

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO FETAL NA CINÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA DE CÃES**

NATHÁLIA GENÚ NAKAZATO

Botucatu - SP
Novembro - 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO FETAL NA CINÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DA PLACENTA DE CÃES**

NATHÁLIA GENÚ NAKAZATO

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. Nereu Carlos Prestes

Coorientador: Prof. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu - SP
Novembro - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nakazato, Nathália Genú.

Avaliação da influência do sexo fetal na cinética e caracterização imunofenotípica das células tronco mesenquimais da placenta de cães / Nathália Genú Nakazato. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Cães. 2. Células-tronco. 3. Dimorfismo sexual (Animais). 4. Âmnio. 5. Placenta.

Palavras-chave: Anexos fetais; Dimorfismo sexual; Gênero; Membrana alantoideana; Membrana amniótica.

Nome do Autor: Nathália Genú Nakazato

Título: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO SEXO FETAL NA CINÉTICA E CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA DE CÃES.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Adj. Dr. Nereu Carlos Prestes

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dr. Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento Clínica Cirúrgica de Grandes Animais

FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Leandro Maia

Membro

Secretaria de Saúde de Botucatu

Divisão de Vigilância Sanitária

Data da defesa: 06/11/2017.

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a DEUS, meus pais Fátima e Daidi e minha irmã Carolina, que são a rocha forte sobre a qual construo meus alicerces!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo sopro de vida, bênçãos sobre a minha vida e luz no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Maria de Fátima e Carlos Daidi, pois sem o seu constante apoio e eterna torcida, esse sonho não teria se concretizado.

Agradeço à minha irmã Carolina, pois melhor irmã, amiga e companheira não há. Seu ouvido amigo e apoio incondicional tornaram essa jornada mais fácil.

Agradeço ao meu orientador Professor Nereu Carlos Prestes, pela oportunidade de crescer profissionalmente, muita paciência e apoio durante esse projeto.

Um agradecimento especial à Professora Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga por me receber em sua equipe e abrir as portas do seu laboratório incondicionalmente, serei eternamente agradecida.

Agradeço à Dr. Bruna De Vita pelos ensinamentos, paciência e ajuda para idealizar esse projeto, mas acima de tudo pela amizade, levarei para a vida toda.

Agradeço à Josiane Lourenção parceira para todos os momentos, terapeuta nas horas vagas e, com certeza, um dos melhores presentes que ganhei nessa aventura.

Agradeço aos residentes do Departamento de Reprodução pela enorme ajuda nas coletas de material.

Agradeço aos funcionários Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pois sem vocês o dia-a-dia no hospital não seria o mesmo.

Agradeço Camilla Dell'Aqua pelo companheirismo e pela ajuda nos meus momentos de “desespero” no meio do experimento.

Agradeço a Professora Noeme Sousa Rocha por abrir as portas do seu laboratório e ajudar com a histologia.

Agradeço aos amigos de longe por me apoiarem nesta aventura e aos amigos que fiz em Botucatu, pois fizeram os dias mais alegres e a vida mais leve.

Agradeço a CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço ao Programa de pós graduação de Biotecnologia Animal pela oportunidade de expandir meus horizontes com a pesquisa.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*“The greatest accomplishment is not in
never falling, but in rising again when
you fall.”*

(Vince Lombardi)

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** Fotomicrografia da membrana alantoamniótica. Epitélio no lado superior da figura observa-se os alantócitos - células grandes com formato cuboide e vacuolizações (seta) -, células estromais fusiformes entremeadas ao colágeno (cabeça de seta) e no lado inferior observamos os amniócitos, que podem perder as suas projeções citoplasmáticas no momento do parto – placenta de feto fêmea (A). Epitélio com projeções citoplasmáticas apicais (seta), presença de arteríolas na região do alantoide e células estromais fusiforme (cabeça de seta) – placenta de feto macho (B). Coloração com método de hematoxilina e eosina. Aumento 400x. Barra de escala 10µm. 31
- FIGURA 2:** Fotomicrografia da membrana alantoamniótica. Corte controle corado com o método de hematoxilina e eosina (HE) (A). Expressão positiva dos receptores de citoqueratina na região correspondente ao epitélio (B). Imunomarcação positiva para vimentina na região mais interna do tecido, que corresponde à localização das células mesenquimais (C). Aumento de 200x. Barra de escala 20 µm. 32
- FIGURA 3:** Células em cultivo primário. Note a morfologia fibroblastóide Aumento de 50x. Barra de escala 500 µm (A). Células em quarta passagem (P4) já com projeções citoplasmáticas largas e presença de vacúolos intracitoplasmáticos. Aumento de 200x. Barra de escala 100 µm (B). 33
- FIGURA 4:** Média e desvio padrão da curva de crescimento das células de membrana alantoamniótica de feto fêmea e feto macho. Diferenças ($p=0,4291$) não foram observadas entre os sexos. 34
- FIGURA 5:** Unidade de formação de colônia fibroblastóide. Amostra com capacidade de formação de colônias com 15 ou mais células (A). Células cresceram de forma isolada e em pequenos grupos, não apresentando a capacidade de formar colônias (B). Aumento de 50x. Barra de escala 500 µm... 35

FIGURA 6: Controle negativo - feto fêmea (A) e feto macho (B). Imunomarcacão positiva das células de membrana alantoamnióticas para a vimentina tanto na fêmea (C), quanto no macho (D). Marcação negativa para citoqueratina na fêmea (E) e no macho (F). Aumento de 200x. Barra de escala 100 μm 37

FIGURA 7: Imunocitoquímica. Células isoladas da membrana alantoamniótica de cães intensamente marcadas para os marcadores de pluripotência Nanog e Oct-4 tanto nas fêmeas (A e C), quanto nos machos (B e D). Não houve disparidades entre macho e fêmea. Aumento 200x. Barra de escala 100 μm 37

FIGURA 8: Diferenciação in vitro das CTMs de membrana alantoamniótica em quarta passagem. Cultivos com meio indutor por 15 dias apresentaram uma intensa marcação com o corante Alizarin Red. Note os depósitos de cálcio extracelular tanto na fêmea (A), quanto no macho (B). As células cultivadas com meio indutor por 12 e 15 dias foram coradas com Oil Red e contracoradas com hematoxilina, apresentando gotículas lipídicas no interior do citoplasma e alteração da morfologia celular na fêmea (C) e no macho (D). Aumento 200x. Barra de escala 100 μm . . 38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de viabilidade das células comparando as células derivadas da placenta de feto macho e de feto fêmeas em quatro momentos diferentes: cultivo primário (CP), primeira passagem (P1), segunda passagem (P2) e terceira passagem (P3). 34

TABELA 2: Média e desvio padrão para os marcadores CD44, CD90, CD34 e MHCII das CTMs derivadas de membranas alantoamniótica coletadas a termo durante a cesariana de partos distócicos. Não apresentaram diferença ($p>0,05$) quando comparadas a expressão entre os sexos. 36

TABELA 3: Análise da média e mediana do tamanho (FSC-A) e granulosidade ou complexidade (SSC-A) celular das CTMs derivadas de membrana alantoamniótica de cães na quarta passagem (P4). Diferenças ($p>0,05$) não foram observadas entre macho e fêmea. 36

LISTA DE ABREVIATURAS

CT – célula-tronco

CTE – célula-tronco embrionária

CTM – célula-tronco mesenquimal

CD – “cluster designation”

MA – membrana amniótica

MA-CTM – células tronco mesenquimais da membrana amniótica

LA-CTM – células tronco mesenquimais do líquido amniótico

CU-CTM – células tronco mesenquimais do cordão umbilical

MO – medula óssea

MO-CTM – células tronco mesenquimais da medula óssea

TA – tecido adiposo

TA-CTM – células tronco mesenquimais do tecido adiposo

SFB – soro fetal bovino

DMEN – Dubelcco's Modified Eagle's Medium

PBS – Tampão salina-fosfato

DMSO – Dimetilsulfóxido

EFC – eficiência de formação de curva

HE – hematoxilina-eosina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Objetivo geral	5
1.2. Objetivos específicos	5
1.3. Hipótese	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Células-tronco (CTs)	6
2.2. Células-tronco mesenquimais (CTMs)	7
2.3. CTMs de anexos fetais.....	9
2.3.1. CTMs da membrana amniótica (MA-CTM)	10
2.4. Influência do sexo nas CTMs	11
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	14
CAPÍTULO 2	20
ARTIGO	21
RESUMO.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. Coleta de amostras	25
2.2. Caracterização histológica	25
2.2.1. Análise morfológica	25
2.2.2. Imunohistoquímica.....	25
2.3. Isolamento e cultivo celular	26
2.4. Caracterização citológica	27
2.4.1. Viabilidade	27
2.4.2. Avaliação cinética da proliferação das MA-CTMs.....	28
2.4.3. Citometria de fluxo	28
2.4.4. Imunocitoquímica.....	29
2.4.5. Diferenciação in vitro	30
2.4.5.1. Osteogênica	30
2.4.5.2. Adipogênica	30
2.5. Análise estatística	30
3. RESULTADOS	31
3.1. Análise histomorfológica	31
3.2. Imunohistoquímica	32

3.3. Morfologia celular	32
3.4. Viabilidade.....	33
3.5. Curva de crescimento	34
3.6. Ensaio das unidades formadoras de colônias de células fibroblastóides (CFU-C)	35
3.7. Citometria de fluxo	35
3.8. Imunocitoquímica	36
3.9. Diferenciação in vitro: osteogênica e adipogênica	38
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	45

NAKAZATO, N. G. Avaliação da influência do sexo fetal na cinética e caracterização imunofenotípica das células tronco mesenquimais da placenta de cães. Botucatu, 2017. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

RESUMO

Estudos das células-tronco mesenquimais (CTMs) comprovaram a influência do sexo do doador nas suas capacidades proliferativa e imunomoduladora. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é investigar se há disparidades entre as células da placenta derivada de fetos de sexos diferentes, fato que ainda não foi descrito na medicina veterinária. Foram coletadas 11 pares de membrana alantoamniótica de cães (ALAM), isoladas por digestão enzimática e cultivadas. Utilizamos amostras de tecido para avaliação histológica e imunohistoquímica. Avaliamos os cultivos celulares para padrões morfológico, proliferativo e de capacidade de diferenciação. A justaposição íntima das membranas alantoideana e amniótica observada nos cortes histológicos justifica estudá-las juntas. Observamos que as células obtidas da ALAM de ambos os sexos apresentaram características semelhantes. As alterações morfológicas foram consistentes entre as amostras, e a viabilidade e a curva de crescimento apresentaram $p > 0,05$. As células demonstraram capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica. Na imunocitquímica, as amostras expressaram a vimentina e os marcadores de pluripotência (Oct-4 e Nanog). Na citometria de fluxo, elas expressaram valores significativos de CD44 e CD90, além da baixa expressão de CD34 e MHCII. Esses resultados indicam não haver diferença entre as células quando comparamos as células da ALAM derivadas de fetos de sexos diferentes, mas sugerem seu uso futuramente na medicina regenerativa.

Palavras-chave: anexos fetais, dimorfismo sexual, gênero, membrana amniótica, membrana alantoideana

NAKAZATO, N. G. Evaluation of the influence of the fetal sex in the kinetic and immunophenotyping of the mesenchymal stem cells of the canine placenta. Botucatu, 2017. 65p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) studies have proven the influence of the donor's gender in its proliferative and immunomodulatory abilities. Therefore this study aims to investigate the presence of discrepancies among the MSCs of the placenta derived from different sex fetus, which haven't been described in the veterinary medicine. Eleven pairs of canine allantoamniotic membranes (ALAM) were collected, isolated through enzymatic digestion and cultivated. Tissue samples were used for histological and immunohistochemistry assessment. The cell cultures were evaluated for morphological, proliferative, and differentiation potential standards. The intimate juxtaposition of the allantoic and amniotic membranes detected in the histological slides justifies studying them together. Similar characteristics were observed for the cells derived from ALAM in both genders. The morphological alterations were consistent among samples, and viability and growth curve exhibited $p > 0.05$. The cells displayed capability to: differentiate in adipogenic and osteogenic lineages; express vimentin and Oct-4 and Nanog pluripotent markers, with immunocytochemistry; and express significantly CD44 and CD90, regardless of the low expression of CD34 and MHCII, with flow cytometry. These results indicate there are no differences among cells when comparing the ALAM cells derived from opposite sex fetus, but suggest using this source for the regenerative medicine in the future.

Key words: fetal adnexa, sexual dimorphism, gender, amniotic membrane, allantoic membrane

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O uso da terapia com células-tronco (CTs) tem crescido muito na última década na medicina regenerativa. Testes clínicos estão em andamento por todo o mundo (TROUNSON; MCDONALD, 2015), buscando tratamentos baseados na capacidade das CTs em substituir ou remodelar tecidos lesionados, fornecer fatores extracelulares capazes de estimular efeitos endógenos e modular o sistema imune (TROUNSON et al., 2011). O potencial terapêutico para as CTs abrangem lesões medulares (FORTIER, 2005), cardiopatias isquêmicas (CRISOSTOMO et al., 2007), doenças sanguíneas imunomediadas, lesões oftálmicas, doenças de degeneração nervosa, doenças pulmonares (TROUNSON et al., 2011; TROUNSON; MCDONALD, 2015), entre outros.

O estudo de doenças e lesões em animais – como suínos, cães, gatos e cavalos – permite avaliar a progressão de algumas patologias semelhantes às encontradas em humanos, sendo, portanto, um caminho para criar protocolos para a medicina regenerativa do homem (GONÇALVES et al., 2014). Estudos clínicos e testes de novas terapias têm sido realizados com o uso de pelo menos duas espécies animais: um roedor e um não roedor. O cão apresenta algumas semelhanças com os humanos quanto a anatomia, enfermidades e performance atlética, além de possuir articulações maiores, tornando-se uma espécie de eleição para os estudos (BAKKER et al., 2014).

Já na medicina veterinária, estudos em equinos descrevem principalmente o uso de CTs em diversos tipos de doenças ortopédicas, abrangendo o tratamento de tecidos moles, cartilagosos e ósseos, além do tratamento de doenças neurológicas, inflamatórias e isquêmicas (BORJESSON; PERONI, 2011). Outra espécie muito estudada são os cães, cujas pesquisas têm focado em problemas do sistema musculoesquelético, especialmente reparo ósseo / cartilaginoso e doenças inflamatórias cujos tratamentos atuais têm demonstrado pouca eficiência (BAKKER et al., 2014).

A fonte de CTs utilizada pode variar com o tipo de lesão, sendo que as células-tronco mesenquimais (CTMs) vêm se destacando, triplicando o número de estudos clínicos registrados de 2011 até 2015. As CTMs apresentam segurança para transplantes alogênicos, apresentando uma ação anti-inflamatória e tropismo pelas regiões lesionadas e processos inflamatórios

(TROUNSON; MCDONALD, 2015). Ademais, não demonstram risco de formação tumoral como as células pluripotentes, possuem um isolamento e cultivo mais fácil e apresentam menos problemas éticos, favorecendo o seu uso em pesquisas e testes clínicos (RYAN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2014).

O uso de CTMs derivadas de anexos fetais tem crescido nos estudos em humanos e na medicina veterinária, pois oferece fácil coleta, sendo não invasiva, com grande quantidade de material e são eticamente aceitáveis devido ao fato de normalmente serem considerados descarte (MARCUS; WOODBURY, 2008; CREMONESI; CORRADETTI; CONSIGLIO, 2011). Estudos descrevem como fonte de CTM, principalmente nas espécies equino e canino, a membrana amniótica, o líquido amniótico (URANIO et al., 2011; DE VITA et al., 2012) e a gelatina de Wharton – matriz do cordão umbilical (URANIO et al., 2011).

Considerando-se as vantagens dessa fonte celular, alguns estudos indicam que as células oriundas dos anexos fetais possivelmente apresentam o potencial de diferenciação pluripotente, porém mantendo o seu poder de imunomodulação e proliferação (FAUZA, 2004).

Visando buscar desenvolver o campo da medicina regenerativa, além de estudar as diferentes fontes, alguns estudos foram capazes de comprovar a influência do sexo do doador nas características intrínsecas das CTMs. Visto que os hormônios predominantes de cada sexo têm uma grande influência fisiológica no organismo, resultando em variação na ação de algumas enfermidades, bem como na produção de fatores de proteção e modulação da resposta imune do organismo (RAY et al., 2008).

As células da medula óssea (MO) de mulheres são consideradas menores, com melhor capacidade de proliferação e maior potencial de supressão da proliferação das células T (SIEGEL et al., 2013). Quando utilizadas no tratamento de isquemias causadas por infarto do miocárdio, as células de MO de doadoras mulheres apresentaram-se mais eficientes no reparo funcional e melhor fator de proteção, devido a maior produção de VEGF, apoptose reduzida e menor liberação de TNF- α (CRISOSTOMO et al., 2007). As CTMs derivadas do tecido adiposo (TA) de coelhos demonstraram capacidade de diferenciação osteogênica superior para doadores machos, enquanto as doadoras fêmeas apresentaram melhor diferenciação adipogênica (DUDAS et al., 2008). Já em relação às células derivadas do músculo estriado esquelético, as fêmeas foram

mais eficientes na reparação tecidual, porém os machos apresentaram maior capacidade de diferenciação condrogênica e melhor eficiência no reparo de defeitos osteocondrais (MESZAROS et al., 2012).

Pesquisas em humanos já comprovaram a presença, atuação e diferença de concentração dos hormônios esteroidais no líquido amniótico (LA), observando maiores concentrações de testosterona e androstenediona nos fetos do sexo masculino e valores de estradiol mais elevados no sexo feminino (BEEK et al., 2004). Entretanto, De Vita et al. (2015) procuraram avaliar a influência do sexo fetal no fenótipo e na capacidade imunomoduladora das células derivadas da membrana amnióticas de humanos, porém observaram que não houve diferença na capacidade de supressão dos linfócitos T quando compararam os sexos diferentes.

Neste trabalho, visamos estudar a caracterização da membrana alantoamniótica (ALAM) de cães, focando na avaliação das diferenças entre as células derivadas de placentas de fetos fêmea quando comparadas com as de feto macho. Baseando-se nos diferentes estudos com fontes de CTMs diversas, nossa hipótese é de que as células derivadas da ALAM de fetos fêmeas possuem características mais vantajosas para uma aplicabilidade clínica futura.

1.1. Objetivo geral

Estudar e comparar a influência do sexo fetal nas características qualitativas e quantitativas das CTMs derivadas das membranas amniótica e alantoideana juntas na espécie canina.

1.2. Objetivos específicos

- Estudar o uso da fonte alantoamniótica como CTMs;
- Analisar a cinética, a proliferação, a viabilidade, o tamanho e a granulosidade das células da membrana alantoamniótica, visando identificar disparidades entre os sexos;
- Caracterizar as células dessa fonte como CTMs por meio da avaliação da expressão dos marcadores de superfície, da capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica e da expressão da vimentina, assim como a ausência da expressão da citoqueratina;
- Determinar a presença ou não de diferenças na expressão de receptores de estrógeno- α na superfície histológica com a celular.

1.3. Hipótese

Baseando-se em estudos envolvendo as CTMs de diversas fontes em humanos que, ao compararem os sexos dos doadores, observaram maior vantagem na aplicação das células de doadoras do sexo feminino, supõe-se que o mesmo poderá ser observado nas células da placenta de feto fêmea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células-tronco (CTs)

As células-tronco pertencem a um grupo celular muito distinto, mas, ainda assim, são encontradas em todos os tecidos de um organismo. Elas se destacam por serem indiferenciadas, podem se multiplicar por longos períodos sem diferenciação e são capazes de se diferenciar em células de um tecido específico. Sua característica intrínseca de realizar divisões assimétricas permite manter o pool de células indiferenciadas, assim como produzir células especializadas (ZAGO; COVAS, 2006). Estudos comprovam que as CTs de um tecido específico também têm a capacidade de diferenciação em células de outras linhagens, caracterizando uma habilidade conhecida como plasticidade ou transdiferenciação (MINGRONI-NETTO; DESSEN, 2006).

Após a fecundação, é formada a primeira célula tronco do organismo vivo. Conhecidas como células totipotentes, são capazes de se diferenciar em todos os tecidos, permanecendo com essa característica até o estágio da mórula com 8 blastômeros. Durante a fase de blastocisto pré-implantação, podem ser obtidas, a partir da massa celular interna, as células-tronco embrionárias (CTEs), classificadas como células pluripotentes, são capazes de se diferenciar em tecidos das linhagens ectodermal, mesodermal e endodermal. As CTEs são diferentes das totipotentes por não serem capazes de se diferenciar nas células dos tecidos extraembrionário, cuja origem se encontra no trofoectoderma (FORTIER, 2005).

As células-tronco adultas, também conhecidas como somáticas, são todas as CTs do organismo após o início da diferenciação do embrião até o indivíduo adulto (FORTIER, 2005). Atuando como reservatórios de células indiferenciadas, são responsáveis pela manutenção, pelo reparo e pela remodelação tecidual. Apesar da capacidade de diferenciação reduzida, os indivíduos adultos apresentam dois tipos de células-tronco: as células multipotentes – também chamadas de oligopotentes (ZAGO; COVAS, 2006) – podem se diferenciar em alguns tipos celulares da mesma camada germinal e as células onipotentes – também chamadas células progenitoras – estão comprometidas com uma linhagem celular específica (PAROLINI et al., 2009).

2.2. Células-tronco mesenquimais (CTMs)

A maioria dos tecidos no organismo possui um pequeno pool de células indiferenciadas, geralmente situado próximo aos vasos sanguíneos (STEWART; STEWART, 2011). Essas células, conhecidas como células-tronco mesenquimais, são consideradas de fácil isolamento devido a sua aderência ao plástico ou vidro durante o cultivo, apresentam uma morfologia fibroblastóide e possuem a capacidade de se multiplicar por várias passagens sem sinal de senescência celular (COVASb, 2006). Normalmente essas células se encontram em um estado quiescente no indivíduo adulto, multiplicando-se somente em momentos de demanda do organismo (STEWART; STEWART, 2011).

A principal fonte de CTM descrita e estudada durante muitos anos foi a medula óssea. Entretanto, com os avanços da medicina regenerativa, os pesquisadores foram se aprofundando na busca de outras fontes como: tecido adiposo, parede de vasos, polpa dentária (COVASb, 2006), gelatina de Wharton, tendão, membrana e líquido sinovial (STEWART; STEWART, 2011), líquido e membrana amniótica (CREMONESI et al., 2011; DE VITA et al., 2013; CAMPOS et al., 2017), endométrio (MORAES et al., 2016), musculatura esquelética (CORSI et al., 2004), entre outras.

Visando unificar o estudo das CTMs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), determinou três critérios mínimos que as células devem apresentar para serem consideradas CTMs nos humanos: serem capazes de se aderirem ao plástico durante o cultivo; expressar os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, somados à ausência de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e MHCII; e diferenciar-se *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006).

Os marcadores de superfície são receptores (proteínas) localizados na membrana celular e refletem as características biológicas e funcionais das CTMs (COVASa, 2006). Nenhum marcador é específico de um único tipo celular, tornando necessária a avaliação de um conjunto de marcadores, com funções diferentes, para melhor classificar o tipo de células (TAYLOR; CLEGG, 2011). Para melhor caracterizar uma população celular como as CTMs, avalia-se a expressão positiva de receptores como CD44, CD90 e CD29 (COVASa, 2006). Entretanto, é importante associar a avaliação de marcadores que não devem ser

expressos por essas células como os marcadores característicos de células hematopoiéticas – CD34 e CD117 –, células de linfócitos B – CD19 e CD45 –, células endoteliais – CD31 –, monócitos – CD14 – e MHCII (STEWART; STEWART, 2011). Outros marcadores comumente expressos por células-tronco embrionárias como Oct-4, Nanog, SOX-2, SSEA-3 e SSEA-4 também podem ser positivos para algumas CTMs (COVASa, 2006).

A análise do tipo celular (fenótipo), com o auxílio de anticorpos conjugados ou incubados com sondas fluorescentes, permite-nos realizar o teste chamado de imunofenotipagem, que geralmente é avaliada pela citometria de fluxo e traz melhores informações sobre a qualificação, quantificação e análise da pureza celular (FONTES; ORELLANA; PRATA, 2006).

No caso dos cães, esse teste avalia os principais marcadores positivos, que são CD44, CD90, CD105 e CD184, além de averiguar se há ausência da expressão de CD33, CD34 e CD45 (LEE et al., 2013). Porém existem divergências do marcador CD29, pois Uranio et al. (2011) e Saulnier et al. (2016) o descreveram como marcador positivo para células da membrana amniótica e matriz do cordão umbilical, enquanto Lee et al. (2013) o classificaram como negativo para o cordão umbilical.

O potencial das CTMs também é definido pela capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares (STEWART; STEWART, 2011). Ao cultivarmos as CTMs *in vitro* com meios indutores específicos, as células adquirem características das linhagens mesodérmicas, formando adipócitos, osteoblastos e condrócitos (BAKSH et al., 2004). Ademais, estudos também relataram a capacidade dessas células em se diferenciar em tecidos de outras linhagens, como: neural, vascular, muscular, cardíaca, entre outros (COVASb, 2006).

Por fim, outra característica muito importante das CTMs é a baixa imunogenicidade celular, resultando na não rejeição do transplante de células alogênicas. Esse mecanismo é possível através à ação de três fatores: a hipoinmunogenicidade, devido a expressão do complexo MHCI sem a expressão do MHCII; a modulação das células dendríticas, que induz maior tolerância imunológica e afeta diretamente as células T; e a supressão local da produção de prostaglandinas e interleucinas, resultando em um microambiente local imunossuprimido (RYAN et al., 2005). Além disso, a capacidade anti-inflamatória

das CTMs se mostrou de grande importância devido a liberação de mediadores da inflamação, inibição de apoptose, aumento da angiogênese e estímulo à regeneração de células progenitoras. Essas características foram essenciais para autenticar a possibilidade de formação de bancos de CTMs de vários doadores (BORJESSON; PERONI, 2011).

2.3. CTMs de anexos fetais

O uso das CTs derivadas dos anexos fetais vem sendo explorado pelos pesquisadores devido à: facilidade de se adquirir o material, sendo de forma não invasiva e sem prejuízo ao doador, com uma grande concentração de células, de fácil expansão *in vitro* e que permite a criopreservação (CREMONESI et al., 2011). Além disso, essas células apresentam uma maior taxa de proliferação celular quando comparadas a outras fontes de CTMs (FAUZA, 2004).

Diversos experimentos têm comprovado a qualidade das CTMs de origem placentária por meio da manutenção da estabilidade cromossomal; da presença de longos telômeros, permitindo várias replicações antes de atingirem a senescência; de propriedades imunomoduladoras, reduzindo a proliferação de linfócitos T; e da alta capacidade de diferenciação para linhagens mesenquimais, ectodermis e endodermis (CREMONESI et al., 2011; URANIO et al., 2011).

O fato de a placenta ser um ponto de contato materno-fetal permite maior tolerância imunológica, reduzindo risco de rejeição das células (CREMONESI et al., 2011). Na espécie canina, Uranio et al. (2011) relataram, na primeira passagem (P1), baixa expressão dos genes MHC I e MHC II em CTMs de líquido e membrana amniótica, em relação à segunda passagem (P2). O mesmo foi observado para cordão umbilical, conferindo, desta forma, um menor risco de rejeição, pois especula-se que essas células possam ser imunologicamente inertes.

Os anexos fetais dos mamíferos se originam do trofoectoderma, portanto pode-se especular que suas células não acompanham a diferenciação na gastrulação, conferindo a essas células maior plasticidade e um potencial de pluripotência (PAROLINI et al., 2009; CREMONESI et al., 2011). Entretanto, considera-se que menos de 1% das CTs dos anexos fetais apresentam esse grau de indiferenciação mais elevado (FAUZA, 2004). Em humanos, foi relatado a presença dos marcadores de pluripotência SOX-2, Nanog nas células

derivadas de membrana amniótica (ILANCHERAN et al., 2007) e Oct-4 pelas células epiteliais da MA (MIKI et al., 2005).

Na espécie canina, Uranio et al. (2011) descreveram a expressão do marcador de pluripotência Oct-4 no tecido amniótico, no líquido amniótico e no cordão umbilical; Lee et al. (2012) observaram a expressão dos marcadores Oct-3/4, Nanog, Sox-2 e SSEA-4 nas células derivadas da matriz do cordão umbilical; e Cardoso et al. (2016) identificou a expressão de Oct-4 e SOX-2 na membrana amniótica, corroborando a teoria da existência de células tronco pluripotentes nos anexos fetais.

2.3.1. CTMs da membrana amniótica (MA-CTM)

O uso e a aplicação da placenta na medicina regenerativa humana é relatada há muitos séculos pela medicina tradicional chinesa, porém, com o passar dos anos, essa prática entrou em desuso. No início do século XX, muito antes da descoberta das células-tronco, voltou-se a estudar a contribuição da membrana amniótica (MA) em tratamentos de feridas e queimaduras, em sua ação adjuvante na cicatrização de cirurgias e mais tarde, na década de 40, na oftalmologia, que até o presente é um dos principais usos das MAs (SILINI et al., 2015).

A membrana amniótica é um tecido avascular composta por uma camada epitelial e uma camada de tecido conjuntivo (mesenquimal), que envolve diretamente o feto (ARALLA et al., 2013). Durante o isolamento, é necessário separar mecanicamente a membrana alantoideana (tecido vascularizado) e, com a digestão com tripsina, remover a camada epitelial, seguido da digestão com a collagenase, visando o desprendimento e posterior isolamento das células mesenquimais. (CREMONESI et al., 2011). Uranio et al. (2011) e Park et al. (2012) descreveram ainda que as células oriundas do tecido amniótico de cães são de fácil isolamento e cultivo, sendo que a viabilidade celular se manteve constante durante várias passagens, porém a taxa de proliferação reduziu em passagens mais avançadas.

Parolini e Caruso (2011) descreveram três características que tornam a membrana amniótica ideal para o uso terapêutico: 1) forte atividade imunomoduladora devido à supressão da atividade dos linfócitos T e imunogenicidade fraca ou ausente; 2) capacidade de se diferenciar em diversas

linhagens celulares, como também em células de outras camadas germinativas; 3) utilização desse tecido como adjunto cicatricial de feridas, sobrevivendo por longos períodos em associação a outros tecidos ou órgãos.

Outras propriedades da membrana amniótica são a ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifibrótica, protetora contra lesões, pró-epitelização, além da atividade parácrina, secretando fatores como citocinas, fatores promotores da angiogênese, fatores de crescimento, proliferação e diferenciação celular, anti-apoptóticos e antioxidantes (PAROLINI; CARUSO, 2011; SILINI et al., 2015).

Especula-se que a característica imunomoduladora das células derivadas da placenta é possível e intensa devido a sua função durante o período de gestação, pois são responsáveis pela manutenção da tolerância materno-fetal. Essa propriedade é reforçada pelo uso de membrana amniótica, por exemplo, no tratamento de lesões e queimaduras de pele e em procedimentos cirúrgicos. Sendo assim, essas células poderiam ser utilizadas em transplantes alogênicos e xenogênicos, sem ativação da resposta imune e ativamente suprimindo a atividade dos linfócitos T (PAROLINI et al., 2009).

Atualmente existem testes clínicos com diversas abordagens de tratamento de doenças e lesões com a membrana amniótica, seja com o tecido em si ou com as células derivadas (SILINI et al., 2015). As terapias com MA buscam o tratamento de doenças neurológicas como a Doença de Parkinson, derrames cerebrais e lesões medulares, doenças pancreáticas, hepáticas, musculares, pulmonares, vasculares, cardíacas, entre muitas outras (PAROLINI; CARUSO, 2011).

2.4. Influência do sexo nas CTMs

As diferenças entre o sexo feminino e o sexo masculino vão muito além do dimorfismo sexual, pois os hormônios predominantes de cada sexo têm uma grande influência fisiológica no organismo, resultando em variação na ação de algumas patologias, bem como na produção de fatores de proteção e modulação da resposta imune do organismo (RAY et al., 2008).

Estudos de CTMs envolvendo a análise das diferenças entre os sexos variam na defesa do efeito benéfico do estrogênio (CRISOSTOMO et al., 2007), no efeito deletério do andrógeno (HUANG et al., 2013) e até mesmo na diferença inata do organismo em resposta a alguma injúria, pois os experimentos que

caracterizaram as células a partir do sexo comprovaram que nem sempre a única causa é a ação hormonal (DEASY et al., 2007) e ambos possuem vantagens e desvantagens nas mais diversas fontes de CTMs (AKSU et al., 2008; DUDAS et al., 2008; MESZAROS et al., 2012).

Estudos com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (MO-CTMs) destacam células de doadoras mulheres como menores em diâmetro, porém com maior capacidade de multiplicação e melhor eficiência na supressão da proliferação de linfócitos T (SIEGEL et al., 2013). Além disso, essas células apresentaram maior resistência e proteção contra injúrias causadas por infarto do miocárdio devido a características como a apoptose reduzida, maior produção de VEGF e menor liberação de TNF- α e IL-6 (CRISOSTOMO et al., 2006, 2007, 2008)

Outra forma de se comprovar a disparidade entre sexos foi realizada por meio da remoção do possível efeito dos andrógenos, em que Huang et al. (2013) realizaram a deleção genética dos receptores de andrógenos em camundongos e comprovaram um potencial de auto renovação e migração celular de MO-CTMs, além da ação anti-inflamatória e antifibrótica no tratamento da cirrose hepática.

Duda et al. (2008) e Aksu et al. (2008) estudaram em coelhos e humanos, respectivamente, a capacidade das CTMs derivadas do tecido adiposo (TA-CTMs) em se diferenciar na linhagem osteogênica, observando que as células de um doador macho conseguem se diferenciar mais rápido e de forma mais eficiente. Pode-se especular que isso acontece porque as fêmeas apresentam uma maior concentração de estrogênio, que comumente estimula a adipogênese, causando um atraso na resposta ao estímulo osteogênico (DUDAS et al., 2008). De fato, Anderson et al. (2001) comprovaram que o estradiol é capaz de modular os pré-adipócitos a se proliferarem mais rápido.

Outra fonte estudada e comprovada na disparidade entre os sexos são as células derivadas de tecido muscular. Enquanto as células derivadas de doadores do sexo feminino apresentam maior capacidade de regeneração do tecido muscular *in vivo*, devido a resposta mais eficiente a condições de hipóxia e estresse oxidativo (DEASY et al., 2007; MESZAROS et al., 2012), as células de doadores do sexo masculino apresentam maior capacidade de diferenciação

nas linhagens osteogênica e condrogênica, sendo consideradas melhores no reparo de lesões osteocondrais (CORSI et al., 2004; MESZAROS et al., 2012).

Considerando-se essas diferenças entre as características cinéticas, fenotípicas e imunomoduladoras das CTMs oriundas de várias fontes, faz-nos questionar se essa disparidade também está presente nos anexos fetais, pois, considerando-se que no próprio desenvolvimento e na diferenciação sexual de um feto, tanto de humanos como nos animais, o macho depende da ação de dois hormônios principais: o hormônio antimulleriano (AMH) e a testosterona produzida pelos testículos. Quando esses hormônios estão ausentes no desenvolvimento fetal, os ductos paramesonéfricos se desenvolvem e os mesonéfricos se atrofiam, direcionando o desenvolvimento para os órgãos reprodutivos da fêmea (JOST et al., 1973 apud WILSON; DAVIES, 2007; APPARÍCIO, 2015).

A presença e a atuação de hormônios esteroidais no período pré-natal de humanos foram confirmadas por Beek et al. (2004), que observaram diferença nos níveis hormonais do líquido amniótico (LA) dos fetos de sexos diferentes. Os fetos do sexo masculino apresentaram concentrações superiores de testosterona e androstenediona (A4), enquanto os fetos do sexo feminino demonstraram valores de estradiol mais altos. O cordão umbilical também revelou maior concentração de A4 nos fetos machos.

Já De Vita et al. (2015) avaliaram a influência do sexo fetal nas características das CTMs derivadas de membrana amniótica de humanos, demonstrando que aparentemente não houve diferença na capacidade de supressão dos linfócitos T pelas células da placenta de ambos os sexos. Pode-se especular que essa característica das CTMs de membrana amniótica acontece pela inativação das gônadas fetais durante o período de gestação, após a conclusão da diferenciação sexual, ou pela ausência de receptores de estrógeno e andrógenos na sua superfície no momento do parto.

Na medicina veterinária, esse tipo de comparação entre o sexo dos doadores ou dos fetos, que originam os anexos fetais, ainda não foi descrito em nenhuma espécie. Portanto, baseando-se no que já comprovado em estudo com humanos, podemos supor que o mesmo se aplica as CTMs de um doador fêmea quando comparado com um doador macho.

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA¹

AKSU, A E.; RUBIN, J. P.; DUDAS, J. R.; MARRA, K. G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **Annals of plastic surgery**, v. 60, n. 3, p. 306–322, 2008.

ANDERSON, L. A.; MCTERNAN, P. G.; BARNETT, A. H.; KUMAR, S. The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: Influence of gender and site. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 5045–5051, 2001.

APPARÍCIO, M. Embriologia e desenvolvimento do sistema genital. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. **Reprodução e obstetrícia em cães e gatos**. São Paulo, MedVet, p. 3-8, 2015.

ARALLA, M.; GROPPETTI, D.; CALDARINI, L.; CREMONESI, F.; ARRIGHI, S. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 15–22, 2013. Elsevier Ltd.

BAKKER, E. DE; RYSSSEN, B. VAN; SCHAUWER, C. DE; MEYER, E. Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man. **The Veterinary quarterly**, v. 2176, n. December 2014, p. 1–9, 2014. Taylor & Francis.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 8, n. 3, p. 301–16, 2004.

¹ Referência organizadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002.

BEEK, C. VAN DE; THIJSSSEN, J. H. H.; COHEN-KETTENIS, P. T.; GOOZEN, S. H. M. VAN; BUITELAAR, J. K. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: What is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 5, p. 663–669, 2004.

BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 109–123, 2011. Elsevier Ltd.

CAMPOS, L. L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; IKEDA, T. L.; MONTEIRO, B. A.; MAIA, L. FREITAS-DELLÁQUA, C. P.; DE VITA, B. Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 278–286, 2017.

CARDOSO, M.; PINHEIRO, A.; VIDANE, A.; CASALS, J. B.; OLIVEIRA, V. C.; GONÇALVES, N. J. N.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 1–7, 2016.

CORSI, K.; LI, G.; MILLER, J. S.; OLSHANSKI, A.; HUARD, J. Ability of male and female muscle-derived stem cells to undergo osteogenesis and chondrogenesis in vitro. 52nd Annual Meeting of the Orthopedic Reserach Society. **Anais...** , 2004.

COVAS, D. T. A identificação das células-tronco. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo; Atheneu, p.87-92, 2006a.

COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo; Atheneu, p.35-48, 2006b.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1400–1415, 2011. Elsevier Inc.

CRISOSTOMO, P. R.; MARKEL, T. A.; WANG, M.; LAHM, T.; LILEMOE, K. D.; MELDRUM, D. R. In the adult mesenchymal stem cell population, source gender is a biologically relevant aspect of protective power. **Surgery**, v. 142, n. 2, p. 215–221, 2007.

CRISOSTOMO, P. R.; WANG, M.; HERRING, C. M.; MORREL, E. D.; SESHADRI, P.; MELDRUM, K. K.; MELDRUM, D. R. Sex Dimorphisms in Activated Mesenchymal Stem Cell Function. **Shock**, v. 26, n. 6, p. 571–574, 2006.

CRISOSTOMO, P. R.; WANG, M.; HERRING, C. M.; MARKEL, T. A.; MELDRUM, K. K.; LILLEMOE, K. D.; MELDRUM, D. R. Gender differences in injury induced mesenchymal stem cell apoptosis, expression of VEGF, TNF, and IL-6 and abrogation via TNFR1 ablation. **J Mol Cell Cardiol**, v. 42, n. 1, p. 142–149, 2008.

DEASY, B. M.; LU, A.; TEBBETS, J. C.; FEDUSKA, J. M.; SCHUGAR, R. C.; POLLET, J. B.; SUN, B.; URISH, K. L.; GHARAIBEH, B. M.; CAO, B.; RUBIN, R. T.; HUARD, J. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: Female cells have higher muscle regeneration efficiency. **Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 1, p. 73–86, 2007.

DE VITA, B.; LEMES, L. C.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; FREITAS, N. P. P.; LANDIM-ALVARENGA, F.; PRESTES, N. P. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 1, p. 8–22, 2012.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; SUDANO, M. J.; CURCIO, B. R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PRESTES, N. C. Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 4, p. 535–542, 2013.

DE VITA, B.; ROMELE, P.; DE MUNARI, S.; VERTUA, E.; SIGNORONI, P. B.; MUGATTI, M.; PIANTA, S.; CARGNONI, A.; SILINI, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PAROLINI, O. Influence of gender on the phenotype and immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells from the amniotic membrane of human term placenta. **Proceedings of 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. San Juan, Porto Rico, Junho de 2015.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; 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, n. 4, p. 315–7, 2006. Elsevier.

DUDAS, J. R.; LOSEE, J. E.; PENASCINO, V. M.; SMITH, D. M.; COOPER, G. M.; MOONEY, M. P.; JIANG, S.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G. Leporine-derived adipose precursor cells exhibit in vitro osteogenic potential. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 19, p. 360–368, 2008.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877–891, 2004.

FORTIER, L. A. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 5, p. 415–423, 2005.

GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E.; PIEDRAHITA, J. A. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: A multispecies perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 2–10, 2014.

HUANG, C. K.; LEE, S. O.; LAI, K. P.; MA, W. L.; LIN, T. H.; TSAI, M. Y.; LUO, J.; CHANG, C. Targeting androgen receptor in bone marrow mesenchymal stem cells leads to better transplantation therapy efficacy in liver cirrhosis. **Hepatology**, v. 57, n. 4, p. 1550–1563, 2013.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E. M.; PERA, M.; MANUELPILLAI, U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 3, p. 577–588, 2007.

LEE, K. S.; NAH, J. J.; LEE, B. C.; LEE, H. T.; LEE, H. S.; SO, B. J.; CHA, S. H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 1, p. 144–151, 2013.

MARCUS, A. J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: Do not discard: Stem Cells Review Series. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 730–742, 2008.

MESZAROS, L. B.; USAS, A.; COOPER, G. M.; HUARD, J. Effect of Host Sex and Sex Hormones on Muscle-Derived Stem Cell-Mediated Bone Formation and Defect Healing. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, p. 1751–1759, 2012.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 10, p. 1549–59, 2005.

MINGRONI-NETTO, R. C.; DESSEN, E. M. B. Células-tronco : o que são e o que serão ? **Genética na Escola**, v. 1, p. 12–15, 2006.

MORAES, C. N. DE; MAIA, L.; DIAS, M. C.; DELL'ÁQUA, C. P. F.; MOTA, L. S. L. S.; CHAPWANYA, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; OBA, E. Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitors cells. **Cell biology international**, v. 40, n. 12, p. 1332–1339, 2016.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. **Placenta**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. S186–S195, 2011. Elsevier Ltd.

PAROLINI, O.; SONCINI, M.; EVANGELISTA, M.; SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? **Regenerative medicine**, v. 4, n. 2, p. 275–291, 2009.

RAY, R.; NOVOTNY, N.; CRISOSTOMO, P. R.; LAHM, T.; ABARBANELL, A.; MELDRUM, D. R. Sex Steroids and Stem Cell Function. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7–8, p. 493–501, 2008.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 2, p. 8, 2005.

SAULNIER, N.; LORIAU, J.; FEBRE, M.; ROBERT, C.; RAKIC, R.; BONTE, T.; BUFF, S.; MADDENS, S. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 47–55, 2016. Elsevier B.V.

SIEGEL, G.; KLUBA, T.; HERMANUTZ-KLEIN, U.; BIEBACK, K.; NORTHOFF, H.; SCHÄFER, R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **BMC medicine**, v. 11, p. 1–20, 2013.

SILINI, A. R.; CARGNONI, A.; MAGATTI, M.; PIANTA, S.; PAROLINI, O. The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 3, p. 1–16, 2015.

STEWART, M. C.; STEWART, A. A. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 243–261, 2011. Elsevier Inc.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and Propagation Methods for Mesenchymal Stromal Cells. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 263–274, 2011.

TROUNSON, A.; MCDONALD, C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. **Cell Stem Cell**, v. 17, n. 1, p. 11–22, 2015. Elsevier Inc.

TROUNSON, A.; THAKAR, R.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical Trials for Stem Cell Therapies. **BMC Med**, v. 9, n. 1741–7015 (Electronic), p. 52, 2011.

URANIO, M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361–373, 2011.

WILSON, C. A.; DAVIES, D. C. The control of sexual differentiation of the reproductive system and brain. **Reproduction**, v. 133, n. 2, p. 331–359, 2007.

ZAGO, M. A. Célula-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo; Atheneu, p.03-20, 2006.

CAPÍTULO 2

ARTIGO

Artigo a ser submetido na revista “Experimental Cell Research”, cujas normas se encontram no site: <https://www.elsevier.com/journals/experimental-cell-research/0014-4827/guide-for-authors>.

Avaliação da influência do sexo fetal na cinética e caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais da placenta de cães

Nathália Genú Nakazato^{1*}, Bruna De Vita², Josiane Adelaide Camargo Lourenção¹, Rogério Antônio de Oliveira³, Camilla P. Freita Dell’Aqua¹, Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga¹, Nereu Carlos Prestes¹.

¹ Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

² Veterinária autônoma

³ Departamento de Bioestatística, Instituto de Biosciências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

*Autor correspondente:

Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Correa, s/n
Bairro: Unesp Campus de Botucatu
CEP: 18.618-681 – Botucatu – SP, Brasil
E-mail: tata_genu@hotmail.com

RESUMO

Estudos das células-tronco mesenquimais (CTMs) comprovaram a influência do sexo do doador nas suas capacidades proliferativa e imunomoduladora. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é investigar se há disparidades entre as células da placenta derivada de fetos de sexos diferentes, fato que ainda não foi descrito na medicina veterinária. Foram coletadas 11 pares de membrana alantoamniótica de cães (ALAM), isoladas por digestão enzimática e cultivadas. Utilizamos amostras de tecido para avaliação histológica e imunohistoquímica. Avaliamos os cultivos celulares para padrões morfológico, proliferativo e de capacidade de diferenciação. A justaposição íntima das membranas alantoideana e amniótica observada nos cortes histológicos justifica estudá-las juntas. Observamos que as células obtidas da ALAM de ambos os sexos apresentaram características semelhantes. As alterações morfológicas foram consistentes entre as amostras, e a viabilidade e a curva de crescimento apresentaram $p > 0,05$. As células demonstraram capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica. Na imunocitquímica, as amostras expressaram a vimentina e os marcadores de pluripotência (Oct-4 e Nanog). Na citometria de fluxo, elas expressaram valores significativos de CD44 e CD90, além da baixa expressão de CD34 e MHCII. Esses resultados indicam não haver diferença entre as células quando comparamos as células da ALAM derivadas de fetos de sexos diferentes, mas sugerem seu uso futuramente na medicina regenerativa.

Palavras-chave: anexos fetais, dimorfismo sexual, gênero, membrana alantoideana, membrana amniótica

1. INTRODUÇÃO

A terapia com células-tronco (CT) tem se desenvolvido cada vez mais na medicina regenerativa, na busca de tratamentos mais eficientes, capazes de substituir ou remodelar tecidos lesionados, além de fornecer fatores extracelulares capazes de estimular efeitos endógenos e modular o sistema imune (TROUNSON et al., 2011).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) adultas ou somáticas estão presente em todos os tecidos do organismo (FORTIER, 2005), atuando como pequenos reservatórios de células indiferenciadas (ZAGO; COVAS, 2006). Seu uso em pesquisas e testes clínicos tem predileção por não apresentarem o risco de formação tumoral das células embrionárias, somado a um isolamento e cultivo mais fácil e com menos problemas éticos (RYAN et al., 2005; GONÇALVES et al., 2014).

Entre as diversas fonte de CTMs, o estudo das células derivadas dos anexos fetais deve ser destacado devido à coleta fácil e não invasiva, à uma grande concentração celular, à ótima expansão *in vitro*, à resistência a criopreservação (CREMONESI et al., 2011) e à alta taxa de proliferação celular (FAUZA, 2004).

Os componentes anexos fetais estudados como fonte de CTMs são: o fluido amniótico (FA), a membrana amniótica (MA) e a matriz do cordão umbilical (gelatina de Wharton) (CREMONESI et al., 2011). Entre essas fontes, a MA é considerada ótima para o uso terapêutico por três razões: 1) forte atividade imunomoduladora devido à supressão da atividade dos linfócitos T e imunogenicidade fraca ou ausente; 2) capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como também em células de outras camadas germinativas; 3) utilização desse tecido como adjunto cicatricial de feridas, sobrevivendo por longos períodos em associação a outros tecidos ou órgãos (PAROLINI; CARUSO, 2011).

Neste trabalho, visamos estudar a caracterização da membrana alantoamniótica (ALAM) de cães, focando na avaliação das diferenças entre as células derivadas de placentas de fetos fêmea quando comparadas com as de feto macho.

As diferenças entre o sexo feminino e o sexo masculino vão muito além do dimorfismo sexual, pois os hormônios predominantes de cada sexo têm uma

grande influência fisiológica no organismo, resultando em variação na ação de algumas enfermidades, bem como na produção de fatores de proteção e modulação da resposta imune do organismo (RAY et al., 2008).

Na literatura, é possível encontrar diversas referências ao dimorfismo sexual atuando nas características e capacidades das CTMs. As células da medula óssea (MO) de mulheres são consideradas menores, com melhor capacidade de proliferação e maior potencial de supressão da proliferação das células T (SIEGEL et al., 2013). Quando utilizadas no tratamento de isquemias causadas por infarto do miocárdio, as células de MO de doadoras mulheres apresentaram-se mais eficientes no reparo funcional e melhor fator de proteção, devido a maior produção de VEGF, apoptose reduzida e menor liberação de TNF- α (CRISOSTOMO et al., 2007). As CTMs derivadas do tecido adiposo (TA) de coelhos demonstraram capacidade de diferenciação osteogênica superior para doadores machos, enquanto as doadoras fêmeas apresentaram melhor diferenciação adipogênica (DUDAS et al., 2008). Já em relação às células derivadas do músculo estriado esquelético, as fêmeas foram mais eficientes na reparação tecidual, porém os machos apresentaram maior capacidade de diferenciação condrogênica e melhor eficiência no reparo de defeitos osteocondrais (MESZAROS et al., 2012).

Essa disparidade entre as características cinéticas, fenotípicas e imunomoduladores das CTMs derivadas de diversas fontes permite questionar a possibilidade dessas diferenças estarem presentes nas células derivadas dos anexos fetais, pois o desenvolvimento e a diferenciação sexual do macho, dependem da produção do hormônio antimulleriano e da testosterona produzida pelos testículos (APPARÍCIO, 2015). Pesquisas em humanos já comprovaram a presença, atuação e diferença de concentração dos hormônios esteroidais no líquido amniótico (LA), observando maiores concentrações de testosterona e androstenediona nos fetos do sexo masculino e valores de estradiol mais elevados no sexo feminino (BEEK et al., 2004).

De Vita et al. (2015) procuraram avaliar a influência do sexo fetal no fenótipo e na capacidade imunomoduladora das células derivadas da membrana amnióticas de humanos, porém observaram que não houve diferença na capacidade de supressão dos linfócitos T quando compararam os sexos diferentes.

Considerando-se os diferentes estudos e as diversas fontes de CTMs estudadas, nossa hipótese é de que as células derivadas da ALAM de fetos fêmeas possuem características mais vantajosas para uma aplicabilidade clínica futura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp – Campus de Botucatu, sob o Protocolo CEUA 158/2016.

2.1. Coleta de amostras

As placentas foram coletadas em pares, compostos de 1 feto macho e 1 feto fêmea, no momento da cesariana em caso de parto distócico de 6 cadelas, com idade variando entre 2 e 8 anos, porte pequeno a médio e de raças diversas. O material foi acondicionado em vasilhames plásticos transparentes, com solução de ringer com lactato, e transportadas imediatamente para o laboratório para o processamento.

2.2. Caracterização histológica

2.2.1. Análise morfológica

Foi realizada a análise morfológica do tecido das ALAM por meio de cortes histológicos corados em HE de 12 amostras (6 fêmeas e 6 machos) de acordo com o que foi descrito por Aralla et al. (2013). O material foi fixado em formalina tamponada a 10% pH 7,4. Após esse procedimento, foi lavado em água corrente e imerso em álcool 70%. Os fragmentos foram incluídos em parafina plástica (Paraplast®), seccionados transversalmente a 4µm e montados em lâminas silanizadas (Knitell Starfrost®). As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), analisadas e documentadas no aumento de 400x no fotomicroscópio (Zeiss Axio II).

2.2.2. Imunohistoquímica

Quatro pares de alantoamnion foram selecionados para a análise imunohistoquímica, no qual foram testados os anticorpos vimentina (Mouse Anti-vimentin – Bio-Rad – MCA862), citoqueratina (Anti-human – Dako – AE1/AE3) e

estrógeno- α (Anti-human – Dako – 1D5). Os cortes foram desparafinizados em estufa a 55°C por uma hora e em banhos crescentes de xilol I, II e III por 10 minutos. Foram hidratados em banho de etanol (I, II e III e etanol a 90%, 80%, 70% e 50%) e, posteriormente, submetidas a 10 passagens de água destilada.

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução de citrato de sódio 10mM pH 6,0, corrigida com hidróxido de sódio, em sistema Pascal (Dako®, USA). Em sequência, realizou-se o bloqueio de peroxidases endógenas com kit comercial (Polymer Detection System; Leica®, Wetzlar, Germany) durante 40 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada por 10 vezes e realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com Protein Block (Polymer Detection System; Leica®, Wetzlar, Germany) durante 20 minutos. As lâminas foram novamente lavadas com água destilada e solução tamponada TRIS – pH 7,4 (Trizma Base®- Sigma ChemicalCo, USA) e incubadas com os anticorpos primários, na diluição de 1:100, em overnight durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Para o controle negativo, utilizou-se uma lâmina com fragmento de alantoâmion incubada sem anticorpo primário.

Após o período de incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com solução tampão TRIS – pH 7,4 e incubadas com anticorpo secundário Histofine® (polímero hrp – Nichirei Bioscience) por 30 minutos em estufa a 27°C. Em seguida, lavou-se novamente com solução tampão TRIS – pH 7,4, sendo realizada a revelação com o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzina – Liquid DAB Cromogen® – DAKO, USA) por 5 minutos e, posteriormente, lavou-se mais uma vez os cortes com tampão TRIS – pH 7,4.

Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por três minutos e montados com resina sintética (Permount®, Fisher Scientific®). As lâminas foram analisadas e documentadas no aumento de 400X no fotomicroscópio.

2.3. Isolamento e cultivo celular

No laboratório a membrana alantoamniótica foi separada do hematoma marginal e lavada novamente com a solução ringer com lactato. Posteriormente, essa membrana foi seccionada em fragmentos de 1cm², brevemente descontaminada em solução de iodopovidona (PVPI) 10% diluído em PBS (Gibco, EUA) (1:40), mantidas imersas de 3 a 5 minutos em solução de PBS com

2.5% de anfotericina e 2.5% de penicilina/estreptomicina e, por fim, lavadas em solução de PBS por 5 minutos.

As amostras foram submetidas a digestão mecânica, sendo novamente seccionadas com duas lâminas de bisturi para reduzir o seu tamanho e facilitar o processo de digestão enzimática com a solução de collagenase tipo 1 a 0,04% (Invitrogen, Carisbad, EUA) em banho maria a 37,5°C por um período de 90 a 120 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Após a digestão, a porção sobrenadante foi filtrada em filtros de 70µm (Falcon, Nova York, EUA), diluídas em PBS (1:1) e centrifugadas a 900G por 10 minutos para a remoção completa da collagenase.

As células foram contadas em câmara de Neubauer (HBC®), cultivadas em frascos plásticos de cultivo T25 (Sarsdedt, Nümbrecht, Alemanha) – no meio composto por DMEN/F12 (1:1), 20% soro fetal bovina (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 1,1% de anfotericina B (Gibco, EUA) e 0,009% de amicacina – a 37,5°C, na estufa, em atmosfera com 95% de umidade e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas e após atingir 80% de confluência, as células foram ressuspendidas com auxílio da enzima tripsina (Gibco, EUA) e novamente plaqueadas. As amostras foram congeladas entre primeira e segunda passagem (P1 e P2) em criotubos com meio de congelamento composto por 90% de SFB e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) para futuras análises, utilizando o container de criopreservação Mr Frosty™ (Nalgene® – Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

2.4. Caracterização citológica

2.4.1. Viabilidade

A viabilidade foi realizada no momento da contagem celular entre as passagens e após o descongelamento das amostras entre o cultivo primário (CP) e a terceira passagem (P3). Para isso, foi utilizado o método de exclusão com o corante Azul de Tripán (Gibco, EUA) na proporção de 1:1, no qual as células mortas ficaram coradas de azul. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada da seguinte forma: (total de células vivas / total de células vivas e mortas) X 100.

2.4.2. Avaliação cinética da proliferação das MA-CTMs

2.4.2.1. Curva de crescimento

Na avaliação da curva de crescimento, realizada em 13 amostras (8 fêmeas e 5 machos) em P4, as amostras foram plaqueadas em 5 poços nas placas de 24 poços (Sarsdedt, Nümbrecht, Alemanha), a uma densidade de 2×10^3 células/cm² e cultivadas no meio de cultivo previamente descrito. Após 48 horas, o primeiro poço foi ressuspensionado para a contagem de células e esse procedimento foi repetido a cada 48 horas por 10 dias.

2.4.2.2. Ensaio das unidades formadoras de colônias de células fibroblastóides (CFU-C)

13 amostras (8 fêmeas e 5 machos) foram cultivadas em P4, em duplicatas e com a densidade de 250 células por cm² em placas de 24 poços durante 10 dias, tendo o meio sido trocado na metade do tempo. Passado esse período, o meio foi retirado, os poços foram lavados duas vezes com PBS, as colônias foram fixadas com formol 10% e coradas com Cristal Violeta durante 15 minutos e novamente lavadas para a contagem. Apenas colônias formadas por pelo menos 15 células nucleadas foram contabilizadas e a média entre os dois poços foi usada para o cálculo da eficiência de formação de colônia (EFC) que equivale a: (número de colônias formadas / número de células plaqueadas) X 100.

2.4.3. Citometria de fluxo

A caracterização imunofenotípica e a avaliação de granulosidade e tamanho celular foram realizadas por meio da análise de citometria de fluxo. A avaliação foi feita com o auxílio de anticorpos conjugados para os marcadores de superfície específicos para as CTMs: CD44 (Rat anti Dog – AbdSerotec – MCA 104 1A488) e CD90 (Anti canine – eBioscience – clone YKIX337.217). Além disso, verificou-se a ausência de expressão de marcadores característicos de outros tipos celulares como o CD34 (Mouse anti canine – AbdSerotec – MCA 2411F) e o MHCII (Rat anti Dog – AbdSerotec – MCA 1044F).

A granulosidade e o tamanho celular foram analisados simultaneamente à imunofenotipagem com as células controle, por meio da média e da mediana dos parâmetros FSC-A (forward scatter), indicando o tamanho celular, e SSC-A (side scatter), referente a granulosidade ou complexidade celular.

As análises foram conduzidas à fresco em P4 com a concentração de 1×10^5 células em tubos transparentes de citometria. Essas amostras foram diluídas em 100µl de solução PBS e incubadas por 1 hora com os anticorpos na concentração de 1:100, exceto o tubo controle. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS e ressuspensas em 400µl de solução PBS para análise no citômetro de fluxo BD LSR Fortessa™, contabilizando-se 5.000 eventos.

2.4.4. Imunocitoquímica

Quatro pares de amostra foram selecionados para o teste qualitativo de imunocitoquímica, visando identificar se há ou não a expressão de receptores de estrógeno- α e confirmar a expressão de vimentina e a ausência de marcação da citoqueratina. Os anticorpos são os mesmos utilizados na imunohistoquímica. Ademais, foi verificada a expressão dos marcadores de pluripotência Oct-4 (Mouse Anti-Oct-4 – Millipore – 7f7-1) e Nanog (Mouse Anti-Nanog – Millipore – 7f9-2).

As amostras foram fixadas com paraformaldeído tamponado 4% a 4°C durante 20 minutos. Em seguida, as amostras foram permeabilizadas com Permwash em diluição de 1:10 durante cinco minutos a temperatura ambiente e então lavadas com solução tampão (PBS). Após esse procedimento, realizou-se o bloqueio de peroxidase endógena por 20 minutos com Kit comercial Peroxidase Block. As amostras foram lavadas duas vezes com PBS e realizou-se o bloqueio de proteínas inespecíficas com Kit comercial Protein Block. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários diluídos na proporção de 1:100 durante 18 horas a 4°C.

Para o controle negativo, dois poços foram utilizados sem anticorpo primário. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário HiDef por 30 minutos (solução 1 por 15 minutos e solução 2 por 15 minutos) em temperatura ambiente. Foram novamente lavados, sendo realizado a revelação com o cromógeno DAB, por 5 minutos, e posteriormente lavados com PBS. As amostras foram então contracoradas com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas com PBS, analisadas e fotografadas em microscópio invertido (Leica DM IRB – EUA) e fotografadas com a câmera digital (Leica DFC310 FX – EUA) acoplada ao microscópio.

2.4.5. Diferenciação in vitro

2.4.5.1. Osteogênica

As células de 5 pares de amostra foram plaqueadas em P4 na concentração de 5×10^3 células por cm^2 em quatro poços da placa de 24 poços, sendo dois deles para controle e dois para diferenciação. Após atingirem aproximadamente 80% de confluência, os poços controle permaneceram sendo cultivados em meio de cultivo normal e, nos outros dois, foi acrescido o meio de indução de diferenciação osteogênica (Kit de diferenciação Osteogênica – *Stem Pro* – Gibco®, EUA). As amostras foram cultivadas a $37,5^\circ\text{C}$, com 95% de umidade e 5% de CO_2 , por 15 dias, com troca de meio a cada 72 horas.

Após o período de cultivo, os poços foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% e corados com solução de *Alizarin Red* 2,5% (Sigma-Aldrich, EUA) para facilitar a identificação dos depósitos extracelulares de cálcio.

2.4.5.2. Adipogênica

Foram utilizadas 5 amostras em P4 nas condições previamente descritas na osteogênica, utilizando-se o meio de indução da diferenciação adipogênica (Kit de diferenciação Adipogênica – *Stem Pro* – Gibco®). As amostras foram cultivadas a $37,5^\circ\text{C}$, com 95% de umidade e 5% de CO_2 , por 15 dias, com troca de meio a cada três dias.

Após a diferenciação, os poços foram lavados com PBS, fixados com paraformaldeído 4% e corados com *Oil Red O* 0,5% em álcool isopropílico (Sigma-Aldrich, EUA) para facilitar a identificação das gotículas de lipídio que se acumularam no citoplasma das células e contracorados com hematoxilina de Mayer por 3 minutos.

2.5. Análise estatística

Os dados referentes as variáveis viabilidade, curva de crescimento e citometria foram analisados pelo programa estatístico SAS versão 9.3. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) dos modelos lineares generalizados para encontrar as possíveis causas das variações observadas nos dados (sexo e tempo, sexo e viabilidade em passagens diferentes, sexo e tamanho, sexo e complexidade celular e sexo e expressão de marcadores de superfície – incluindo a possível interação entre eles). Quando necessário, aplicou-se o teste

de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas, para verificar quais médias apresentavam diferenças estatisticamente significativas. Adotou-se o nível de significância dos testes estatísticos igual a 5% ($p < 0.05$).

3. RESULTADOS

3.1. Análise histomorfológica

Quando comparados a placenta de fetos de ambos os sexos, não houve diferenças no padrão morfológico entre as amostras. Ademais, em cada corte, foram observadas duas regiões distintas: o epitélio e o estroma.

O epitélio do lado ectodérmico apresenta as células epiteliais da membrana amniótica, denominados amniócitos, caracterizadas por células cúbicas, com núcleos grandes e um grande número de protusões citoplasmáticas. Já o epitélio contrário pertence à membrana alantoideana, cujas células são caracterizadas pelo formato cuboide e vacuolizadas, sendo denominadas de alantócitos.

O estroma é composto por tecido conjuntivo denso, formado por células fusiformes e feixes de colágeno dispersos, local de onde são isoladas as CTMs. Nessa camada, foi observada a justaposição íntima das duas membranas fetais, na qual a presença de vascularização (artérias, veias e capilares) é indicativa da porção alantoideana e a região avascular corresponde à membrana amniótica.

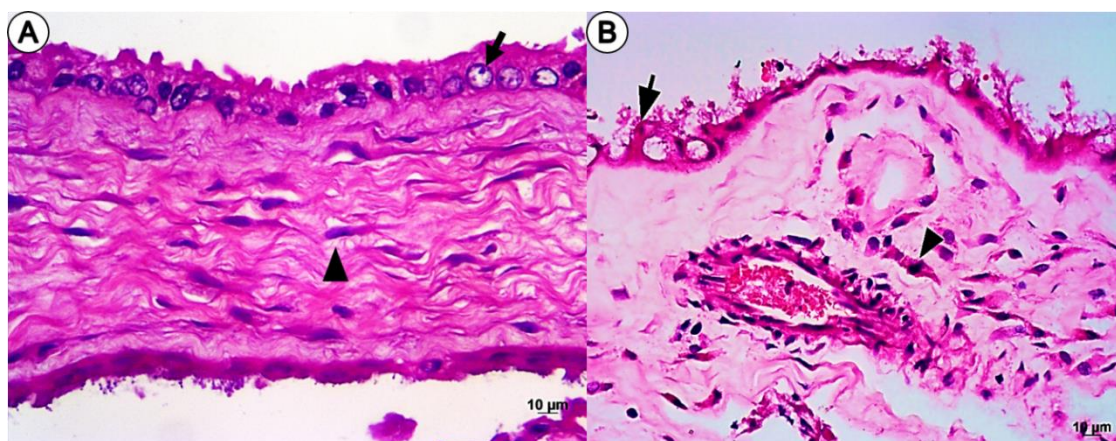


FIGURA 1: Fotomicrografia da membrana alantoamniótica. Epitélio no lado superior da figura observa-se os alantócitos - células grandes com formato cuboide e vacuolizações (seta) -, células estromais fusiformes entremeadas ao colágeno (cabeça de seta) e no lado inferior observamos os amniócitos, que podem perder as suas projeções citoplasmáticas no momento do parto –

placenta de feto fêmea (A). Epitélio com projeções citoplasmáticas apicais (seta), presença de arteríolas na região do alantoide e células estromais fusiforme (cabeça de seta) – placenta de feto macho (B). Coloração com método de hematoxilina e eosina. Aumento 400x. Barra de escala 10 μ m.

3.2. Imunohistoquímica

Todas as amostras avaliadas demonstraram marcação positiva intensa para a citoqueratina (Figura 2B) na região periférica, correspondente ao epitélio, e para a vimentina (Figura 2C), na porção estromal do tecido, região onde encontramos as células mesenquimais. Já a avaliação da expressão dos receptores de estrógeno- α foi considerada negativa nos tecidos placentários (resultado não mostrado).

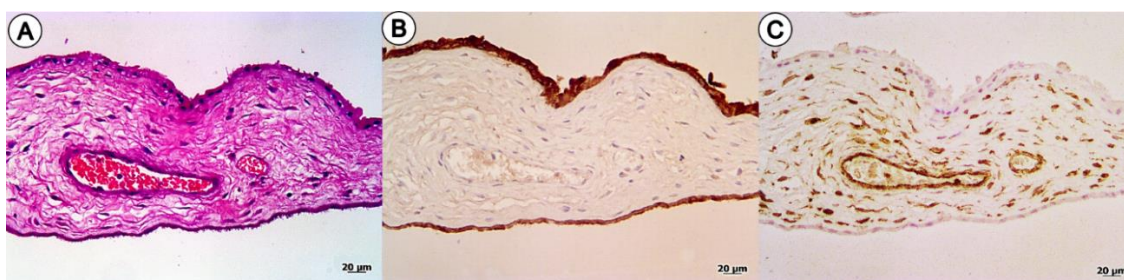


FIGURA 2: Fotomicrografia da membrana alantoamniótica. Corte controle corado com o método de hematoxilina e eosina (HE) (A). Expressão positiva dos receptores de citoqueratina na região correspondente ao epitélio (B). Imunomarcação positiva para vimentina na região mais interna do tecido, que corresponde à localização das células mesenquimais (C). Aumento de 200x. Barra de escala 20 μ m.

3.3. Morfologia celular

No isolamento (cultivo primário) e primeira passagem (P1), as células apresentaram rápida aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide (Figura 3A). Algumas amostras apresentaram, no cultivo primário (CP), outros tipos celulares com morfologia semelhante à de células epiteliais, apresentando um formato poligonal, as quais não foram observados nas passagens seguintes.

A partir da segunda passagem, a maioria das amostras apresentaram alterações na morfologia, observando-se células de tamanhos maiores, as quais

muitas perderam o formato alongado e tornaram-se mais cuboide ou arredondadas enquanto outras apresentaram um citoplasma mais alongado e afilado, ou com projeções citoplasmáticas mais largas. Muitas amostras, ao serem replaqueadas, aderiram ao plástico, porém não alteraram o seu formato esférico que as células apresentam quando em suspensão.

Ademais, observou-se um aumento da produção de debris celulares em todas as amostras, além do aparecimento de uma grande quantidade de vacúolos no citoplasma, sendo um atributo não limitado por sexo do feto do qual se originou a placenta (Figura 3B).

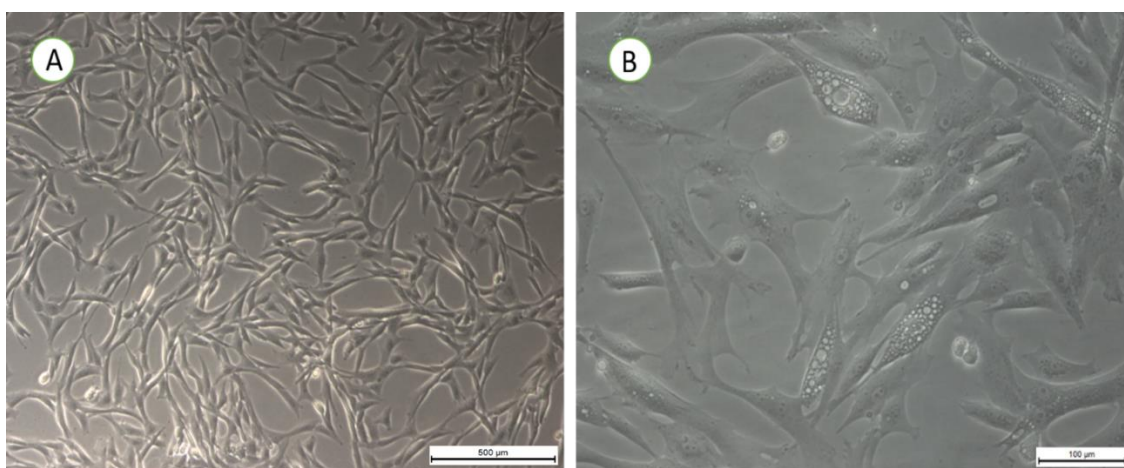


FIGURA 3: Células em cultivo primário. Note a morfologia fibroblastóide. Aumento de 50x. Barra de escala 500 µm (A). Células em quarta passagem (P4) já com projeções citoplasmáticas largas e presença de vacúolos intracitoplasmáticos. Aumento de 200x. Barra de escala 100 µm (B).

3.4. Viabilidade

A média da viabilidade entre as amostras foi realizada com todas as 22 membranas coletadas e foi considerada alta em todas as passagens para ambos os sexos, não havendo diferença ($p > 0,05$) (Tabela 1). Considerando-se que as células, em sua maioria, foram criopreservadas entre as passagens P1 e P2, pode-se atribuir a pequena queda de viabilidade observada em P2 a esse fator, visto que todas as outras passagens mantiveram uma média superior a 90% de viabilidade.

TABELA 1: Média e desvio padrão da porcentagem (%) de viabilidade das células comparando as células derivadas da placenta de feto macho e de feto fêmeas em quatro momentos diferentes: cultivo primário (CP), primeira passagem (P1), segunda passagem (P2) e terceira passagem (P3).

Passagem	Viabilidade (%)*	
	F	M
CP	95,1 ± 2,6 ^a	92,7 ± 6,3 ^a
P1	91,1 ± 5,8 ^a	89,5 ± 6,6 ^a
P2	86,1 ± 10,9 ^a	84,2 ± 14,2 ^a
P3	92,2 ± 3,9 ^a	90,5 ± 8,4 ^a

*p: 0,9989

3.5. Curva de crescimento

A avaliação da curva de crescimento demonstrou um aumento exponencial do crescimento celular, revelando não haver diferença ($p > 0,05$) entre os sexos quanto à capacidade de proliferação. O coeficiente de variação do macho foi maior que o da fêmea devido à uma amostra, cuja contagem celular foi mais elevada, quando comparamos com as outras (Figura 4).

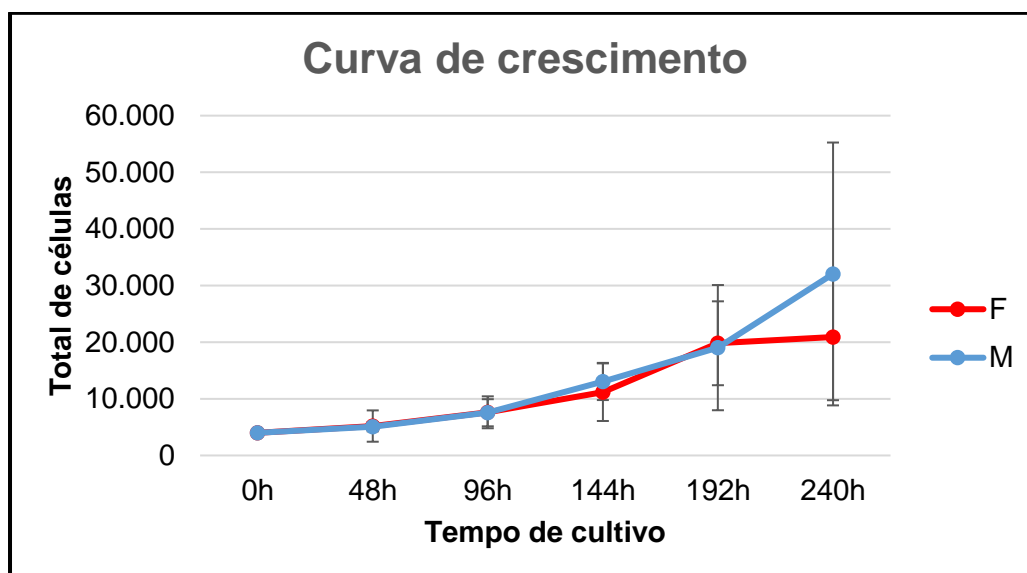


FIGURA 4: Média e desvio padrão da curva de crescimento das células de membrana alantoamniótica de feto fêmea e feto macho. Diferenças ($p=0,4291$) não foram observadas entre os sexos.

3.6. Ensaio das unidades formadoras de colônias de células fibroblastóides (CFU-C)

Entre as amostras avaliadas, a maioria demonstrou não possuir a capacidade de formação de colônia, aderindo ao plástico e crescendo de forma isolada e espalhada (Figura 5B). Considerando a EFC, observou-se somente quatro amostras com um resultado superior a 1%, sendo duas fêmeas (1,7% e 2,5%) e dois machos (2,2% e 1,3%) (Figura 5A).

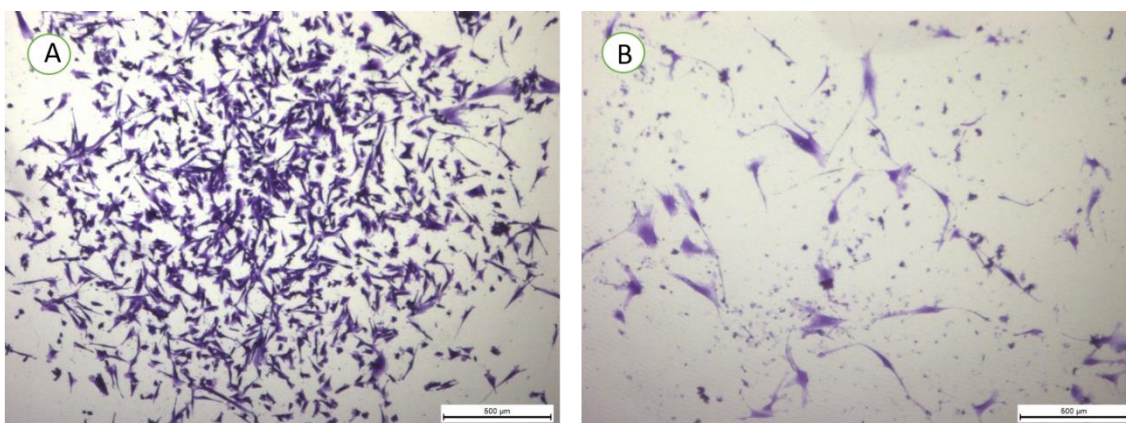


FIGURA 5: Unidade de formação de colônia fibroblastóide. Amostra com capacidade de formação de colônias com 15 ou mais células (A). Células cresceram de forma isolada e em pequenos grupos, não apresentando a capacidade de formar colônias (B). Aumento de 50x. Barra de escala 500 µm.

3.7. Citometria de fluxo

Na análise da citometria de fluxo, foi observado expressão significativa do marcador de células mesenquimais CD44 em ambos os sexos e uma expressão moderada para CD90. Já os marcadores CD34 e MHCII apresentaram uma baixa expressão (Tabela 2).

A citometria de fluxo também permitiu avaliar o tamanho celular e a sua granulosidade, observando-se uma grande heterogenicidade nesses dois parâmetros, porém sem diferenças significativas (Tabela 3).

TABELA 2: Média e desvio padrão para os marcadores CD44, CD90, CD34 e MHCII das CTMs derivadas de membranas alantoamniótica coletadas a termo durante a cesariana de partos distócicos. Não apresentaram diferença ($p>0,05$) quando comparadas a expressão entre os sexos.

Expressão dos Marcadores (%)			
Marcador	F*	M*	P
CD44	50,9 ± 13,8 ^a	57,1 ± 16,6 ^a	0,4857
CD90	32,3 ± 15,1 ^a	26,4 ± 4,0 ^a	0,4193
CD34	4,8 ± 2,6 ^a	5,7 ± 2,6 ^a	0,5857
MHCII	5,3 ± 4,6 ^a	3,7 ± 1,0 ^a	0,4723

*F= fêmea; M= macho

TABELA 3: Análise da média e mediana do tamanho (FSC-A) e granulidade ou complexidade (SSC-A) celular das CTMs derivadas de membrana alantoamniótica de cães na quarta passagem (P4). Diferenças ($p>0,05$) não foram observadas entre macho e fêmea.

Tamanho e complexidade celular*			
	F	M	P
FSC-A_m	100,42 ± 23,87 ^a	107,50 ± 23,90 ^a	0,6110
FSC-A_med	97,57 ± 21,54 ^a	98,40 ± 27,70 ^a	0,9538
SSC-A_m	89,63 ± 24,42 ^a	87,70 ± 28,60 ^a	0,8977
SSC-A_med	76,56 ± 19,51 ^a	67,30 ± 27,40 ^a	0,4915

*Valores multiplicados por 10³.

3.8. Imunocitoquímica

Na avaliação da imunocitoquímica, foi realizada somente a análise descritiva dos resultados obtidos de cultivo celular. A vimentina (Figuras 6C e 6D) e os marcadores de pluripotência Oct-4 e Nanog (Figura 7) apresentaram marcação intensa em todas as amostras e para ambos os sexos. Já a citoqueratina (Figuras 6E e 6F) e os receptores de estrógeno- α (não ilustrado) não apresentaram expressão, sendo considerados negativos.

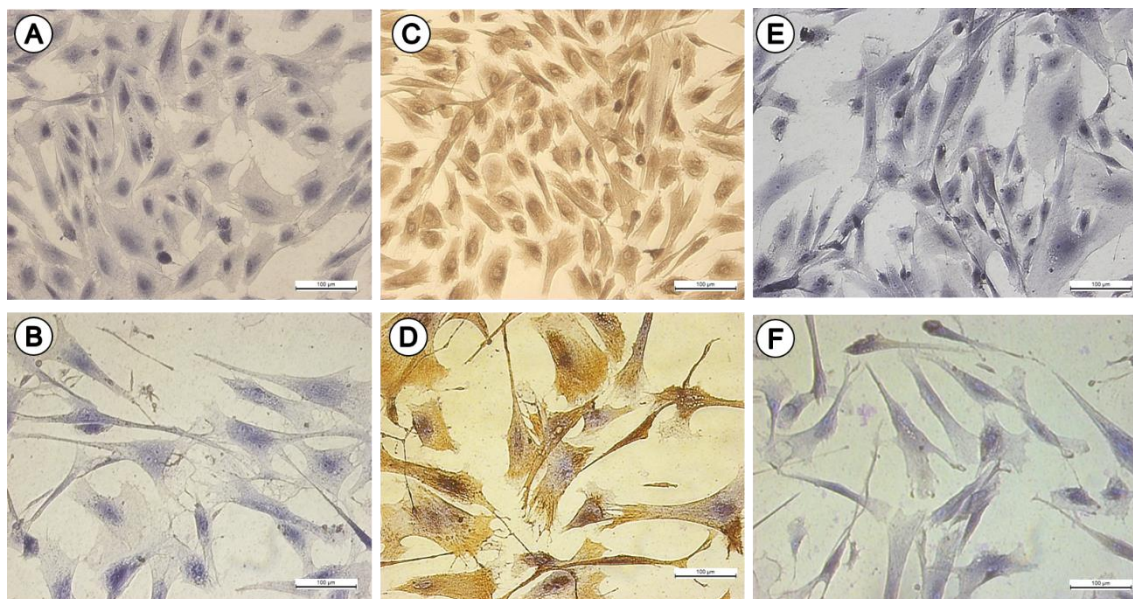


FIGURA 6: Controle negativo - feto fêmea (A) e feto macho (B). Imunomarcacão positiva das células de membrana alantoamnióticas para a vimentina tanto na fêmea (C), quanto no macho (D). Marcação negativa para citoqueratina na fêmea (E) e no macho (F). Aumento de 200x. Barra de escala 100 µm.

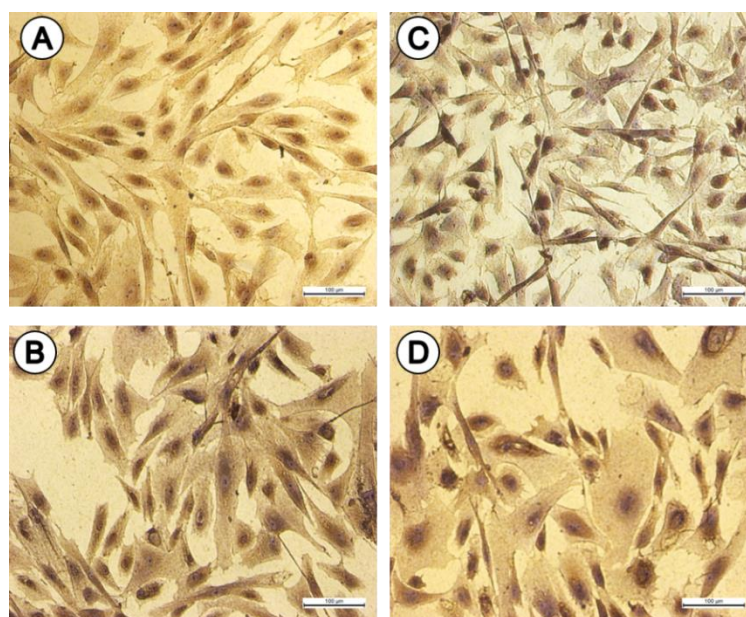


FIGURA 7: Imunocitoquímica. Células isoladas da membrana alantoamniótica de cães intensamente marcadas para os marcadores de pluripotência Nanog e Oct-4 tanto nas fêmeas (A e C), quanto nos machos (B e D). Não houve disparidades entre macho e fêmea. Aumento 200x. Barra de escala 100 µm.

3.9. Diferenciação *in vitro*: osteogênica e adipogênica

Três pares de amostras foram induzidas à diferenciação durante os 15 dias, enquanto outros 2 pares foram fixados com 12 dias para avaliar o progresso de diferenciação.

Na diferenciação osteogênica aos 15 dias, todas as amostras cultivadas com o meio de indução apresentaram intensa deposição de cálcio extracelular tanto nas fêmeas (Figura 8A), quanto nos machos (Figura 8B). Entretanto, as amostras que foram cultivadas por 12 dias não apresentaram coloração de estruturas com o *Alizarin Red*.

Já as amostras induzidas à diferenciação para a linhagem adipogênica foram positivas tanto com 12, como com 15 dias de cultivo, apresentando gotículas lipídicas dentro do citoplasma celular quando coradas com o *Oil Red* e alteração da sua morfologia (Figuras 8C e 8D).

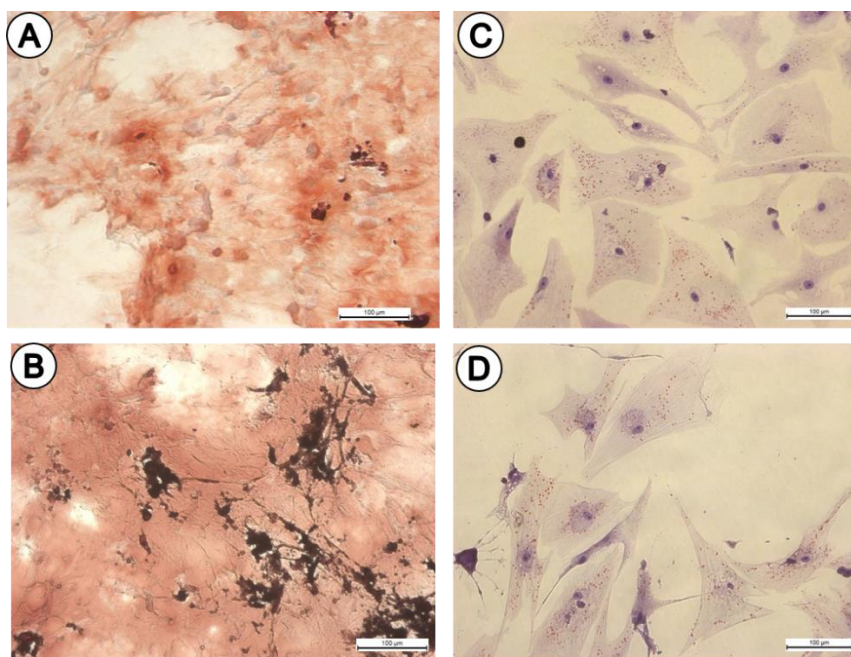


FIGURA 8: Diferenciação *in vitro* das CTMs de membrana alantoamniótica em quarta passagem. Cultivos com meio indutor por 15 dias apresentaram uma intensa marcação com o corante Alizarin Red. Note os depósitos de cálcio extracelular tanto na fêmea (A), quanto no macho (B). As células cultivadas com meio indutor por 12 e 15 dias foram coradas com *Oil Red* e contracoradas com hematoxilina, apresentando gotículas lipídicas no interior do citoplasma e alteração da morfologia celular na fêmea (C) e no macho (D). Aumento 200x. Barra de escala 100 µm.

4. DISCUSSÃO

Até o momento, a comparação das CTMs derivadas dos anexos fetais, de acordo com o sexo do feto, apenas começou a ser explorada na medicina humana. Entretanto, na medicina veterinária, o estudo dessa disparidade entre os sexos, ainda não foi descrita em nenhuma fonte celular.

A análise histológica foi realizada neste trabalho com dois grandes propósitos. Primeiro, quando avaliamos morfológicamente o tecido como um todo, é possível observar que a membrana alantoideana se encontra intimamente justaposta à membrana amniótica. Tal fato nos faz questionar se é realmente vantajoso separá-las, como é descrito por diversos autores, ou se estamos descartando uma rica fonte de CTMs.

Atualmente existem centenas de trabalhos relatando o uso das células mesenquimais ou epiteliais da membrana amniótica em diversas espécies. Porém, tratando-se de estudos da membrana alantoideana, esse valor se torna praticamente nulo. Arias et al. (2017) descreveram em seu trabalho o estudo das características proliferativas, fenotípicas, imunomoduladoras e de diferenciação das células derivadas dessa fonte em equinos e concluíram que, de fato, são células com alta expressão de marcadores de CTMs e de marcadores de pluripotência, com grande eficiência de multiplicação e formação de colônias e com a capacidade de liberar citocinas envolvidas na resposta imune do organismo.

Segundo, foi utilizada a análise histológica para comparar se existe ou não a expressão de receptores de estrógeno- α nas membranas e, caso fossem positivas, se continuariam a ser expressadas pelas células. O anticorpo utilizado para a análise foi o mesmo para os dois testes, porém houve somente marcação dos receptores de estrógeno- α no controle positivo da histologia. Já nas amostras de membranas, não houve marcação celular. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado em cortes histológicos por Costa et al. (2015), cujo trabalho revela que as placentas a termo podem não expressar esses receptores nos cães.

A análise da expressão dos receptores da citoqueratina, característico de células epiteliais, e de vimentina, marcador comumente expresso por células mesenquimais, estão de acordo com o que foi descrito por Minazaki et al. (2008)

na placenta de gatas e nos permite confirmar que a região de junção entre as duas membranas se trata de um tecido mesenquimal.

Os resultados obtidos neste trabalho quanto ao cultivo celular podem conter discrepâncias em relação a outros estudos constantes na literatura devido à dificuldade de padronização entre laboratórios e instituições, especialmente tratando-se do método de isolamento, do meio de cultivo utilizado e, especificamente para este experimento, do local de coleta das amostras, pois os experimentos com placenta de cães estudaram o uso do âmnion isoladamente. Durante esse experimento, foram coletadas 22 placentas (11 pares) e isoladas para o cultivo. No entanto, apesar do bom crescimento inicial, 9 amostras (3 fêmeas e 6 machos) apresentaram redução na expansão e multiplicação celular.

O aumento de tamanho e a mudança na morfologia alongada foram previamente relatadas por Screven et al. (2014) na CTMs oriundas do tecido adiposo e da medula óssea. Hodgkiss-Geere et al. (2012) também descreveram em seu trabalho um aumento de tamanho celular e projeções citoplasmáticas mais largas nas CTMs da medula óssea após a quarta passagem em diante. Os estudos envolvendo a caracterização das células da membrana amniótica de cães, entretanto, contradizem os resultados observados durante esse experimento, descrevendo a capacidade dessas células de atingirem passagens avançadas sem alterações de morfologia, viabilidade ou capacidade de replicação (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012; SAULNIER et al., 2016).

Bonab et al. (2006) descreveram nas células da medula óssea de humanos uma variação no tamanho e na morfologia por volta de 70 dias de cultivo. Foi observada também a formação de debris no meio de cultivo e o desenvolvimento de grânulos citoplasmáticos que, posteriormente, se tornaram vacúolos, algo muito semelhante ao que foi constatado no cultivo das células de alantoamnion.

Essas características são atribuídas a cultivos de células derivadas de doadores mais velhos ou após muitas passagens (BONAB et al., 2006), o que torna os resultados obtidos intrigantes, pois as alterações morfológicas foram observadas a partir da segunda passagem (P2) em anexos placentários, que são considerados tecidos jovens. Supõe-se que o meio e as condições de cultivo ou a forma de isolamento tenham contribuído para essas alterações.

A presença de vacúolos poderia também ser um indicativo de diferenciação espontânea dessas células, ou de início da apoptose celular. Entretanto, Arruda

(2014) descreveu o isolamento e o cultivo da membrana amniótica de forma semelhante, porém com alterações morfológicas menos exacerbadas durante o cultivo e a expansão celular.

A presença das células com morfologia característica às epiteliais obtidas no cultivo primário, também foram descritas na MA de cães por Saulnier et al. (2016), que de forma semelhante ao presente trabalho não persistiram após a primeira passagem.

Lima (2012) também analisou CTMs derivadas de âmnion de cães e descreveu a presença de células gigantes, com uma grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos. Nesse mesmo trabalho, o autor relatou a formação de carcinomas embrionários em camundongos imunossuprimidos, que foram injetados com essas células. Tais resultados permitem a suposição de que as alterações morfológicas observadas durante o cultivo celular podem ser um indicativo da mutação dessas células, tornando-as suscetíveis à formação tumoral. Em contrapartida, Winck (2012) e Cardoso et al. (2016) repetiram o cultivo celular de MA-CTMs e a inoculação em camundongos e não observaram formações tumorais em até 60 dias após.

Os valores obtidos na viabilidade celular se mostraram constantes pelas passagens e, mesmo com uma ligeira queda em P2, não houve diferença ($p > 0,05$). Essa consistência da viabilidade nas primeiras quatro passagens já havia sido descrita por Uranio et al. (2014) na membrana amniótica de cães.

O teste de avaliação da capacidade de formação de colônias revelou algo que Takemitsu et al. (2012) já haviam descrito em células de tecido adiposo de cães, cujas características de crescimento apresentaram células espalhadas e isoladas, sem a capacidade de formação de colônias. Guercio et al. (2012), por outro lado, fizeram a mesma análise com células do tecido adiposo e as descreveram como capazes de formar colônias durante o cultivo celular.

A avaliação da curva de crescimento das células isoladas da placenta não apontou diferenças entre os sexos, fato que vai contra ao que foi observado por Siegel et al. (2013), pois, em seu trabalho com humanos, comprovaram que as células derivadas de doadoras de medula óssea do sexo feminino apresentaram maior proliferação quando comparadas aos doadores homens. Em contrapartida, Deasy et al. (2007) descreveram uma capacidade proliferativa superior para as CTMs derivadas do músculo esquelético nos homens.

As análises realizadas com o citômetro de fluxo possibilitam caracterizar as células como mesenquimais a partir da combinação de expressão ou ausência de marcadores de superfície específicos. Outra avaliação feita nesse equipamento, foi a mensuração do tamanho e da complexidade das células, que não apresentaram diferenças entre os sexos. Tal fato contradiz os resultados observados por Siegel et al. (2013), visto que eles foram capazes de comprovar o tamanho reduzido das células de doadoras mulheres, fator que possivelmente também influenciou sua maior capacidade de proliferação e menor tempo de duplicação em cultivo.

Uranio et al. (2011) identificaram como marcadores expressos para a membrana amniótica de cães o CD44, CD184 e CD29 na primeira passagem (P1). Entretanto, a partir da segunda passagem (P2), somente o CD184 foi expresso. Essa perda de expressão de marcadores mesenquimais com o avanço das passagens celulares precisa ser estudado mais a fundo, pois nesse experimento detectamos a expressão de CD44 ainda em terceira passagem (P3). Outros estudos envolvendo a análise de CTMs de MA em cães (SAULNIER et al., 2016) e de várias fontes entre os anexos fetais com gatas (IACONO et al., 2012) demonstraram uma porcentagem de expressão desse marcador superior ao que observamos (IACONO et al., 2012).

O marcador CD90 foi descrito em diversos tipos de CTs, como endometrial, hepático, queratinócitos e mesenquimais (PARK et al., 2012). A expressão mais baixa desse marcador nesse experimento foi também observada nas células do TA, MO (TAKEMITSU et al., 2012) e em outros estudos com MA (CARDOSO et al., 2016). Por outro lado, existem divergências na literatura quanto à intensidade de expressão desse marcador na membrana amniótica, variando de 10% (CARDOSO et al., 2016), passando por 71% (SAULNIER et al., 2016) até 99% (PARK et al., 2012) quando avaliadas por citometria de fluxo.

A baixa expressão do CD34 na membrana amniótica de cães já havia sido descrita por Cardoso et al. (2016), porém a maior parte da literatura referente à caracterização das MA-CTMs descreve esse marcador como não expresso (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012; SAULNIER et al., 2016). Iacono et al. (2012) identificaram nas gatas uma expressão significativa de CD34 para células derivadas do alantocóron, do líquido amniótico e do líquido alantoideano, porém a expressão para as MA-CTMs foi semelhante ao presente experimento. Já

Vieira et al. (2010) descrevem uma expressão de 10% desse marcador em células de TA de cães.

Considerando estudos como esses, Gonçalves et al. (2014) descreveram a população das CTMs como extremamente heterogênea, podendo existir células mesenquimais capazes de expressar o marcador CD34. A diferença entre metodologias de isolamento e até mesmo de cultivo nos permite supor que sejam a causa da baixa, porém presente, expressão do CD34 e MHCII. Lee et al. (2013) compararam seus resultados com outras pesquisas e observaram que as células digeridas com colagenase expressaram alguns marcadores de superfície de forma diferente quando comparados com o isolamento por *explants*.

Apesar de a análise ser apenas descritiva, observamos em ambos os sexos a expressão dos marcadores Oct-4 e Nanog, que normalmente são expressos por células embrionárias, pois estão associados à capacidade de diferenciação de células pluripotentes. Nos cães, a presença já foi descrita em MA-CTMs por Uranio et al. (2011) e Cardoso et al. (2016) para o Oct-4 e por Park et al. (2012) para ambos os marcadores. Estudos de MA-CTMs em outras espécies como bovinos (CAMPOS et al., 2017), ovinos (MAURO et al., 2010) e ratos (MARCUS et al., 2008) também descrevem a presença desses ou de outros marcadores de pluripotência.

A expressão positiva para vimentina e negativa para citoqueratina estão de acordo com os resultados esperados, pois sua análise foi importante para comprovar que não haviam resquício de células epiteliais identificadas no cultivo primário de algumas amostras, marcando positivamente somente para células mesenquimais, como foi mostrada por Minazaki et al. (2008) na placenta de gatas.

Quanto à capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais, tanto as fêmeas quanto os machos responderam positivamente à indução adipogênica desde 12 dias de cultivo, apresentando gotículas lipídicas no interior do citoplasma, que posteriormente coraram com *Oil Red*. É importante destacar que a maioria dos vacúolos previamente observados permaneceram inalterados e não foram corados. Já na diferenciação osteogênica, foi possível observar o acúmulo de cálcio na região extracelular a partir de 15 dias de cultivo.

Arruda (2014) descreveu, em seu experimento com MA-CTMs de cães, o início da diferenciação osteogênica com 13 dias e 8 dias para a adipogênica, por outro lado, Park et al. (2012) descreveram a diferenciação de ambos somente após 21 dias de cultivo. Uranio et al. (2011) observaram após 14 dias de cultivo a expressão do gene osteonectina, entretanto, em um estudo posterior, não observaram a deposição de cálcio extracelular após 16 dias de cultivo (URANIO et al., 2014) nas MA-CTMs de cães.

5. CONCLUSÃO

Baseando-se nos resultados obtidos neste estudo, contrário ao que foi inicialmente postulado como hipótese, não podemos afirmar a existência de disparidades entre as células derivadas da membrana alantoamniótica, quando comparamos o sexo fetal.

Ademais, as alterações observadas no cultivo celular de outras fontes de CTMs são um indicativo de que essas características podem não ser restritas aos anexos fetais e que talvez seja uma característica intrínseca das CTMs oriundas da espécie canina.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARALLA, M.; GROPPETTI, D.; CALDARINI, L.; CREMONESI, F.; ARRIGHI, S. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p. 15–22, 2013. Elsevier Ltd.

ARIAS, M. L. L.; NAKAZATO, N. G.; ARRUDA, I.; MONTEIRO, B. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; DE VITA, B. Mesenchymal stem cells (MSCS) derives from equine allantois (AL): Characterization and immunomodulatory potencial of na alternative source. **Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Transfer (SBTE)**. Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 2017.

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

BEEK, C. VAN DE; THIJSSSEN, J. H. H.; COHEN-KETTENIS, P. T.; GOOZEN, S. H. M. VAN; BUITELAAR, J. K. Relationships between sex hormones assessed in amniotic fluid, and maternal and umbilical cord serum: What is the best source of information to investigate the effects of fetal hormonal exposure? **Hormones and Behavior**, v. 46, n. 5, p. 663–669, 2004.

BONAB, M. M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC cell biology**, v. 7, n. 14, p. 1–7, 2006.

CAMPOS, L. L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; IKEDA, T. L.; MONTEIRO, B. A.; MAIA, L. FREITAS-DELLÁQUA, C. P.; DE VITA, B. Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 278–286, 2017.

CARDOSO, M.; PINHEIRO, A.; VIDANE, A.; CASALS, J. B.; OLIVEIRA, V. C.; GONÇALVES, N. J. N.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 3, p. 1–7, 2016.

COSTA, M. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LOURENÇÃO, J. A. C.; PADOVANI, C. R.; AMORIM, R. L.; PRESTES, N. C. Análise da expressão de receptores para progesterona e estrógeno α em placentas caninas provenientes de eutocia e distocia. , p. 394–398, 2016.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: Progress and perspectives. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1400–1415, 2011. Elsevier Inc.

CRISOSTOMO, P. R.; MARKEL, T. A.; WANG, M.; LAHM, T.; LILEMOE, K. D.; MELDRUM, D. R. In the adult mesenchymal stem cell population, source gender is a biologically relevant aspect of protective power. **Surgery**, v. 142, n. 2, p. 215–221, 2007.

DEASY, B. M.; LU, A.; TEBBETS, J. C.; FEDUSKA, J. M.; SCHUGAR, R. C.; POLLET, J. B.; SUN, B.; URISH, K. L.; GHARAIBEH, B. M.; CAO, B.; RUBIN, R. T.; HUARD, J. A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: Female cells have higher muscle regeneration efficiency. **Journal of Cell Biology**, v. 177, n. 1, p. 73–86, 2007.

DE VITA, B.; ROMELE, P.; DE MUNARI, S.; VERTUA, E.; SIGNORONI, P. B.; MUGATTI, M.; PIANTA, S.; CARGNONI, A.; SILINI, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; PAROLINI, O. Influence of gender on the phenotype and immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells from the amniotic membrane of human term placenta. **Proceedings of 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**. San Juan, Porto Rico, June, 2015.

DUDAS, J. R.; LOSEE, J. E.; PENASCINO, V. M.; SMITH, D. M.; COOPER, G. M.; MOONEY, M. P.; JIANG, S.; RUBIN, J. P.; MARRA, K. G. Leporine-derived adipose precursor cells exhibit in vitro osteogenic potential. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 19, p. 360–368, 2008.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877–891, 2004.

FORTIER, L. A. Stem cells: Classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 5, p. 415–423, 2005.

GONÇALVES, N. N.; AMBRÓSIO, C. E.; PIEDRAHITA, J. A. Stem cells and regenerative medicine in domestic and companion animals: A multispecies perspective. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. s4, p. 2–10, 2014.

GUERCIO, A.; MARCO, P. DI; CASELLA, S.; CANNELLA, V.; RUSSOTTO, L.; PURPARI, G.; DI BELLA, S.; PICCIONE, G. Production of canine mesenchymal stem cells from adipose tissue and their application in dogs with chronic osteoarthritis of the humeroradial joints. **Cell Biology International**, v. 36, n. 2, p. 189–194, 2012.

HODGKISS-GEERE, H. M.; ARGYLE, D. J.; CORCORAN, B. M.; WHITELAW, B.; MILNE, E.; BENNETT, D.; ARGYLE, S. A. Characterisation and differentiation potential of bone marrow derived canine mesenchymal stem cells. **Veterinary Journal**, v. 194, n. 3, p. 361–368, 2012. Elsevier Ltd.

IACONO, E.; CUNTO, M.; ZAMBELLI, D.; RICCI, F.; TAZZARI, P. L.; MERLO, B. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v. 36, n. 2, p. 107–118, 2012.

LEE, K. S.; NAH, J. J.; LEE, B. C.; LEE, H. T.; LEE, H. S.; SO, B. J.; CHA, S. H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in**

Veterinary Science, v. 94, n. 1, p. 144–151, 2013.

LIMA, E. B. Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão. 2012. 150p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, v. 76, n. 2, p. 130–144, 2008. International Society of Differentiation.

MAURO, A.; TURRIANI, M.; IOANNONI, A.; RUSSO, V.; MARTELLI, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINOCCHI, D.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. SUPPL.1, p. 25–28, 2010.

MESZAROS, L. B.; USAS, A.; COOPER, G. M.; HUARD, J. Effect of Host Sex and Sex Hormones on Muscle-Derived Stem Cell-Mediated Bone Formation and Defect Healing. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, p. 1751–1759, 2012.

MINAZAKI, C. K.; GAGIOTI, S.; ZAGO, D.; TERRA, W.; ARAUJO, V. C.; OLIVEIRA, R. A.; BEVILACQUA, E. Acid phosphatase and cathepsin D are active expressed enzymes in the placenta of the cat. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 3, p. 326–334, 2008.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S.; KANG, K. S. Isolation and Characterization of Canine Amniotic Membrane-Derived Multipotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. **Placenta**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. S186–S195, 2011. Elsevier Ltd.

RAY, R.; NOVOTNY, N.; CRISOSTOMO, P. R.; LAHM, T.; ABARBANELL, A.; MELDRUM, D. R. Sex Steroids and Stem Cell Function. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 7–8, p. 493–501, 2008.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M.; MAHON, B. P. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 2, p. 8, 2005.

SAULNIER, N.; LORIAU, J.; FEBRE, M.; ROBERT, C.; RAKIC, R.; BONTE, T.; BUFF, S.; MADDENS, S. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 47–55, 2016. Elsevier B.V.

SCREVEN, R.; KENYON, E.; MYERS, M. J.; YANCY, H. F.; SKASKO, M.; BOXER, L.; BIGLEY, E. C.; BORJESSON, D. L.; ZHU, M. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 161, n. 1–2, p. 21–31, 2014. Elsevier B.V.

SIEGEL, G.; KLUBA, T.; HERMANUTZ-KLEIN, U.; BIEBACK, K.; NORTHOFF, H.; SCHÄFER, R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **BMC medicine**, v. 11, p. 1–20, 2013.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2012. BMC Veterinary Research.

TROUNSON, A.; THAKAR, R.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical Trials for Stem Cell Therapies. **BMC Med**, v. 9, n. 1741–7015 (Electronic), p. 52, 2011.

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 Transplantation**, v. 19, n. 3, p. 279–289, 2010.

URANIO, M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, 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. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361–373, 2011.

URANIO, M.; DELL'AQUILA, M. E.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; VENTURA, M.; CATAACCHIO, C. R.; MARTINO, N. A.; VALENTINI, L. Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 6, p. 539–551, 2014.

WINCK, C. P. Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais. 2012. 68p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ZAGO, M. A. Célula-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo; Atheneu, p.03-20, 2006.