

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/05/2019.

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 descartes (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.

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.