições de cultivo foi avaliada pela reação de MTT. Os resultados demonstraram que os cinco cultivos derivados do cordão umbilical nos períodos P1 e P60 não apresentaram diferenças na atividade mitocondrial.

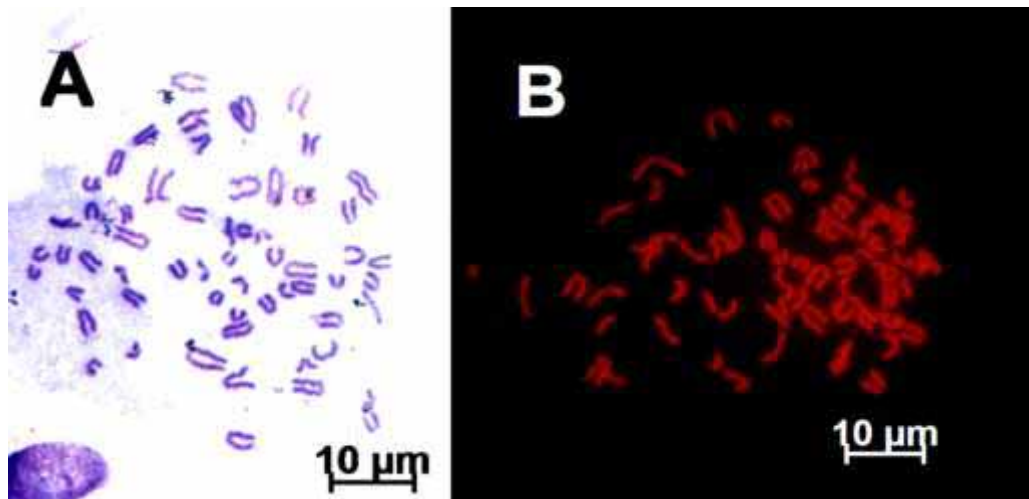


FIGURA 5 – Cromossomos em metáfase, cariótipo das CTM. Número de cromossomos ($2n=60$) constituído por 58 autossomos e 2 sexuais, da linhagem de CTM, na 20 passagem. A : Cariotipagem corado com Giemsa; B: Cromossomos corados com iodeto de propídeo.

As CTM bovinas não apresentaram alteração no cariótipo após a cultura *in vitro* para os períodos de P1 a P60. Nas passagens primárias e nas últimas passagens, as células mantiveram o cariótipo diplóide com 60 cromossomos (Figura 5). Atividade telomerásica mostrou-se elevada nas CTM quando comparada com o controle negativo e sem diferença estatística na comparação com o controle positivo, durante os diferentes períodos do cultivo celular (Figura 6).

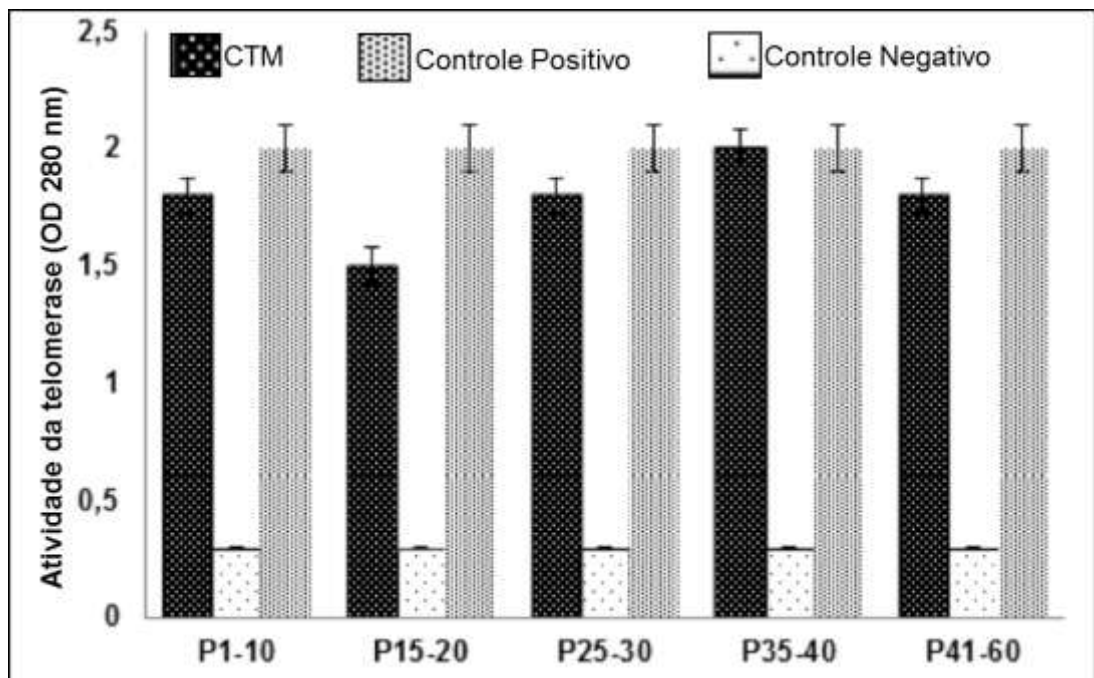


FIGURA 6 – Resultados da amplificação da telomerase, durante os períodos. Os dados representam a média \pm desvio padrão, $p > 0,05$.

6.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As propriedades das CTM bovinas foram avaliadas durante todas as passagens e a técnica de RT-PCR foi utilizada para mensurar a expressão gênica dos genes POU5F1 e ITSN1 nas células mesenquimais. Todas as células mesenquimais indiferenciadas derivadas do cordão umbilical expressaram os genes das células tronco mesenquimais (Figura 7).

A pluripotencialidade foi confirmada pela habilidade das células tronco do cordão umbilical bovino diferenciarem-se em osteócitos, condrócitos e adipócitos, além de células semelhantes a neurônios (Figura. 8A). A diferenciação osteogênica e calcificação da matriz celular foram notadas com 20 dias de indução, durante os P1 a 60 (Figura. 8B). A atividade da fosfatase alcalina para as células diferenciadas foi intensa nas células diferenciadas em células ósseas ($OD \geq 0,9$) em contraste com as células indiferenciadas em que o valor foi de $OD \leq 0,1$. A diferenciação condrogênica foi observada no 21º dia de indução, com a constatação da presença de glicosaminoglicanos depositados no meio de cultura como sedimentos de coloração avermelhada (Figura 8C). A diferenciação adiposa foi verificada pelo alto número de pequenos vacúolos lipídicos, positivos para a coloração de oil red durante os períodos de P1-P30 (Figura 8D), porém com diminuição gradativa da diferenciação nos demais períodos iniciando-se no P30.

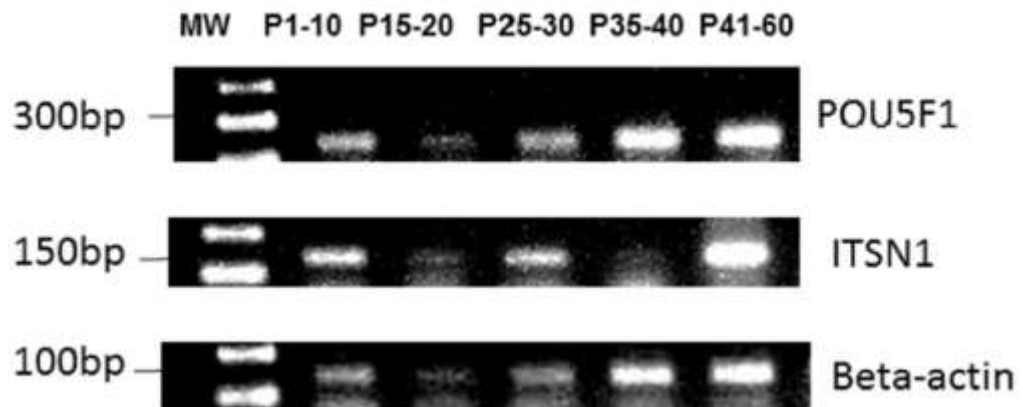


FIGURA 7 – Expressão POU5F1 e ITSN1, nos períodos de propagação celular das CTM e CSN. O gene da Beta-actina foi utilizado como controle interno da reação de PCR. MW Peso molecular de 1Kb. Eletroforese em gel d agarose 12%.

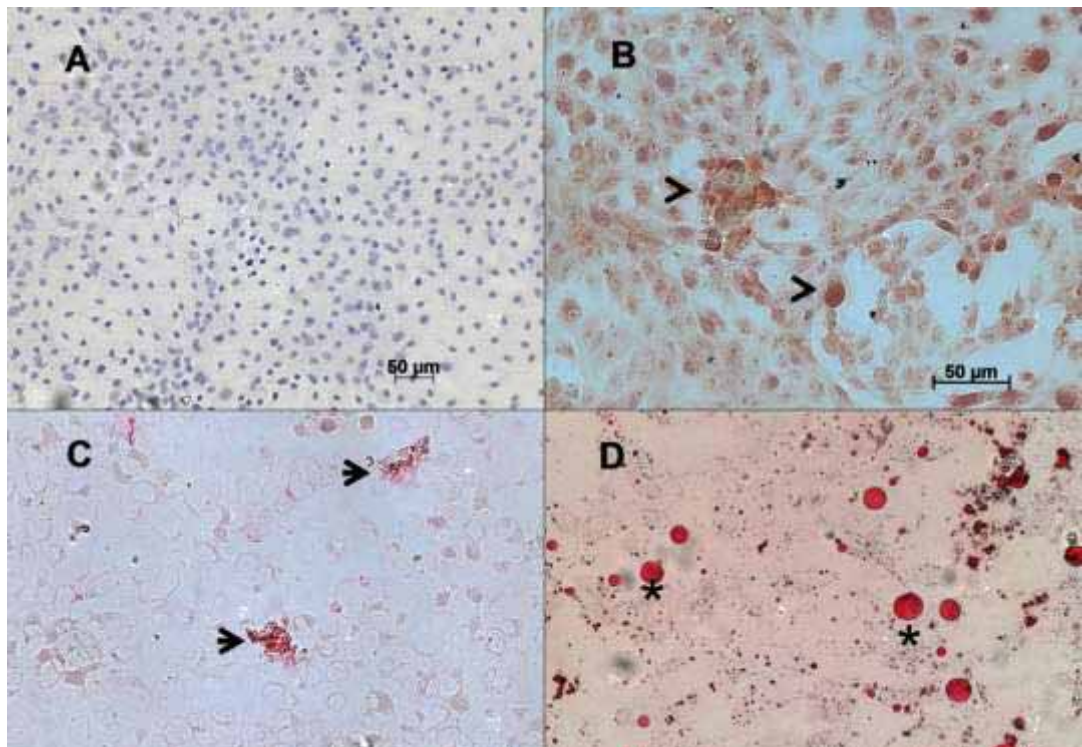


FIGURA - 8 A: CTM coradas com hematoxilina. B: CTM diferenciada em células osteogênicas, mostrando deposição de cálcio extracelular (cabeça de seta), coloração de alizarim red. C: Coloração de safranina-O, evidenciando glicosaminoglicanos na matriz extracelular (seta), metacromasia da cartilagem. D: Indução adipogênica positiva, deposição de gotículas de lipídio no citoplasma e no meio extracelular (asterisco), Oil Red.

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de transformação neural das CTM derivadas da GW, após cultura em meio de diferenciação celular suplementado com ácido retinóico e outro meio suplementado com β -mercaptoetanol. Os dois protocolos obtiveram sucesso na diferenciação das CTM em células semelhantes a neurônios. A cultura contínua durante 28 dias resultou em células com morfologias variadas, algumas vezes longas e dotadas de processos alongados que lembrava axônios nos dias 7, 14, 21 e 28 (Figura 9 A-D). Além disso, foi observada a presença de células com longas projeções (Figura 10A), muito semelhantes a neurônios e a oligodendrócitos com base na morfologia de células fusiformes, formando múltiplas redes (Figura 10C e 10D). Além disso, as células semelhantes a neurônios exibiram morfologia neuronais distintas, que vão desde simples

bipolares até grandes, amplamente ramificados como células multinucleadas. Assim, após 28 dias de indução neuronal, as células CTM derivadas do cordão umbilical foram capazes de gerar células semelhantes tanto às neuronais, como as gliais.

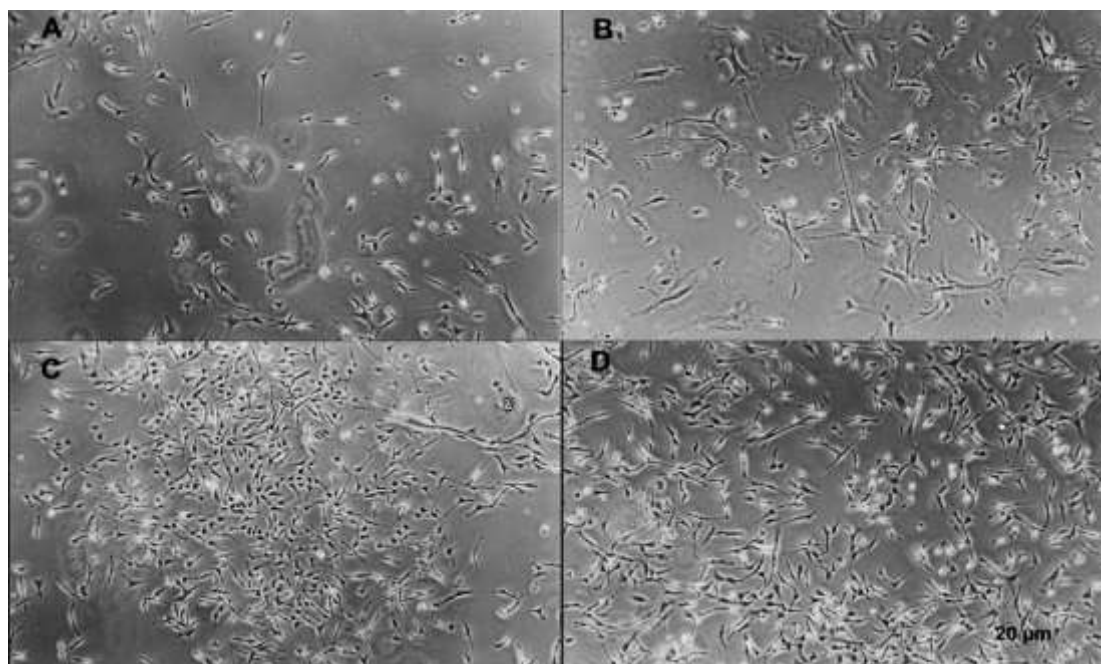


FIGURA – 9 A: Estágio inicial da diferenciação com células de aspecto alongado, ramificadas. B: Diferenciação das CTM com o β -mercaptoetanol. C: CTM pós diferenciação com ácido retinóico. D: Células neuronais já estimuladas a diferenciar e mantidas no meio neurobasal B-27.

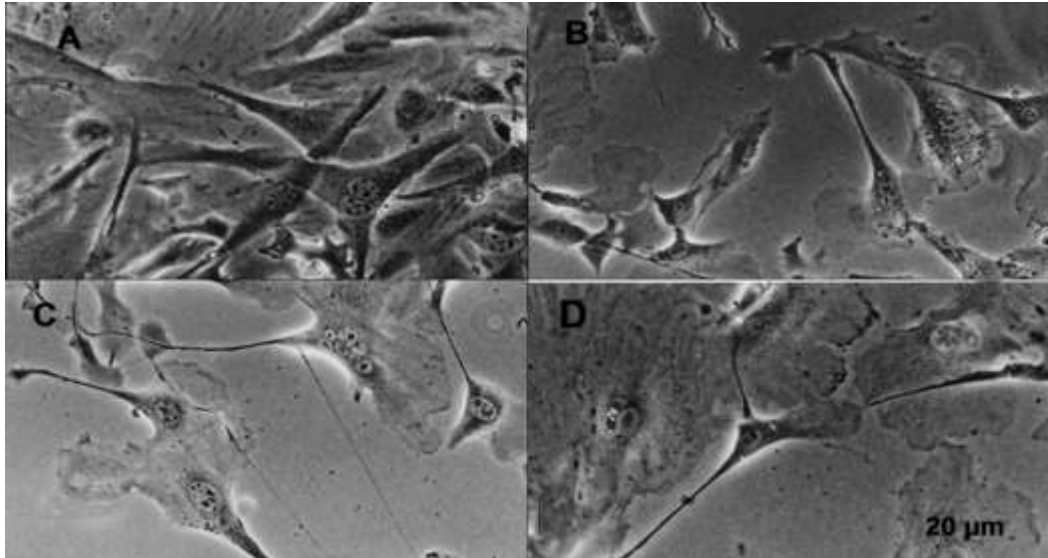


FIGURA – 10 Células neuronais já estabelecidas no cultivo celular. A: Células neuronais, estágio de divisão celular. B: Células neuronais pós diferenciação com o β -mercaptoetanol . C: Diferenciação com ácido retinóico. D: Diferenciadas e mantidas com meio neurobasal B-27

6.4 ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE CÉLULAR E EXPRESSÃO GÊNICA

A técnica de imunofluorescência foi utilizada de forma conjunta com a citometria de fluxo, para avaliar a expressão de marcadores fenotípicos de superfície das CTM e das células neuronais, após a sua diferenciação. As CTM foram caracterizadas pela expressão imunofluorescente de vimentina (Figura 11A) e ausência de marcação para citoqueratina (Figura 11B). A confirmação da característica mesenquimal da célula tronco foi verificada pela ausência da marcação dos antígenos de células epiteliais (citoqueratina) e ausência da expressão do CD45 e CD34 (Figura 11C e 11D, respectivamente).

A imunofenotipagem das CTM bovina indiferenciadas mostrou células positivas para os marcadores CD 105, CD29, CD73 e CD90 (Figura. 12) e negativo para CD45 e CD 34. A população de células negativas para a imunomarcação avaliada, somada a autofluorescência, gerou a formação do histograma negativo que está presente em todas as mensurações (Figura 12 e 13A). A expressão de marcadores neuronais como N200, MAP2, NT3, Tau e GFAP foi de 75-100% (Tabela 3), confirmando a diferenciação das células

tronco mesenquimais (Figura 13B-14). As células neuronais apresentaram menor afinidade pelos marcadores nestina, CXCR4, Tuji, com 50-75% de marcação. Quando se avaliou o marcador para citoesqueleto ubiquitina mostrou positividade de 25-50% para as células neuronais e CTM. A expressão do marcador neuronal de fenda sináptica (SNAP-25) foi de aproximadamente 20% das células.

A citometria de fluxo mostrou resultados semelhantes aos observados na caracterização imunofenotípica por imunofluorescência, tanto para as células mesenquimais indiferenciadas quanto para as células semelhantes a neurônios, que foram avaliadas com 28 dias da neuro-diferenciação (Figura 12; 13; 15). A RT-PCR confirmou a presença de nestina, N200, β -tubulina III (Tuji), GFAP e NT3 mRNA (Figura 16).

Tabela 3 - Quantificação dos marcadores de células semelhante a neurônios derivadas da CTM bovinas, com 28 dias de diferenciação neuronal.

Marcador	Células semelhantes a neurônios	CTM-GW
Nestin	+++ ^a	-
MAP2	++++	-
GFAP	++++	-
N200	++++	+
NT3	++++	-
TuJ1	+++	-
Tau	++++	-
Ubiquitina	++	++
SNAP-25	+	-
CXCR4	+++	-
IgG bovina	-	-
IgM bovina	-	-

^a Valores foram determinados pela contagem visual de células positivas (-, 0%; +, 0-25%; ++, 25-50%; +++, 50-75%; +++++, 75-100%).

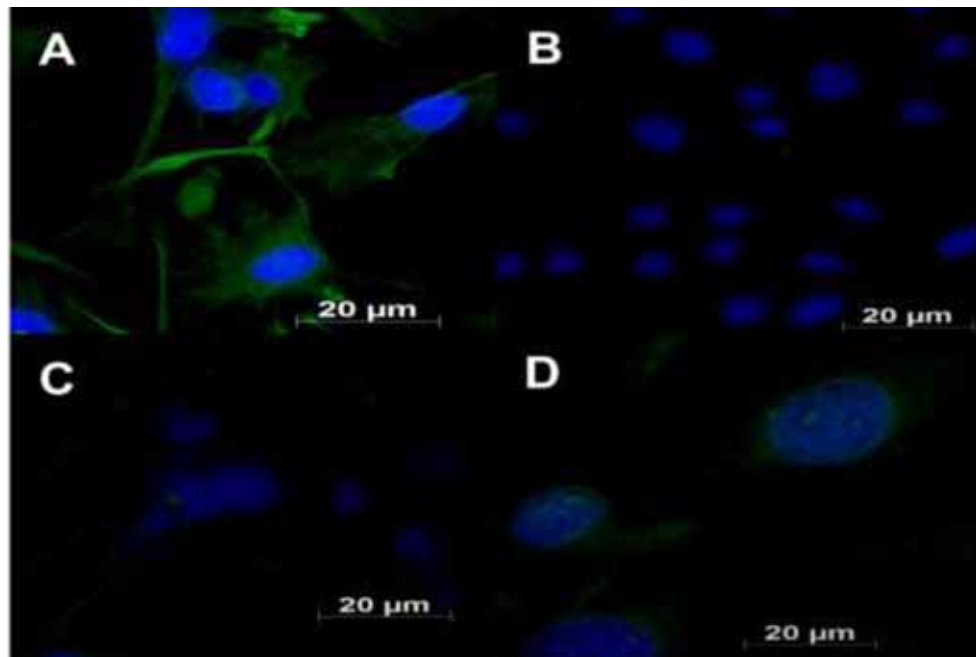


FIGURA - 11. Fotomicrografia das CTM após o 30º dia de diferenciação. A: Células neuronais positivas para a imunomarcacão com vimentina. B: Negativas para a marcação com citoqueratina. C: Negativa para a marcação com CD 45. D: Negativa para a marcação com CD 34. DAPI marcação nuclear.

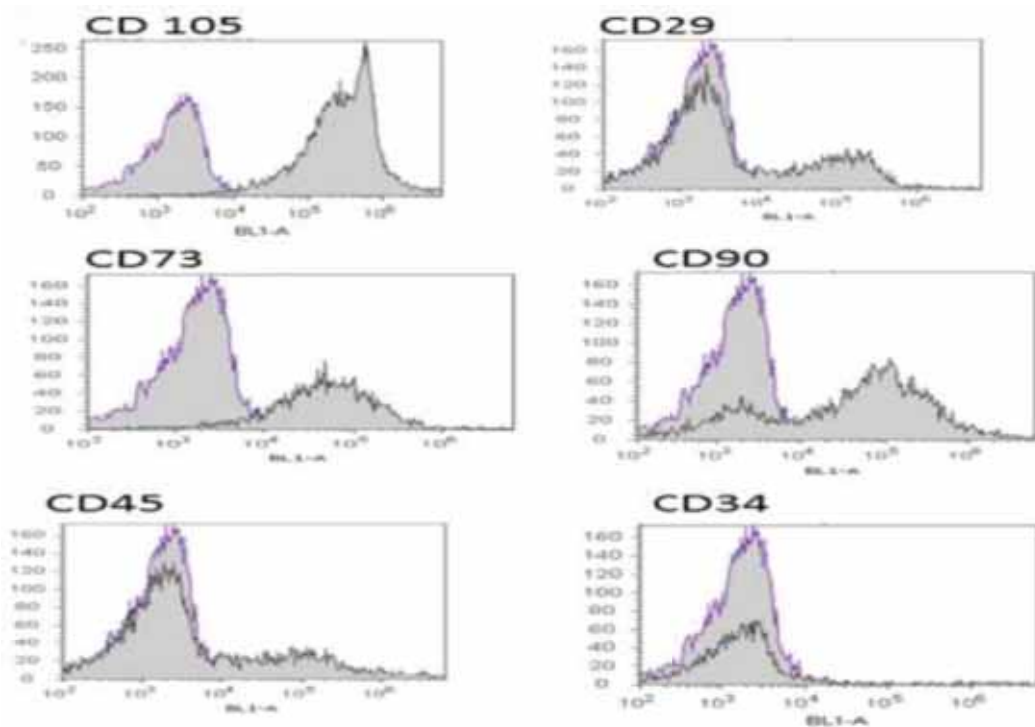


FIGURA 12 – Citometria de fluxo para avaliar a expressão de marcadores de superfície nas células tronco mesenquimais bovina. As CTM foram positivas para CD 105; CD 29; CD73 e CD90 e negativa para as imunomarcacões CD 45 e CD34. Os dados foram processados em citômetro Attune™ e autofluorescência foi excluída na compensação global ($\leq 10^3$). O eixo Y representa a escala logarítmica.

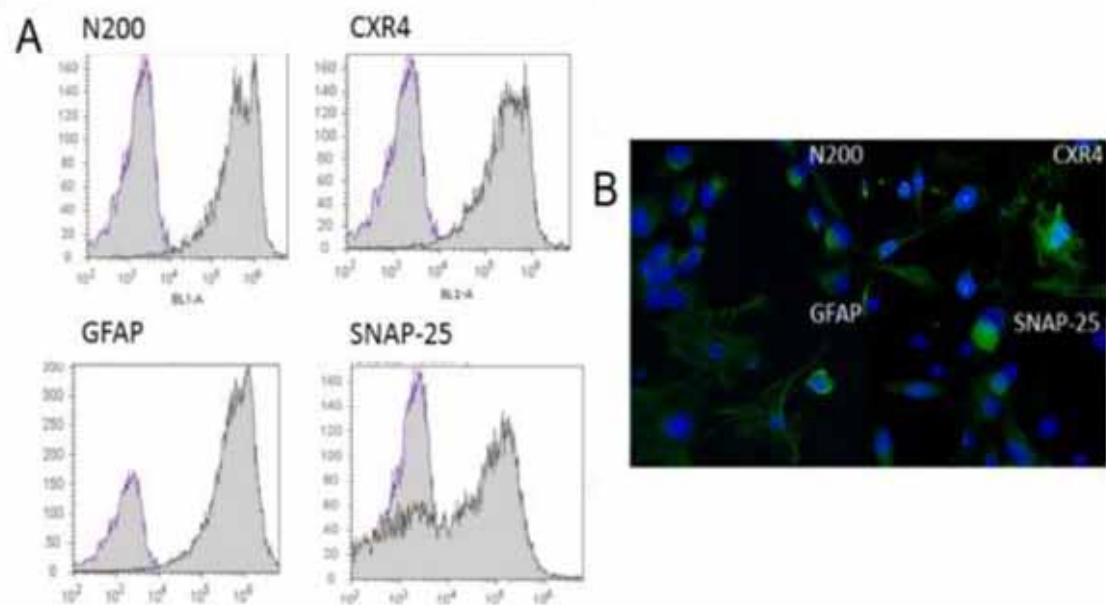


FIGURA 13 – Expressão dos marcadores de células neuronais após a diferenciação neuronal. A - Resultados da Citometria de fluxo (citômetro Attune™) e autofluorescência excluída na compensação global ($\leq 10^3$). O eixo Y representa a escala logarítmica. B. Reação de imunofluorescência para marcadores neuronais. DAPI coloração do núcleo.

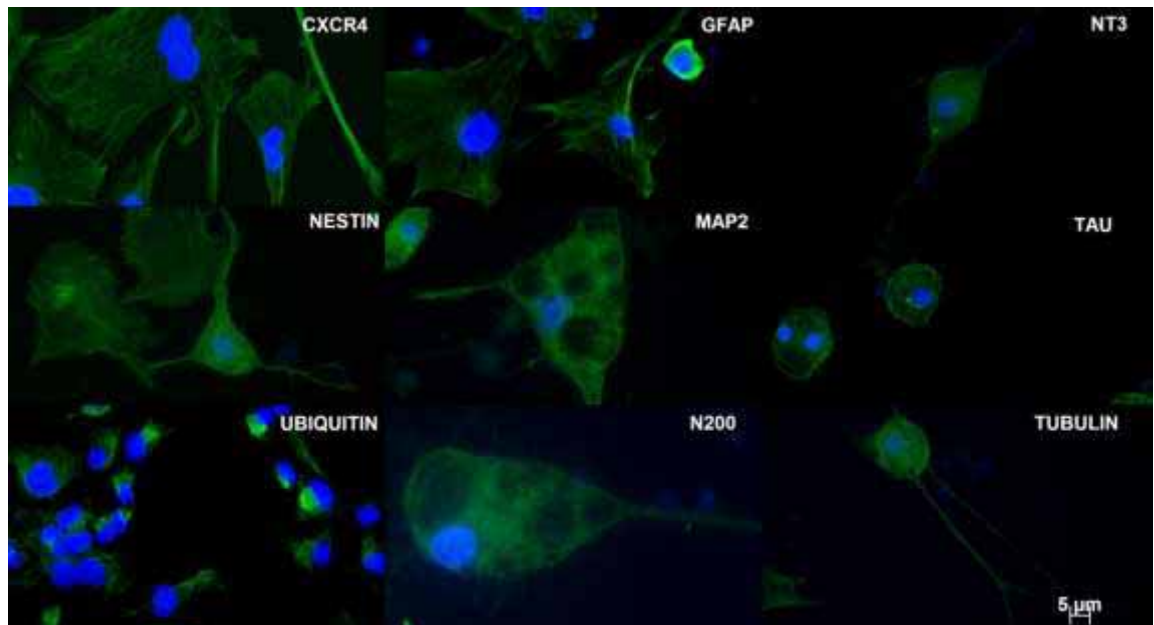


FIGURA 14 – Marcadores de superfície das células semelhantes a neurônios. Imunofluorescência mostrando a expressão dos marcadores neuronais CXCR4; GFAP; NT3, nestin, MAP2, Tau, Ubiquitin, N200 e Tuji. DAPI marcação nuclear.

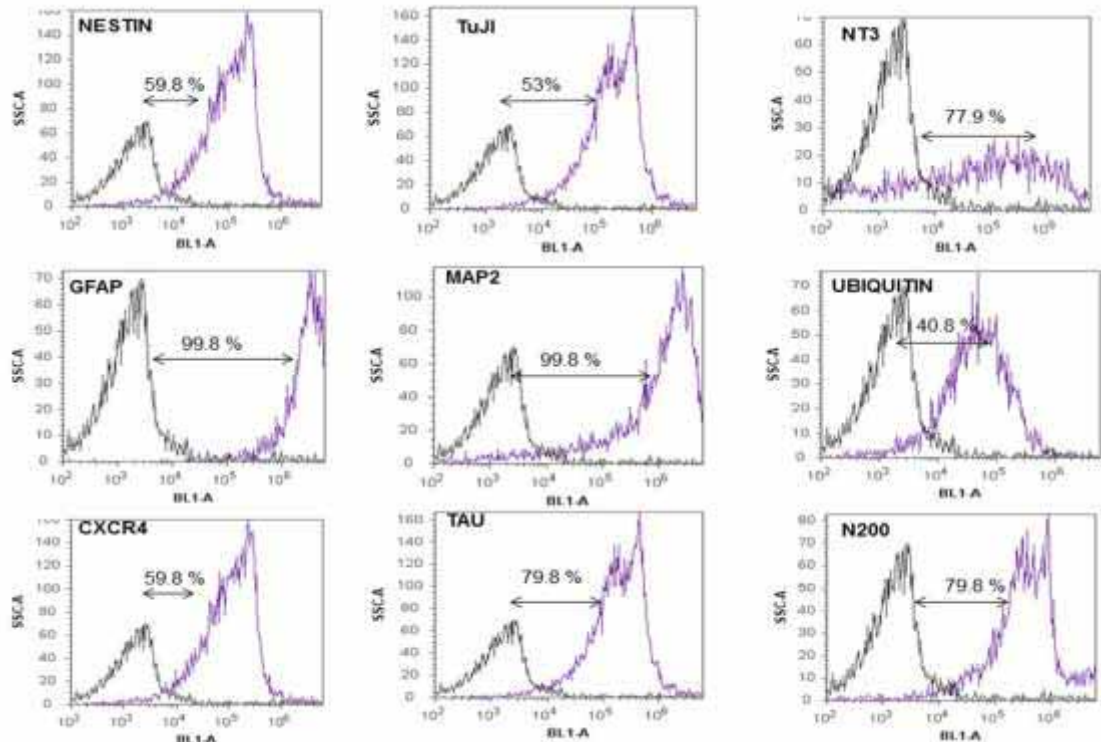


FIGURA 15 – Fenótipo das células neuronais. Análise de citometria de fluxo para os marcadores de superfície neuronal, após 28 dias de diferenciação. Os histogramas são representativos do controle negativo e positivo para os marcadores de superfície das células neuronais. Autofluorescência foi excluída na compensação global ($\leq 10^3$). O eixo Y representa a escala logarítmica.



FIGURA 16 – Eletroforese em gel de agarose (12%), corado com brometo de etídeo. Produtos de DNA amplificado por RT-PCR para os genes específicos de células neuronais após a diferenciação. H2A controle interno. MW – Peso molecular de 1Kb.

6.5 SUSCEPTIBILIDADE CELULAR AO BoHV-5

Estabelecidas como uma linhagem celular, as CTM foram testadas de acordo com a sua capacidade de isolamento e multiplicação viral no cultivo celular. Estas células mostraram ao longo dos períodos de 24h, 48h, 72h, 96h e 120h, alterações significantes, que se iniciaram após 24h com alterações sutis, como vacuolização de raras células. As alterações no cultivo celular progrediram ao longo do tempo, principalmente a partir de 48h, exibindo perda da homogeneidade do tapete celular, por morte celular, efeito citopático (ECP) e formação de células sinciciais multinucleadas. A figura 18 ilustra as alterações celulares acompanhadas ao longo de 5 dias, onde se tornaram evidentes as do tipo estrutural causadas pelo vírus, iniciadas com 48h p.i, aumentando em intensidade e quantidade ao longo de 120h p.i. As alterações pós infecção foram caracterizadas pela formação de células sinciciais, descontinuidade do tapete celular, presença de restos celulares, e morte celular (Figura 18). A titulação viral para as CTM bovina mostrou aumento progressivo do título viral, atingindo maior titulação com 96 h p.i. e depois regredindo (Figura 17A).

A susceptibilidade das CSN para BoHV-5 foi investigada através da avaliação da curva de crescimento viral, viabilidade celular e pela citopatologia. A curva cinética de crescimento viral para células semelhantes a neurônios infectadas foi estabelecida (Figura 17B), título viral máximo foi observado às 72 horas após a inoculação. O ECP foi avaliado como uma medida indireta, pela difusão viral, alteração na morfologia das CSN, os antígenos virais e DNA viral que foram monitorados. Após a infecção o ECP foi definido pelo alargamento dos ramos neuronais (Figura 19A-D), por aparecimento de vesículas de diversos tamanho (Figura 19E-F). Os antígenos para BoHV-5 foram detectados por imunofluorescência (Figura 20A) e replicação viral foi detectada por hibridização *in situ*, 96 h após a inoculação. A marcação do DNA viral foi observada quase exclusivamente na região perinuclear de neurônios infectados e variou de esporádica a denso acúmulo de granulações ao longo dos ramos

neurônais (Figura 20B). A PCR tempo real mostrou que a expressão da glicoproteína-C (gC) pelas células semelhantes a neurônios foi no período de 72h p.i. (Figura. 21). Quase 60% dos neurônios demonstrou ativa replicação do DNA viral 72-96 h após a inoculação (500 células por período em dois experimentos paralelos) (Figura 22).

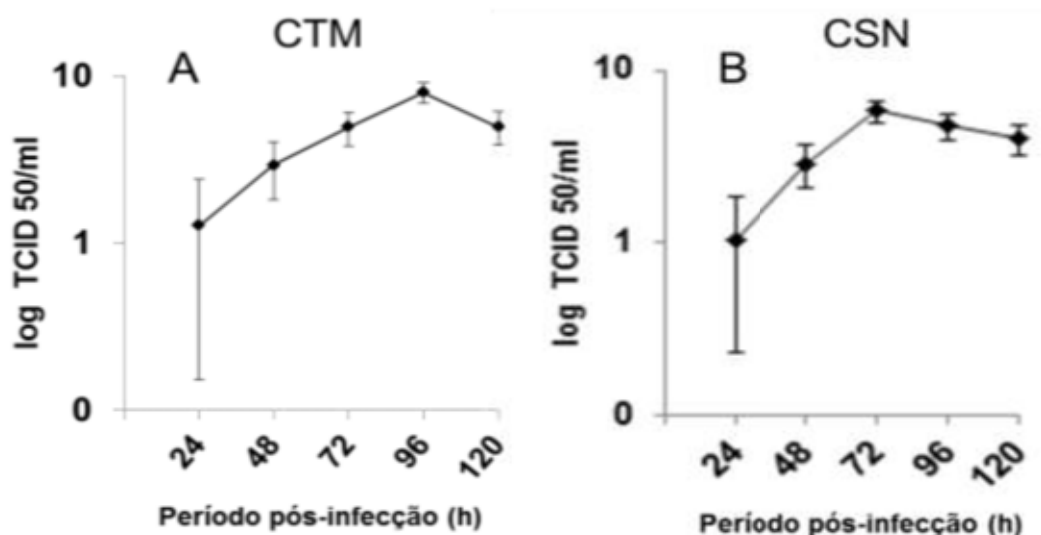


FIGURA 17 - Curva de crescimento viral mostrando pico de proliferação do BoHV-5, associado ao aparecimento do efeito citopático. A – CTM 96 h p.i.; B – CSN 72 h p.i.

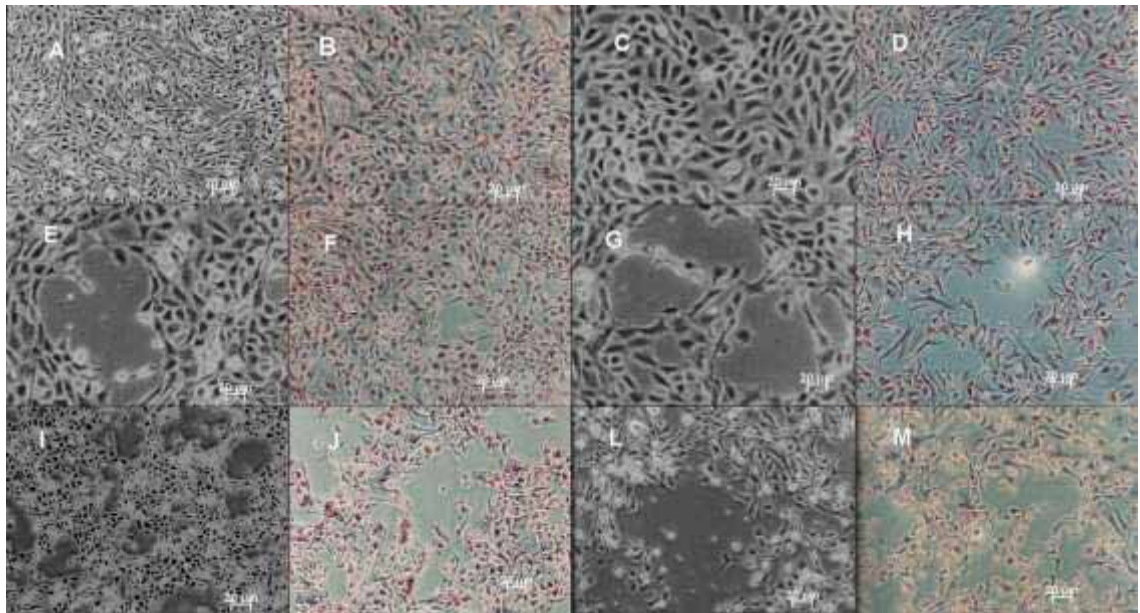


FIGURA – 18 A e B: Controle negativo do cultivo de CTM, não infectadas. C e D: Cultivo de CTM em presença do Bohr- 5, após 24 h de infecção, sem alterações significativas. E e F: CTM após 48 h da infecção pelo BoHV-5, alterações na integridade do tapete celular e ECP discreto. G e H: CTM, após 72 h da infecção, ECP evidente e células sinciciais . I e J: Cultivo de CTM após 96 h, ECP evidente, alteração acentuada do tapete celular. L e M: Cultivo da CTM após 120 h, EFC e “debris” celulares. A, C, E, G, I e L: não coradas ; B, D, F, H, J, M: coradas pela coloração de hematoxilina.

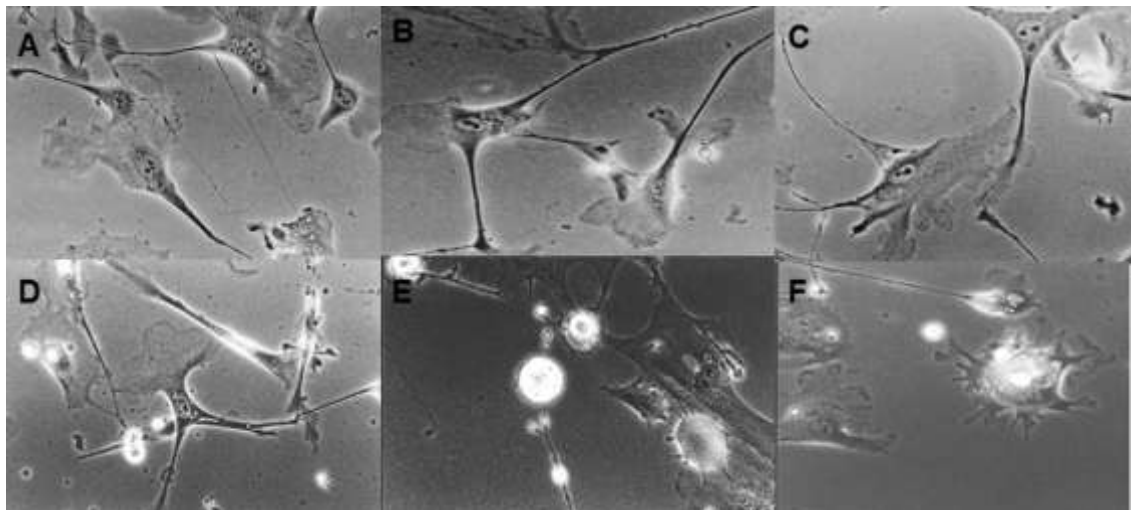


FIGURA 19 – CSN infectadas com o BoHV-5 demonstrando efeito citopático. A) Não infectada; B e C) Formações de vesículas entre as células neuronais, 24 h e 48h p.i.; D-F) Formação de vesículas, ramificações celulares aumentadas e diminuição das ligações celulares, 72 a 120 h p.i.

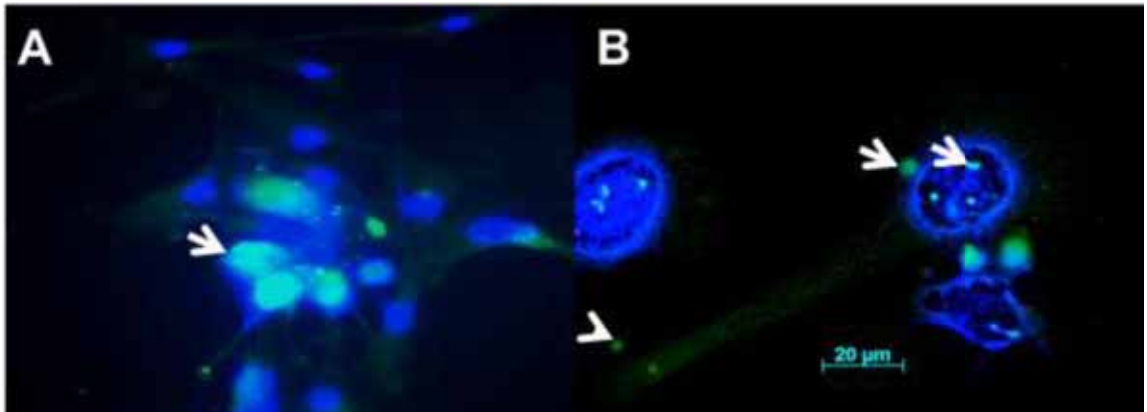


FIGURA 20 – Identificação da infecção pelo BoHV-5. A) Imunomarcção positiva para a proteína gC do BoHV-5 no período de 72 h p.i. (seta). B) Imunomarcção positiva na forma granular no núcleo das células (seta), no meio extracelular (seta) e ao longo dos prolongamentos celulares que lembra axônios (cabeça de seta), utilizando a técnica de hibridização *in situ*.

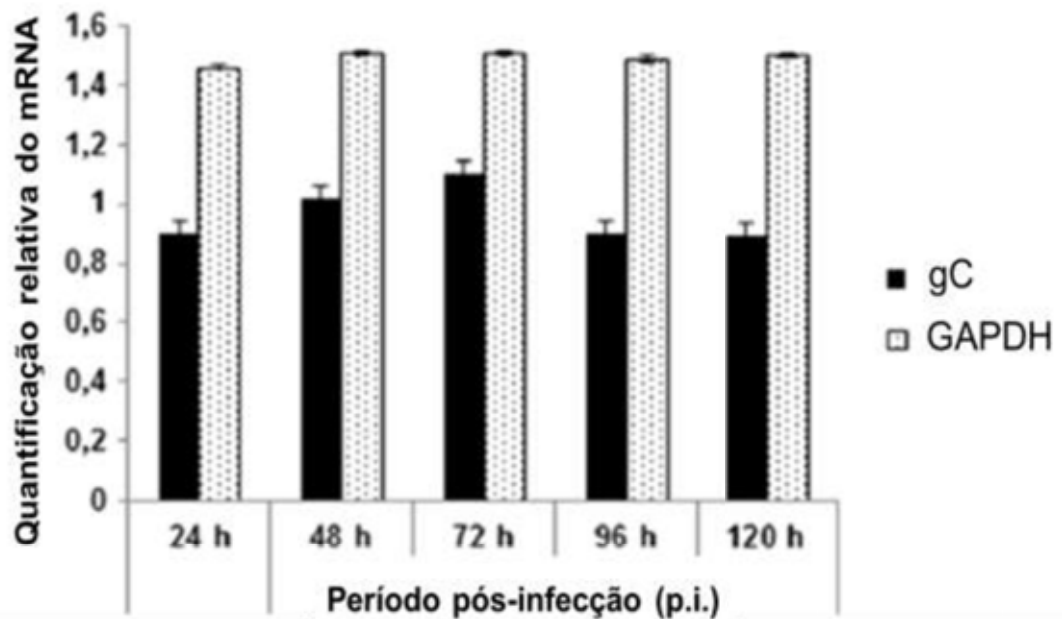


FIGURA 21 – Quantificação dos níveis de RNAm, segundo a metodologia da qPCR $\Delta\Delta$ Ct, comparado com a expressão do gene controle GAPDH. A expressão dos níveis da gC durante os momentos de 24 a 120 h p.i. não mostrara diferença estatística ($p > 0,05$).

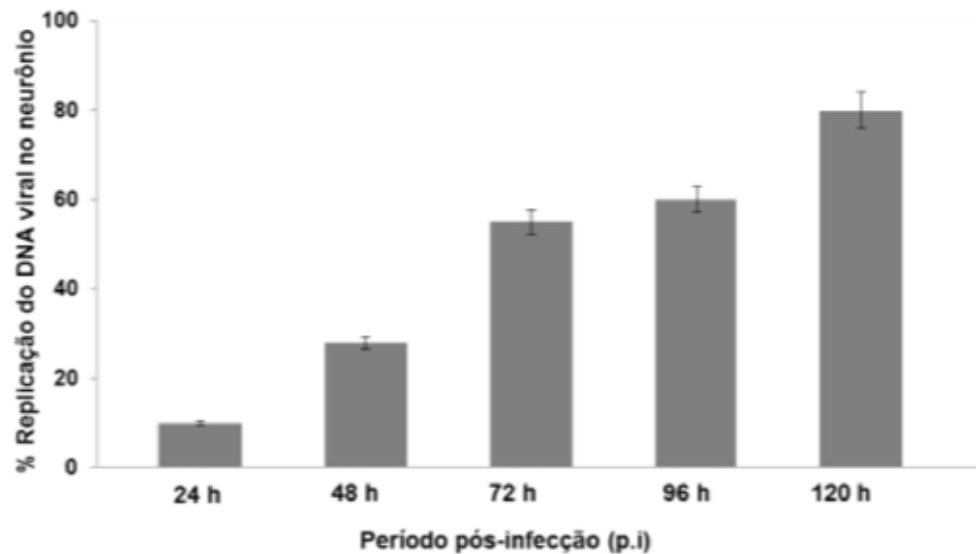


FIGURA 22 - Porcentagem de CSN positivas na hibridização para BoHV-5, nos períodos pós infecção.

6.6 VIABILIDADE DAS CELULAS NEURONAL

A redução do componente MTT pela mitocôndria foi utilizado para avaliar a viabilidade celular das células neuronais, após a infecção viral com o BoHV-5 em diferentes momentos pós a infecção viral (24, 48, 72, 96, 120h). Foi observado que em todos os tempos de avaliação, das células neuronais mostraram menores valores de absorvância quando comparadas ao controle (Figura 23). Estes resultados demonstram que o tempo para o desenvolvimento de alterações celulares na linhagem neuronal resultou na redução da produção do componente MTT pelas mitocôndrias, após 120 h da presença do vírus no cultivo celular, pois a diferença entre os valores de absorvância no grupo de células infectadas e controle torna-se mais evidente.

No quinto dia da infecção viral as células neuronais mostraram atividade mitocondrial reduzida, exibindo a atividade do vírus frente às células neuronais, promovendo alterações letais que são responsáveis pela diminuição na expressão da substância MTT, com menor absorvância e conseqüentemente menor número de células viáveis.

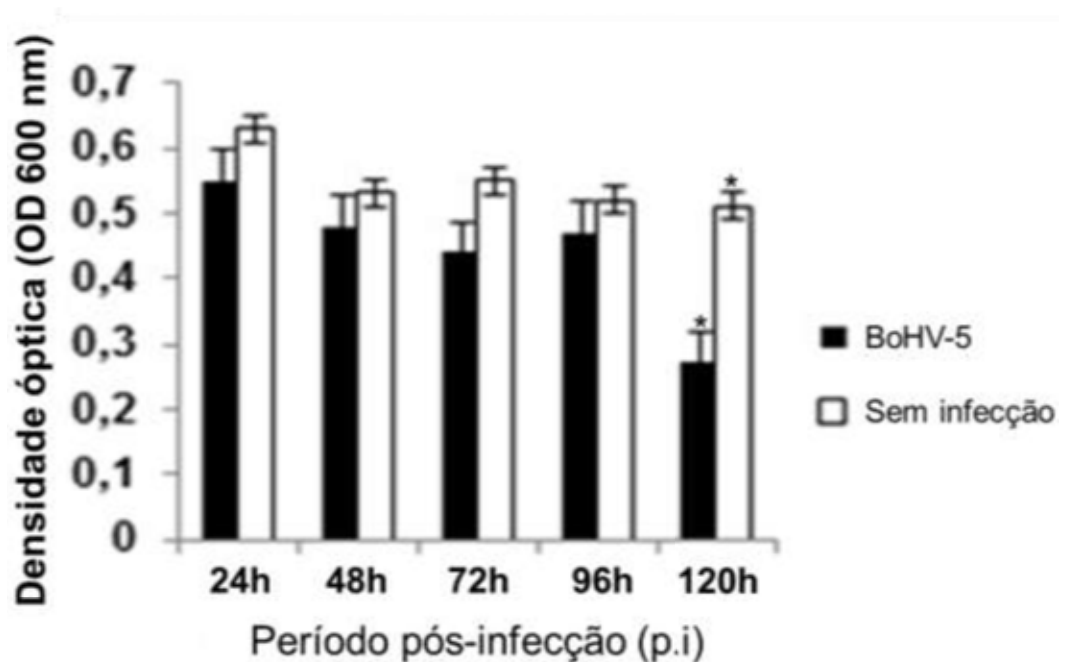


FIGURA 24 – Avaliação da viabilidade de células CSN pós infecção pelo BoHV-5 e sem infecção, por mensuração do MTT no meio de cultura nos, diferentes momentos pós infecção. Os valores são expressos como a média \pm desvio padrão. * Diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$)

7 DISCUSSÃO

O cultivo de todos os cordões umbilicais bovinos forneceram CTM, as quais foram cultivadas até o período P60, com morfologia semelhante a fibroblastos. Estas células apresentaram propriedades aderentes, intensa capacidade proliferativa *in vitro*, mantendo as suas características morfológicas e de crescimento, durante sucessivos recultivos, durante todo o estudo. A possibilidade de obtenção das CTM do cordão umbilical humano sem a utilização de processos enzimáticos, como na presente pesquisa, foi recentemente estabelecida, no entanto poucos relatos descrevem este procedimento em modelos animais (KOCH et al., 2007). Muitos grupos de pesquisa utilizam o tratamento enzimático para o isolamento e cultivo das células tronco, tais como: colagenase, hialuronidase ou tripsina, podendo ser associada com ou não à remoção mecânica das células tronco do cordão umbilical (CREMONESI et al., 2008). Os efeitos da atividade enzimática durante o isolamento de células são caracterizados por diminuir a viabilidade

celular, degradação dos receptores de superfície e alteração da função celular (WEISS et al., 2008). A não utilização da digestão enzimática para o isolamento das CTM eliminou a possibilidade de alterações celulares, favorecendo o isolamento e propagação das células no cultivo (DE BRUYN et al., 2011; WEISS et al., 2008), fatores que podem explicar o sucesso dos resultados na obtenção das células tronco, provenientes dos cinco cordões umbilicais.

O soro fetal bovino (SFB) é tradicionalmente utilizado no cultivo celular para diferentes finalidades, sendo já amplamente conhecido que o soro proveniente de bovino pode transmitir diferentes tipos de patógenos. Estas infecções são constituídas por fungos, bactérias (*Mycoplasma* sp.), vírus (BVDV – vírus da diarreia viral bovina e herpesvírus bovino tipo 1 e 5) (MERTEN, 2002). Com o objetivo de eliminar possíveis fatores que prejudicassem o desenvolvimento das células tronco, optou-se pela não utilização desse constituinte no meio de cultura. Em humanos, a utilização de meio livre de soro fetal bovino para expansão das células tronco mesenquimais é uma realidade, mostrando melhores resultados de proliferação celular, quando comparados com meios contendo o soro (ANZALONE et al., 2010). As CTM têm mostrado algumas particularidades relacionadas com a origem tecidual de onde são isoladas. Uma delas é a dependência que têm demonstrado com SFB para capacitação das propriedades de diferenciação em outros tipos celulares (ANZALONE et al., 2010). A diferenciação das células tronco em osteócitos, condrócitos, células adiposas e CSN, derivadas das células isoladas da GW bovina, permite afirmar que estas células não precisam do SFB para tornar-se capacitadas a se diferenciar em outros tipos celulares.

O método de espectrofotometria baseado nos produtos de degradação da mitocôndria foi originalmente desenvolvido como uma análise rápida do crescimento e sobrevivência, fundamentado na transformação e quantificação do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium). A cadeia respiratória e outros sistemas de transporte de elétrons reduz o MTT em sais de tetrazolium, formando os cristais de formazan dentro das células. A

quantificação desses cristais é determinada pela espectrofotometria para estimar o número de células viáveis (FREIMOSER et al., 1999). A viabilidade das CTM foi estimada pela atividade mitocondrial, revelando significativa adaptação em meio de cultura, sem adição de SFB para a multiplicação celular.

As CTM apresentaram cariótipo normal após a cultura *in vitro*. Os procedimentos empregados na presente pesquisa para o cultivo de células tronco, não alterou a organização dos cromossomos, que segundo Zucconi et al. (2010) pode ser detectada pelas técnicas de citogenética. Associada a esta constatação a atividade da telomerase mostrou-se aumentada. Esta enzima representa uma transcriptase reversa que frequentemente diminui após as divisões, controlando a viabilidade celular e apoptose. As células germinativas, células tronco e células neoplásicas expressam elevados níveis de atividade telomérica. Por apresentarem atividade telomérica aumentada estas células apresentarem telômero de maior comprimento e capacidade de replicação ilimitada, como observado nas CTM isoladas de fetos caninos (DE BRUYN et al., 2011). Estas observações complementam os achados da presente pesquisa relacionadas com a sobrevida das CTM bovina em cultura que pode ser explicada pela atividade da telomerase e maior extensão do telômero.

A capacidade de diferenciação foi confirmada pela habilidade das CTM bovinas se diferenciarem em osteócitos, condrócitos, adipócitos e CSN. Existe relato de que as células tronco derivadas do cordão umbilical mostram aparentemente maior tendência a diferenciação osteogênica do que células tronco isoladas de outros órgãos (CHANG et al., 2006). Neste estudo as CTM bovinas mostraram acúmulo de nódulos minerais com 4 semanas de cultivo, na ausência de indução osteogênica. Em conformidade, com os achados de Chang et al. (2006) a diferenciação adiposa ocorreu no 10º e 15º de cultivo, muito semelhante ao observado nas CTM humanas de cordão umbilical. Os achados indicam que as células tronco bovinas têm grande capacidade para a diferenciação dos osteócitos e adiposa, contrastando com as observações feitas por Koch et al. (2007) de células isoladas dos vasos do cordão umbilical

equino que necessitou da adição de soro de coelho no meio para a diferenciação adiposa. A diferenciação condrogênica e nas células neuronais também foram realizadas com sucesso, derivadas de população homogênea de células tronco, as quais exibiram fenótipo mesenquimal, pela expressão dos genes OCT4 e SH3 e imunomarcação, como constatado por Raoufi et al. (2011).

As CTM exibiram propriedades específicas de tecidos mesenquimais. Os antígenos de superfície expressos por estas células foram CD105, CD29, CD 73, CD90. A imunomarcação negativa após a utilização dos marcadores hematopoéticos CD 34 e CD 45, pode indicar que as CTM apresentam falta de reatividade com os progenitores hematopoéticos, devido a não contaminação do cultivo com células tronco hematopoéticas derivadas de coágulos sanguíneos (WEISS et al., 2008). Outra possibilidade da marcação das células tronco por estes marcadores seria a não reação cruzada entre os anticorpos com os antígenos de superfície das células bovinas. Inúmeros estudos descrevem as características de diferenciação das células tronco do cordão umbilical humano, o mesmo ocorrendo para os animais (TROYER; WEISS, 2008). No entanto, as características que definem as células tronco mesenquimais são ainda controversas, necessitando para a sua caracterização de pelo menos 10 marcadores, sem contar a imunomarcação realizada para os antígenos OCT3/4 e Nanog. Dessa forma, a nomenclatura para muitas CTM é sugerida como células mesenquimais com elevada potencialidade para a diferenciação em outros tipos celulares (LE BLANC et al., 2006).

Diversos estudos têm descrito a capacidade das células da geleia de Wharton de uma variedade de espécies animais em se diferenciar em neurônios e/ou células gliais *in vitro* (CREMONESI et al., 2011). O protocolo mais comumente aplicado para induzir células MSC indiferenciadas a se diferenciar em células semelhantes a neurônios se baseia no tratamento com bFGF (factor de crescimento de fibroblastos básico), dimetilsulfóxido (DMSO) e butilatodihidroxi-anisol (BHA) (SALGADO et al., 2010). Algumas diferenças também foram descritas na utilização de ácido retinóico (AR) e/ou insulina

associada com hidrocortisona (SEAL; WHETSTONE, 1994). O ácido retinóico é um derivado do retinol que é a forma ativa da vitamina A. O AR funciona como um ligante específico para o receptor de ácido retinóico na via de sinalização, o que é necessário no desenvolvimento embrionário, na formação óssea, e na manutenção de estruturas normais do epitélio. A adição de AR no meio de indução tem demonstrado influenciar na diferenciação neuronal e melhorar a sobrevivência de células (SEAL; WHETSTONE, 1994).

A composição precisa do meio de cultura é crítica para evitar resultados inconsistentes, especialmente quando os reagentes são obtidos a partir de fontes diferentes. No que diz respeito a AR, a maioria dos métodos de indução neural em CTM de humanos ou roedores empregam uma combinação de AR com outros agentes químicos, citocinas e fatores de crescimento (SALGADO et al., 2010; CHUA et al., 2009; CHOONG et al., 2007). No presente estudo, um meio comercialmente definido com nenhum suplemento foi utilizado para facilitar a multiplicação celular no meio de cultura. Outra vantagem do meio de cultura desenvolvido foi aderência natural das células semelhantes a neurônios (CSN) aos frascos plásticos. Este fenótipo é diferente das células tronco neuronais derivadas de cérebro fetal, tecido que necessita de um substrato específico para iniciar a diferenciação (PUGAZHENTHI et al., 2011).

Coletivamente, os resultados aqui apresentados indicam que é possível derivar CSN a partir de CTM derivadas do cordão umbilical bovino. Estas células diferenciadas mantêm idêntica morfologia e viabilidade celular após 28 dias de cultivo *in vitro* em meio comercial. Além disso, não há questões éticas na utilização *in vitro* de células de cordões umbilicais ao contrário de cérebros fetais. Seguindo a diferenciação neuronal, as CSN claramente exibiram seu potencial neurogênico, expressando clássicos marcadores neuronais tais como N200, MAP2, NT3, Tau e GFAP. Nestina, CXCR4, TuJ1 e SNAP-25, também foram detectados, mas em intensidades menores.

É importante notar que nenhum destes marcadores neuronais foram detectados em células indiferenciadas, sugerindo que as células tronco não foram provenientes do sistema nervoso central. No entanto, um estudo anterior

usando CTM suína da GW descreveu semelhantes níveis de expressão de enolase neuronal específica (ENE) em células diferenciadas e indiferenciadas (CHOONG et al., 2007). Esta descoberta tem sido também relatada para as células estromais da medula óssea isolada a partir de ratos, suínos e seres humanos (SALGADO et al., 2010; CHUA et al., 2009). Neurofilamentos e GFAP, ambas consideradas importantes proteínas neuronais/gliais, foram encontrados igualmente expressas nas CTM indiferenciadas e diferenciadas, usando AR como um indutor neuronal para as células estromais de medula óssea humana (CHUA et al., 2009). Além disso, análise por citometria de fluxo revelou que CTM derivadas da GW diferenciadas expressam NT3, GFAP, MAP2, Tau, e N200. Esta descoberta indica a presença de precursores neuronais, de neurônios e células gliais na mesma cultura. Resultados semelhantes foram relatados com progenitores neurais humanos obtidos a partir de sangue do cordão umbilical, mas sem haver expressão de GFAP que foi detectada neste ensaio (SALGADO et al., 2010; CHUA et al., 2009).

Assim, a fenotipagem das células CSN revelou que mais de 80% da população inicial de células se tornaram diferenciadas e expressaram receptores neurológicos após 28 dias de indução. Este período de tempo foi inferior quando comparado com as células tronco neurais produzidas a partir de cérebro fetal em humanos (PUGAZHENTHI et al., 2011), mas semelhante a um estudo realizado em cães usando geleia de Wharton (URANIO et al., 2011).

Os vírus de RNA e DNA neurotrópicos que produzem doenças do sistema nervoso central em humanos e animais utilizam uma variedade de mecanismos patológicos. Para os membros da subfamília α -Herpesvirinae, quase todos os tipos e áreas do sistema nervoso foram identificadas como alvos para a replicação viral (CHOWDHURY et al., 2002). Embora muitos estudos tenham sido realizados *in vivo* utilizando coelhos e bovinos, é difícil de examinar o mecanismo de replicação celular do BoHV-1 em neurônios de bovinos infectados. Estudos *in vitro* cultivando neurônios de coelhos têm sido utilizados para o entendimento dos mecanismos de replicação do BoHV-5 nas

células neuronais e para elucidar os mecanismos da interação vírus-célula (PEREZ et al., 2002).

Devido a esta dificuldade em sistemas *in vitro*, a implementação do princípio dos 3Rs de Russel e Burch (1992) é necessária para estudar interações primárias hospedeiro-vírus (PEREZ et al., 2002). Devido à relevância clínica da subfamília α -Herpesvirinae, modelos *in vitro* são muito apreciados para substituírem os estudos com animais. Além das considerações de ordem ética, estudos *in vitro* eliminariam potenciais fatores que geram dúvidas como a variação individual do animal e fatores ambientais (PEREZ et al., 2002).

Ambos os vírus herpes simples 1 (HSV-1) e BoHV-1/5 estabelecem infecções latentes ao longo da vida de coelho e em gânglios nervosos sensoriais de bovinos (PEREZ et al., 2002). Vários dias após a infecção por HSV-1 e BoHV-1/5, alguns neurônios são produtivamente infectados (fase aguda) (PEREZ et al., 2002). Outros neurônios, no entanto, tornam-se latentemente infectados (MEYER et al., 2001). No presente estudo, a ausência de CSN flutuantes após a infecção por BoHV-5 sugere uma baixa taxa de morte celular. Isto foi confirmado pelos resultados do ensaio de MTT que mostram viabilidade celular elevada e 60% de positividade para o vírus na hibridização *in situ*. Estes resultados podem ser explicados através da expressão de uma região associada à latência (LTR), gene que está envolvido na sobrevivência neuronal durante a infecção do HSV-1 *in vitro* (DELHON et al., 2002).

Além disso, a replicação *in vitro* nem sempre se correlaciona com o comportamento viral *in vivo*. Assim, é particularmente importante notar que os dados obtidos a partir de estudos *in vitro* não representam, necessariamente, a interação hospedeiro-vírus que ocorre *in vivo* (PEREZ et al., 2002). Contudo, os mecanismos moleculares pelos quais vírus produtivos e persistentes produzem doenças de sistema nervoso são diversos e não totalmente esclarecidos. Os resultados obtidos nesta investigação abrem as portas para

perguntas sobre os mecanismos de morte e sobrevivência neuronal após infecção e replicação do BoHV-5.

8 CONCLUSÕES

A presente pesquisa obteve sucesso no isolamento e propagação das células tronco mesenquimais indiferenciadas da geléia de Wharton que foram cultivadas até a passagem P60. As CTM apresentaram características morfológicas e a expressão de antígenos de superfície que permitiram classificá-las como células mesenquimais. A capacidade de diferenciação das CTM mostraram resultados promissores após se obter sucesso com a diferenciação e caracterização das células ósseas, cartilaginosas, adiposas e principalmente neurônios. A propriedade de diferenciação em outros tipos celulares mostra que esta fonte de células tronco tem grande importância para a pesquisa com experimentação celular e principalmente nas terapias que empregam este tipo de células.

O cultivo das CTM e sua diferenciação nas células neuronais permitiram a realização do isolamento do BoHV-5. O vírus mostrou intensa proliferação em ambas as linhagens celulares com o desenvolvimento de efeito citopático e de altos títulos virais que foram confirmados pela técnica de RT-PCR em tempo real para a gC. Os resultados encontrados permitem afirmar que as CSN podem ser uma alternativa viável na elucidação de vários aspectos relacionados com a biologia do BoHV-5, incluindo o neurotropismo, neurovirulência e expressão gênica.

9 REFERÊNCIAS

ANZALONE, R.; LO IACONO, M.; CORRAO, S. MAGNO, F.; LORIA, T.; CAPPELLO, F.; ZUMMO, G.; FARINA, F.; LA ROCCA, G. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological

features and hepatocyte-like differentiative capacity. **Stem Cells Dev.**, v. 19, p.423-438, 2010.

ANZILIERO, D.; SANTOS, C.M.B.; BAUERMANN, F.V.; CARDOZO, L.; BERNARES, L.M.; BRUM, M. C.S.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. A recombinant bovine herpesvirus 5 defective in thymidinekinase and glycoprotein E is attenuated and immunogenic for calves. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, p. 23-30, 2011.

ABRIL, C., ENGELS, M., LIMAN, A., HILBE, M., ALBINI, S., FRANCHINI, M., SUTER, M., ACKERMANN, M. Both viral and host factors contribute to neurovirulence of bovine herpesviruses 1 and 5 in interferon receptor-deficient mice. **J. Virol.** v. 78, p. 3644–3653, 2004.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem Cells.**, v. 25, p. 1384-1392, 2007.

BEN-SHUSHAN, E.; THOMPSON, J.R.; GUDAS, L.J.; BERGMAN, Y. Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. **Mol Cell Biol.**, v. 18, p. 1866-78, 1998.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KLUTER, H.; EICHLER, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Stem cells**, v. 22, p. 625-634, 2004.

BILLON, N.; JOLICOEUR, C.; YING, Q.L.; SMITH, A.; RAFF, M. Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells. **J. Cell Sci.**, v. 115, p. 3657-3665, 2002.

BJORSON, C.R.; RIETZE, R.R.; REYNOLDS, B.A.;MAGLI, M.C.; VESCOVI, A.L. Turning brain into blood a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. **Science.**, v. 283, p. 534-537, 1999.

BLANCO-VIEIRA, F. J.; CARRILLO, B. J.; WEBER, E. L. BARDON, J. C.; COMBESSIES, G. M.; CORDEVIOLA, J. M.; NOSEDA, R.; SONI, C. A.; SCHUDEL, A. A. Casuística neuropatológica. estudio microscópico de los casos clínicos remitidos al programa de vigilancia de BSE em Argentina, durante el período comprendido entre 1994-1996. **Rev. Med. Vet.**, v. 79, p. 226-230, 1998.

BOIANI, M.; SCHOLER, H.R. Regulatory networks in embryo derived pluripotent stem cells. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 6, p. 872-884, 2005.

BOQUEST, A.C.; NOER, A.; COLLAS, P. Epigenetic programming of mesenchymal stem cells from human adipose tissue. **Stem Cell. Rev.**, v. 2, p. 319-329, 2006.

BRETTSCHNEIDER, J.; TUMANJ, H.; KIECHLE, U.; MUCHE, R.; RICHARDS, G.; LEHMENSIEK, V.; LUDOLPH, A.C.; OTTO, M. IgG antibodies against measles, rubella, and varicela zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. **PLoS One.**, v.5; p. e7638; 2009.

CAMPOS, F.S.; FRANCO, A.C.; HÜBNER, S.O.; OLIVEIRA, M.T.; SILVA, A.D.; ESTEVES, P.A.; ROEHE, P.M.; RIJSEWIJK, F.A.M. Hight prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 and 5 found in cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 139, p. 67-73, 2009.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J. Orthop. Res.**, v. 9, p. 641-650, 1991.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; ARNS, C. W. Bio-Safety Technology in Production of Bovine Herpesvirus Type 5 (BoHV-5) Using an Alternative Serum-Free Medium. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, v.3, p.125-130, 2007.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; BREGANO, L.C.; ANDRADE, A.L. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of clinical cases of bovine herpesvirus type 5 infections. **Diagn. Pathol.**, v. 10, p.55-57, 2010a.

CARDOSO, T.C.; GOMES, D.E.; FERRARI, H.F.; SILVA-FRADE, C.; ROSA, A.C.G.; ANDRADE, A.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. A novel in situ polymerase chain reaction hybridization assay for the direct detection of bovine herpesvirus type 5

in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **J. Virol. Meth.**, v. 163, p. 509-512, 2010b.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; NOVAIS, J.B.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; ANDRADE, A.L.; GAMEIRO, R. 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.** v.12, p. 18, 2012.

CARLIN, R.; DAVIS, D.; WEISS, M.; SCHULTZ, B.; TROYER, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 4; p. 8; 2006.

CARON, L. E. F.; FLORES, C.F.C.; SCHERER, R.; WEIBLEN, I. E.; IRIGOVEN, P. M.; ROEHE, A.; ODEON, J. H. Latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected rabbits: virus reactivation, shedding and recrudescence of neurological disease. **Vet. Microbiol.**, v. 4, p. 285-295, 2002.

CASCIO, K. E.; BELKNAP, E. B.; SCHUTHEISS, P. C.; AMES, A.D.; DAHME, E.; COLLINS, J.K. Encephalitis induced by bovine herpesvirus 5 and protection by prior vaccination or infection with bovine herpesvirus 1. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v. 11, p. 134-139, 1999.

CHANG, Y.J.; SHIH, D.T.; TSENG, C.P.; HSIEH, T.B.; LEE, D.C.; HWANG, S.M. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. **Stem Cells.**, v. 24, p.679-685, 2006.

CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.** v. 162, p. 156–159, 1987.

CHOONG, P.F.; MOK, P.L.; CHEONG, S.K.; LEONG C.F.; THEN, K.Y. Generating neuron-like cells from BM-derived mesenchymal stromal cells in vitro. **Cytotherapy.**, v. 9, p.170-183. 2007

CHOWDHURY, S.I.; LEE, B.J.; MOSIER D.; SUR, J.H.; OSÓRIO, F.A.; KENNEDY, G.; WEISS, M.L. Neurophatology of bovine herpesvirus 5 (BHV-5) meningo-encephalitis in a rabbit seizure model. **J. Comp. Pathol.**, v. 117, p. 295-310, 2002.

CHUA, S.J.; BIELECKI, R.; WONG, J.C.; YAMANAKA, N.; ROGERS, I.M.; CASPER, R.F. Neural progenitors, neurons and oligodendrocytes from human umbilical cord blood cells in a serum-free, feeder-free cell culture. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v.379, p. 217-221, 2009.

COOMBS, N. J.; GOUGH, A. C.; PRIMROSE, J. N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p12, 1999.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, 1400-1415. 2011.

CREMONESI.; VIOLINI, S.; LANGE CONSIGLIO, A.; RAMELLI, P.; RANZENIGO, G. MARIANI, P. Isolation, in vitro culture and characterization of foetal umbilical cord stem cells at birth. **Vet. Res. Comm.**, v. 32; p. 139-142; 2008.

DE BRUYN, C.; NAJAR, M.; RAICEVIC, G.; MEULEMAN, N.; PIETERS, K.; STAMATOPOULOS, B.; DELFORGE, A.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. **Stem Cells. Dev.**, v. 20; p. 547-57; 2011.

DEL MÉDICO ZAJAC, M.P.; LADELFA, M.F.; KOTSIAS, F.; MUYLKENS, B.; THIRY, J.; THIRY, E.; ROMERA, S.A. Biology of bovine herpesvirus 5. **Vet. J.**, v. 184, p. 138-145, 2010.

DELHON, G.A.; GOZÁLEZ, M.J.; MURCIA, P.R. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.2257-2267, 2002.

DIALLO, I.S.; CORNEY, B.G.; RODWELL, B.J. Detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 e 5 using multiplex real-time polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.**, v.175, p.46-52; 2011.

DIEL, D.G.; ALMEIDA, S.R.; BRUM, M.C.S.; DEZENGRINI, R.; WEIBLEN, R.; FLORES, E.F. Acute and latent infection by bovine herpesvirus type 5 in experimentally infected goats. **Vet. Microbiol.**, V. 121, p. 257-267, 2005.

D' OFFAY, J. M.; ELY, R. W.; BALDWIN, C. A. WHITENACK, D. L.; STAIR, E. L.; COLLINS, J. K.; Diagnosis of encephalitic bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) infection in cattle: virus isolation and immunohistochemical detection of antigen in formalin-fixed brain tissue. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 7, p. 247-251, 1995.

DONOFRIO, G.; VAN SANTEN, V.L. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus4 persistent infection. **J. Gen. Virol.** v. 82, p. 1181-85, 2001.

DONOFRIO, G.; COLLEONI, S.; GALLI, C.; LAZZARI, G.; CAVIRANI, S.; FLAMMINI, C.F. Susceptibility of bovine mesenchymal stem cells to bovine herpesvirus 4. **J. Virol. Methods.**, v. 127, p. 168-170, 2005.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy**: the eighth report. San Diego: Academic Press, 2004. p.1162.

FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M.C.R.; RAHAL, P.; CARDOSO, T. C. Detection of bovine Herpesvirus type 5 in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine brain by PCR: a useful adjunct to conventional tissue-based diagnostic test of bovine encephalitis. **J. Virol. Meth.**, v. 146, p.335-340, 2007.

FONG, C.Y.; CHAK, L.L.; BISWAS, A. TAN, J.H.; GAUTHAMAN, K.; CHAN, W.K.; BONGSO, A. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. **Stem Cell Rev.**, v. 7, p. 1-16, 2011.

FRANSSONI, F.; LABOPIN, M.; BACIGALUPO, A. Expanded mesenchymal stem cells (MSC), co-infused with HLA identical haemopoietic stem cell transplants, reduce acute and chronic graft-versus-host disease: a matched pair analysis. **Bone Marrow Transplant.**, v. 29, (suppl.2), S2, 2002.

FREIMOSER, F.; JAKOB, C.A.; AEBI, M.; TUOR, U. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 3727-3729, 1999.

FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int. Rev. Cytol.** v.47, p. 327-359, 1976.

FUCHS, J.R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, S.; ZAND, S.; VACANTI, J.P.; FAUZA, D.O. Cartilage Engineering from Ovine Umbilical Cord Blood Mesenchymal Progenitor Cells. **Stem Cells.**, v. 23, p. 958-964; 2005.

GAGE, F.H. Structural plasticity: cause, result, or correlate of depression. **Biol. Psychiatry.**, v. 48, p. 713-714, 2000.

GUNSON, R.N.; COLLINS, T.C., CARMAN, W.F. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. **J. Clin. Virol.** v. 35, p.355–367, 2006.

IN'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E.; KANHAI, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells.**, v. 22, p. 1338-45, 2004.

IYER, S.S.; ROJAS, M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v.8, p. 569-581, 2008.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; KEENE, C.D.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.;

LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.E. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived form adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell Transplant.**, v. 6, p. 125-134, 1997.

KASSIS, I.; GRIGORIADIS, N.; GOWDA-KURKALLI, B.; MIZRACHI-KOL, R. BEM-HUR, T.; SLAVIN, S.; ABRAMSKY, O.; KARUSSIS, D. Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. **Arch Neurol.**, v. 65, p. 753-761, 2008.

KERN,S.;EICHLER, H.;STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, **Stem cells**, v. 24, p. 1294-1301, 2006.

KITA, K.; GAUGLITZ, G.G.; PHAN, T.T.; HERNDON, D.N.; JESCHKE, M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. **Stem Cells Dev.**, v. 19, p. 491-501, 2010.

KHATRI, M.; O'BRIEN, T.D.; SHARMA, J.D. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bovine marrow. **Stem Cells Dev.**, v. 10, p. 1485-92, 2009.

KHATRI, M.; O' BRIEN, T. D.; GOYAL, S. M.; SHARMA, J. M. Isolation and characterization of chicken lung mesenchymal stromal cells and their susceptibility to avian influenza virus. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 34, p. 474-479, 2010.

KOCH, T.; HEERKENS, T.; THOMSEN, P.; BETTS, D. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **BMC Biotechnol.**, v. 7, p. 9, 2007.

KOGLER, G.; SENSKEN, S.; AIREY, J.A.; TRAPP, T.; MUSCHEN, M.; FELDHAHN, N.; LIEDTKE, S.; SORG, R.V.; FISCHER, J.; ROSENBAUM, C.; GRESCHAT, S.; KNIPPER, A.; BENDER, J.; DEGISTIRICI, O.; GAO, J.; CAPLAN, A.I.; COLLETTI, E.J.; ALMEIDA-PORADA, G.; MULER, H.W.; ZANJANI, E.; WERNER, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J. Exp. Med.**, v. 200, p. 123-135, 2004.

LAZAR, M.A. **Becoming fat. Genes Dev.**, v. 16, p. 1-16, 2002.

LEE, R.B.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H.S.; SUH, K.; BAE, Y.C.; JUNG, J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 14, p. 311-324, 2004.

LE BLANC, D.M.K; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells the international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy.**, v. 8, p. 315-317, 2006.

LE BLANC, K.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; GOTHERSTROM, C.; HASSAN, M.; UZUNEL, M.; RINGDÉN, O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. **Lancet.** v. 363, p. 1439-1441, 2004.

LI, L.; BAI, X.; GONG, X.; LIU, H.; CHEN, L.; GUAN, W.; MA, Y. Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells in duck. **J. Genet. Genomics.**, v. 36, p. 133-140, 2009.

LU, L.L.; LIU, Y.J.; YANG, S.G.; ZHAO, Q.J.; WANG, X.; GONG, W.; HAN, Z.B.; XU, Z.S. LU, Y.X.; LIU, D.; CHEN, Z.Z.; HAN, Z.C. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis supportive function and other potentials. **Haematologica.**, V. 91, p. 1017-1026, 2006.

MAJORE, I; MORETTI, P.; STAHL, F.; HASS, R.; KASPER, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. **Stem Cell Rev.**, v. 7, p. 17-31, 2011.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.; GERSON, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived

mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **J. Cell. Physiol.**, v.176, p. 57-66, 1998.

MALGIERI, A.; KANTZARI, E.; PATRIZI, M.P.; GAMBARDELLA, S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 3,p.284-269; 2010.

MARESCHI, K.; BIASIN, E.; PIACIBELLO, W.; AGLIETTA, M.; MADON, E.; FAGIOLI, F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. **Haematologica.**, v. 86, p. 1099-1100, 2001

MARTIN, D.R.; COX,N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal from feline feline bone marrow. **Exp. Hematol.**, v. 30, p. 879-886, 2002.

MAURO, A.; BUSCEMI, M.; GERBINO, A. Immunohistochemical and transcriptional expression of matrix metalloproteinases in full-term human umbilical Cord and human umbilical vein endothelial cells. **J. Mol. Hist.**, v. 41, p. 367-377, 2010.

MERTEN, O.W. DEVELOPMENT OF SERUM FREE MEDIA FOR CELL GROWTH PRODUCTION OF VIRUSES/viral vaccines-safety issues of animal productus used in serum free media. In: Hendriksen, C.; Sesardic, D; Cussler, K. Advancing science and elimination of the use of laboratory animals for development and control of vaccines and hormones. **Dev. Biol.**, v. 111, p. 223 – 225; 2002.

MEYER, G.; LEMAIRE, M.; ROS, C.; BELAK, K.; GABRIEL, A.; CASSART, D.; COIGNOUL, F.; BELAK, S.; THIRY, E. Comparative pathogenesis of acute and latent infections of calves with bovine herpesvirus types 1 and 5. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 633-652, 2001.

MITCHELL, K.E.; WEISS, M.L.; MITCHELL, B.M.; MARTIN, P.; DAVIS, D.; MORALES, L.; HELWIG, B.; BEERENSTRAUCH, M.; ABOU-EASA, K.; HILDRETH, T.; TROVER, D.; MEDICETTY, S. Matrix cells from Wharton's jelly from neurons and glia. **Stem Cells.**, v. 21, p. 50-60, 2003.

MOSCA, J.D.; HENDRICKS, J.K.; BUYANER, D.; DAVIS-SPROUL, J.; CHAUANG, L.C.; MAJUMDAR, M.K.; CHOPRA, R.; BARRY, F.; MURPHY, M.; THIEDE, M.A.; JUNKER, U.; RIGG, R.J.; FORESTELL, S.P.; BOHNLEIN, E.; STORB, R.; SANDMAIER, B.M. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 379, p. s71-s90, 2000.

PAN, G.J.; CHANG, Z.Y.; SCHOLER, H.R.; PEI, D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. **Cell Res.**, v. 12, p. 321-329, 2002.

PEREIRA, R.F.; HALFORD, K.W.; O'HARA, M.D.; LEEPER, D.B.; SOKOLOV, B.P.; POLLARD, M.D.; BAGASRA, O.; PROCKOP, D.J. Cultured adherent cells from marrow can serve as long lasting precursor cells for bone, cartilage and lung in irradiated mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 4857-4861, 1995.

PEREZ, S. E.; BRETSCHEIDER, M. R.; LEUNDA, F. A.; OSORIO, E. A.; FLORES, E. F.; ODEON, A. C. Primary infection, latency and reactivation of bovine herpesvirus-1 in the bovine nervous system. **Vet. Pathol.**, v. 39, p. 437-444, 2002.

PESHEV, R.; CHRISTENSEN, L.; CHRISTOVA, L. Comparative molecular epidemiological investigation on different bovine herpes viruses. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 21. p. 247-255, 1998.

PESSINA, A.; BONOMI, A.; COCCÉ, V.; BERNARDO, M.E.; COMETA, A.M.; FERRARI, M.; SISTO, F.; CAVICCHINI, L.; LOCATELLI, F. Assessment of human herpesvirus-6 infection in mesenchymal stromal cells ex vivo expanded for clinical use. **Transp. Infect. Dis.**, v. 11, p. 491-96, 2009.

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

PUGAZHENTHI, S.; NAIR, S.; VELMURUGAN, K.; LIANG, O.; MAHALINGAM, R.; COHRS, R.J.; NAGEL M.A.; GILDEN, D. Varicella-zoster virus infection of differentiated human neural stem cells. **J Virol.**, v.85, p.6678–6686, 2011.

PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLABER, M.; Oct-4 expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Hum. Reprod.**, v. 18, p. 1489-1493, 2003.

RAOUFI, M.F.; TAJIK, P.; DEHGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 46, p. 95-99, 2011.

REED, C.J.; MUENCH, H.A. A simple method of estimating fifty per cent end points. **Am. J. Hyg.**, v. 27, p. 493, 1938.

RIORDAN, N.H.; CHAN, K.; MARLEAU, A.M.; ICHIM, T.E. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression? **J. Transl. Med.**, v. 5, p. 8, 2007.

ROSEN, E.D.; SARRAF, P.; TROY, A.E.; BRADWIN, G.; MOORE, K.; MILSTONE, D.S.; SPIEGELMAN, B.M.; MORTENSEN, R.M. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Mol. Cell.**, v. 4, p. 611-617, 1999.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. L. The principles of humane experimental technique. London: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), 1992. ISBN: 0900767782. Special Edition. Disponível em: <http://altweb.jhsph.edu/publications/humane_exp/het-toc.htm> **Acesso em: 14 maio 2013**

SALGADO, A.J.; FRAGA, J.S.; MESQUITA, A.R.; NEVES, N.M.; REIS, R.L.; SOUSA, N. Role of human umbilical cord mesenchymal progenitors conditioned media in neuronal/glial cell densities, viability, and proliferation. **Stem Cells and Dev.**, v.19, p.1067-10742, 2010.

SALVADOR, J.C.; LEMOS, R.A.A.; RIET-CORREA, F.; ROEHE, P.M.; OSORIO, A.R. Meningoencephalitis in cattle caused by bovine herpesvirus-5 in Mato Grosso do Sul and São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, p. 72-82, 1998.

SANCHEZ-RAMOS, J.R. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J. Neurosci. Res.**, v. 69, p.880-893, 2002.

SCHAUWER, C.D; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R; VAN SOOM, A. Markers of Stemness in Equine Mesenchymal Stem Cells: a Plea for Uniformity. **Theriogenology**, v. 75, p. 1431-1443, 2011.

SCHUDEL, A.A.; CARRILLO, B.J.; WYLER, R.; METZLER, A.E. Infections of calves with antigenic variants of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurological disease. **J. Vet. Med. B.**, v. 30, p. 303-310, 1986.

SEAL B.S.; WHETSTONE C.A. Immediate early gene expression and gene mapping comparison among isolates of bovine herpesvirus 1 and 5. **Vet Microbiol.**, v.38, p.369–384,1994.

SECCO, M.; MOREIRA, Y.B.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N.M.; JAZEDIE, T.; MUOTRI, A.R.; OKAMOTO, O.K.; VERIOVSKI-ALMEIDA, S.; ZATZ, M. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. **Stem Cell Rev.**, v. 5, p. 387-401, 2009.

SEO, M.J.; SUH,S.Y.; BAE, YC.; JUNG, J.S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 328, p. 258-264, 2005.

SILVA-FRADE, C.; GAMEIRO, R.; MARTINS JÚNIOR, A.; CARDOSO, T.C. Apoptotic and developmental effects of bovine Herpesvirus type-5 infection on in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology.**, v. 74, p. 1296-1303, 2010.

SILVA, A.M.; FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; BOTTON, S.A.; IRIGOYEN, L.F.; ROEHE, P.M.; BRUM, M.C.S.; CANTO, M.C. Infecção aguda e latent em ovinos inoculados com herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). **Pesq. Vet. Bras.**, v. 18, p. 99-106, 1998.

SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W.; GOODSHIP, A.E. Isolation and Implantation of Autologous Equine Mesenquimal Stem Cells from Bone Marrow into the Superficial Digital Flexor Tendon as a Potential Novel Treatment. **Eq. Vet . J.**, v.35; p. 99-102; 2003.

SPIILKI, R. R.; FRANCO, A. C.; TEXEIRA, M. B.; ESTEVES, P. A.; SCHAEFER, R.; SCHMIDT, E.; LEMOS, R. A.; ROEHE, P. M. Bovine herpesvirus type 5 (BHV-5) in a calf with rabies. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 23, p. 1-4; 2003.

SUDIN, M.; ORVELL, C.; RASMUSSON, I.; SUNDBERG, B.; RINGDÉN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. **Bone Marrow Transplant.**, v. 37, p. 1051-59, 2006.

TORRES, F.C.; RODRIGUES, C.J.; STOCCHERO, I.N.; FERREIRA, M.C. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy to find experimental source. **Aesthetic. Plast. Surg.**, v. 31, p.574-578; 2007.

TROYER, D.; WEISS, M.L. Concise review: Whartn's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells.**, v. 26; p. 591-599; 2008.

URANIO, M.F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; LÁBBATE, A.; CATAACCHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 78, p.361–373. 2011.

VARELA, A.P.M.; HOLZ, C.L.; CIBULSKI, S.P.; TEXEIRA, T.F.; ANTUNES, D.A.; FRANCO, A.C.; ROEHE, L.R.; OLIVEIRA, M.T.; CAMPOS, F.S.; DEZEN,

D.; CENCI, A.; BRITO, W.D.; ROEHE, P.M. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) and 5 (BoHV-5) and its subtypes. **Vet. Microbiol.**, v. 142, p. 254-260, 2010.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B.E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell transplant.**, v. 19, p. 279-289, 2010

VOGEL, F. S. F.; CARON, L.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; WINKELMANN, E. R., MAYER, S. V.; BASTOS, R. G. Distribution of bovine herpesvirus type 5 DNA in the central nervous systems of latently, experimentally infected calves. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 10, p. 4512-4520, 2003.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. **Muscle Nerve.**, v.18, p. 1417-1426, 1995.

WEISS, M.L.; ANDERSON, C.; MEDICETTY, S.; Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly derived cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2865-2874, 2008.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J., PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult rat and human marrow stromal cells differentiate into neurons. **J. Neurosci. Res.** v. 61, p. 364-370, 2000.

ZHANG, H.T.; CHEN, H.; ZHAO, H.; DAI, Y.W.; XU, R.X. Neural stem cells differentiation ability of human umbilical cord mesenchymal stromal cells is not altered by cryopreservation. **Neurosci. Lett.**, v. 487, p. 118-122, 2011.

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

10. ANEXOS

Artigos publicados durante o doutorado.

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Isolation and characterization of wharton's jellyderived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system

BMC Biotechnology 2012, **12**:18 doi:10.1186/1472-8750-12-18

Tereza C Cardoso (tcardoso@fmva.unesp.br)
 Heitor F Ferrari (hferrari15@gmail.com)
 Andrea F Garcia (dreaaf@yahoo.com.br)
 Juliana B Novais (jubnovais@hotmail.com)
 Camila S Silva-Frade (camila.s.frade@gmail.com)
 Marina C Ferrarezi (maferrarezi@hotmail.com)
 Alexandre L Andrade (landrade@fmva.unesp.br)
 Roberto Gameiro (roberto@fmva.unesp.br)

ISSN 1472-8750

Article type Research article

Submission date 28 December 2011

Acceptance date 4 May 2012

Publication date 4 May 2012

Article URL <http://www.biomedcentral.com/1472-8750/12/18>

Like all articles in BMC journals, this peer-reviewed article was published immediately upon acceptance. It can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in BMC journals are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in BMC journals or any BioMed Central journal, go to

<http://www.biomedcentral.com/info/authors/>

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine *herpesvirus* type 5 infections

Tereza C. Cardoso^{1*}, Juliana B. Novais¹, Talita F. Anello¹, Camila Silva-Frade¹, Marina C. Ferraresi¹, Helitor F. Ferrari¹, Roberto Gameiro² and Eduardo F. Flores³

Abstract

Background: Bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5), frequently lethal in cattle, is associated with significant agricultural economic losses due to neurological disease. Cattle and rabbits are frequently used as models to study the biology and pathogenesis of BoHV-5 infection. In particular, neural invasion and proliferation are two of the factors important in BoHV-5 infection. The present study investigated the potential of bovine Wharton's jelly mesenchymal stromal cells (bW-MSCs) to differentiate into a neuronal phenotype and support robust BoHV-5 replication.

Results: Upon inducing differentiation within a defined neuronal specific medium, most bW-MSCs acquired the distinctive neuronal morphological features and stained positively for the neuronal/glia markers MAP2 (neuronal microtubule associated protein 2), N200 (neurofilament 200), NT3 (neurotrophin 3), tau and GFAP (glial fibrillary acidic protein). Expression of nestin, N200, β -tubulin III (TuJ1) and GFAP was further demonstrated by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Following BoHV-5 inoculation, there were low rates of cell detachment, good cell viability at 96 h post-infection (pi), and small vesicles developed along neuronal branches. Levels of BoHV-5 antigens and DNA were associated with the peak in viral titres at 72 h pi. BoHV-5 glycoprotein C mRNA expression was significantly correlated with production of progeny virus at 72 h pi ($p < 0.05$).

Conclusion: The results demonstrated the ability of bW-MSCs to differentiate into a neuronal phenotype *in vitro* and support productive BoHV-5 replication. These findings constitute a remarkable contribution to the *in vitro* study of neurotropic viruses. This work may pave the way for bW-MSCs to be used as an alternative to animal models in the study of BoHV-5 biology.

Keywords: BoHV-5, *in vitro* replication, Neuronal culture

Background

The two most basic properties of stem cells are their capacity for indefinite self-renewal and differentiation into multiple cell or tissue types [1-3]. Embryonic stem cells are totipotent and can be maintained in culture in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF) [4]. Withdrawal of LIF induces the formation of cellular aggregates called embryonic bodies. A wide variety of cell types migrate away from embryonic bodies, including some with neuron-like morphology [5]. In addition,

embryonic stem cells may be differentiated into neurons and glial cells with retinoic acid or basic fibroblast growth factor (bFGF) [6,7].

Neurons derived from embryonic stem cells express neurofilaments, neuron-specific class III β -tubulin (TuJ1) and a number of neuron-specific microtubule-associated proteins [8]. Neural stem cells (NSC) are immature, uncommitted cells that exist in both the developing brain and the adult nervous system [8]. These cells can undergo expansion and differentiate into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes [8,9]. Stem cells differentiated into neurons from both these sources display a limited proliferation potential. Obtaining them requires invasive procedures and results in ethical limitations in their use [10]. Because

* Correspondence: tc Cardoso@fmvz.usp.br

¹UFVSP - University of São Paulo State, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture, São Paulo, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

