UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DERIVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DE TECIDO OVARIANO NA ESPÉCIE CANINA

Amanda Baracho Trindade

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DERIVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DE TECIDO OVARIANO NA ESPÉCIE CANINA

Amanda Baracho Trindade

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. Lawrence Charles Smith

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área: Reprodução Animal.

2014

Trindade, Amanda Baracho
T833d Derivação de células tronco de tecido ovariano na espécie canina / Amanda Baracho Trindade. – – Jaboticabal, 2015
xvi, 66 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Co-orientador: Lawrence Charles Smith
Banca examinadora: Fabiana Fernandes Bressna, Clara Slade Oliveira
Bibliografia

1. Células tronco mesenquimais. 2. Ovário. 3. Adiposo. 4. Marcadores moleculares. 5. Cão. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:618.11:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DERIVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DE TECIDO OVARIANO NA ESPÉCIE CANINA

AUTORA: AMANDA BARACHO TRINDADE
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA , Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. FABIANA FERNANDES BRESSAN
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Profa. Dra. CLARA SLADE OLIVEIRA
EMBRAPA Gado de Leite / Valença/RJ

Data da realização: 17 de dezembro de 2014.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

AMANDA BARACHO TRINDADE – nascida no município Campinas, SP, aos 29 dias do mês de abril de 1990. Concluiu o curso colegial no "Colégio Integral", na cidade de Campinas, em dezembro de 2007. Ingressou em março de 2008 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no município de Araçatuba, SP; realizou 4 iniciações científicas, foi bolsista CNPQ de 2010 a 2011, pela iniciação científica na disciplina de Inspeção de Produtos de Origem Animal, recebeu "menção honrosa", pelo trabalho apresentado em congresso. Concluiu, em dezembro de 2012, o curso superior em Medicina Veterinária, ocasião na qual recebeu o prêmio "*Dr. Wagner Lavezzo* " de melhor aluna da turma no conjunto de disciplinas de Produção Animal. Em março de 2013 ingressou, no programa de mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de mestrado da FAPESP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meus maiores guerreiros e heróis.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo incentivo incondicional e constante, por se absterem de muitas coisas em prol do conhecimento de seus filhos, nunca poupando esforços para nos proporcionar uma educação de boa qualidade e uma vida muito mais fácil que a deles próprios e, principalmente pelo irrestrito amor, dedicação e participação em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos pela cumplicidade, carinho e presença mesmo de longe, pelos ensinamentos e acima de tudo pelo amor e amizade, sendo além de irmãos, os melhores amigos que alguém poderia querer.

A toda minha família (avós, tias (o) e prima) pelo carinho, apoio durante todo o tempo.

Ao prof. Lawrence C. Smith, primeiro ao me permitir encontrar caminhos próprios, instigando meu raciocino cientifico, a formulação de hipóteses e elaboração de estudos. Pela confiança ao aceitar em seu laboratório, onde tive a oportunidade de realizar não somente os estudos propostos, mas todos aqueles que eu acreditava que podiam ser feitos. Agradeço então, pela orientação, valiosos ensinamentos, confiança e inestimável apoio.

Ao prof. Joaquim Mansano Garcia, pela confiança demonstrada ao longo do trabalho desenvolvido ao me oferecer a oportunidade de mestrado e, novamente, quando aceitou que eu realizasse parte do meu mestrado no exterior. Agradeço pela orientação, apoio e por compartilhar um pouco de sua vasta experiência científica.

À família brasileira que me adotou no Canadá, Carol e Jerônimo, agradeço por tudo, pelo cuidado, pelos passeios, viagens, churrascos, por estarem sempre perto. Aos outros amigos brasileiros que me receberam de maneira tão especial e carinhosa, Luci e Gustavo, Bia e Paulo, muito obrigada!

À Jacinthe Therrien por sua atenção, esforço e dedicação, colaboração de maneira imprescindível para execução deste projeto, pelos momentos de descontração, discussão cientificas e, principalmente pelo carinho.

À Fernanda Gonçalves que mesmo de longe, me ajudou bastante com minhas duvidas iniciais sobre cultivo celular.

Ao Prof. Flávio Meirelles por abrir as portas de seu laboratório e Fabiana Bressan por não poupar esforços para me ajudar na realização do experimento no Brasil.

Aos colegas de trabalho e funcionários do CRRA e da reprodução animal- FCAV que direta ou indiretamente contribuíram com conhecimento fundamentais para minha formação pessoal e profissional.

Esse projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº. 2013/14293-0, no período de 01/12/2013 a 17/12/2014.

Aprovação da comissão de ética

Este projeto foi aprovado (protocolo nº 026991/13) pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UNESP-FCAV, certificando sua conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

SUMÁRIO

Página

DADOS CURRICULARES DA AUTORA ..... **iii**
DEDICATÓRIA ..... **iv**
AGRADECIMENTOS ..... **v**
LISTA DE ABREVIATURAS ..... **x**
LISTA DE QUADROS ..... **xi**
LISTA DE FIGURAS ..... Erro! Indicador não definido.
RESUMO ..... **xiv**
ABSTRACT ..... **xvi**
1.INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA **1**
2. REVISÃO DE LITERATURA **4**
Células Tronco Mesenquimais 4
Isolamento e cultivo das células mesenquimais 5
Caracterização das células tronco mesenquimais 9
Indução e caracterização da diferenciação das células mesenquimais caninas 12
Células tronco no tecido ovariano em mamíferos após o nascimento 15
3. HIPÓTESES **18**
4. OBJETIVOS **19**
5. MATERIAL E MÉTODOS **20**
Experimento I: Obtenção de Células Mesenquimais Caninas 20
Isolamento enzimático 20
Cultivo primário 21
Protocolo para repique celular 22
Avaliação da curva de crescimento celular, tempo de duplicação da população (PDT) e do número de células (CD) 22
Análise do número de unidades formadoras de colônias 23
Experimento II : Imunocitoquímica 23
Citometria de fluxo 24
Expressão gênica 25
Experimento III: Diferenciação em linhagens mesenquimais 28
Diferenciação em linhagem neuronal 28
Análise estatística 28
Delineamento Experimental 29

6. RESULTADOS 30
7. DISCUSSÃO 46
8. CONCLUSÕES 53
9. PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES 54
10. REFERÊNCIAS 55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATSCs: células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

BMSCs : células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

cA-MSC : células tronco mesenquimais caninas derivadas do tecido adiposo

CFU : unidade formadora de colônia

cMSCs : células tronco mesenquimais caninas

cO-MSC : células tronco mesenquimais caninas derivadas do tecido ovariano

CT: células tronco

CTE: células tronco embrionárias

DMEM : meio de Eagle modificado por Dulbecco

FACS: citometria de fluxo

HLA: antígeno leucocitário humano

IMDM : meio de dulbecco modificado por iscove

iPS: células tronco induzidas para pluripotência

MEM: meio essencial mínimo

MSCs: células tronco mesenquimais

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDT : tempo de duplicação da população

SFB : soro fetal bovino

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1. Confirmação da diferenciação através dos marcadores específicos nas cMSC.....14

Quadro 2. Descrição dos anticorpos que foram utilizados nas análises de imunofluorescência e citometria de fluxo na diluição 1:100 24

Quadro 3. Sequência de primers utilizados para análise de PCR 27

Quadro 4. Idade dos animais utilizados no experimento, peso em gramas do tecidos utilizados para derivação celular. 30

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Etapas da derivação celular do tecido ovariano e adiposo. A: tecidos antes da digestão enzimática. B: tecidos fragmentados e incubados com colagenase a 37℃ . C: tecidos após 3 horas de digestão enzimática, seguida de centrifugação.....21

Figura 2. Morfologia fibroblástica das células de origem ovariana (A) e (C) e adiposa (B) e (D), após 72 horas do cultivo primário, observadas em microscópio invertido, em contraste de fase. 31

Figura 3. Curva de crescimento celular utilizando-se a média de quatro animais para cada tecido. Não houve diferença estatística, no entanto é possível perceber que as cO-MSCs iniciam o crescimento exponencial mais tarde quando comparadas com as cA-MSCs, na passagem inicial. 32

Figura 4. Tempo de duplicação da população nas cO-MSCs e cA-MSCs em passagens inicial e avançada, mostrando (A e B) que não houve diferença estatística entre a média dos quatro animais dos dois tecidos em ambas as passagens. Sendo que o tempo para duplicar praticamente dobrou (B) na passagem avançada em relação à inicial (A).....33

Figura 5. Avaliação do número de colônias formadas. A: as cA-MSCc mostraram maior capacidade de formar colônia em passagem inicial ($p<0,05$).B: as cO-MSCs formaram colônias menores do que as cA-MSC (C). 34

Figura 6. Fotomicrografia do resultado da análise de imunocitoquímica. As cO-MSC mostraram ser positivas para CD44 e negativas para CD90, ao passo que as cA-MSC foram positivas para CD90 e CD44. Ambas foram negativas para marcadores hematopoéticos (CD34 e CD45), utilizando-se anticorpos específicos para cão, descritos no quadro 2. 36

Figura 7. Resultados gráficos da análise de citometria de fluxo, de um animal, para (A) MSC, (B) de células hematopoéticas e (C) de pluripotência. 38

Figura 8. Média da expressão relativa de marcadores de células mesenquimais para as cO-MSCs e cA-MSCs (n=4), em passagens iniciais e avançadas. Não houve diferença estatística (test t com correção de Welch) entre os tecidos para cada marcador ($p>0,05$). 40

Figura 9. Média da expressão relativa de marcadores de células pluripotentes para as cO-MSCs e cA-MSCs (n=4), em passagens inicial e avançada. Não houve diferença estatística (test t com correção de Welch) entre os tecidos para cada marcador (p>0,05). 41

Figura 10. Fotomicrografia da diferenciação adipogênica, após coloração com Oil Red O, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X. 42

Figura 11. Fotomicrografia da diferenciação osteogênica, após coloração com Von Kossa, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X. 43

Figura 12. Fotomicrografia da diferenciação condrogênica, após coloração com Safroinina O, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X. 44

Figura 13. Diferenciação neurogênica. Fotomicrografia do resultado da análise de imunocitoquímica das cA-MSCs e cO-MSCs após 10 dias de indução neural para a proteína nestina (A) e tubulina (B). C: PCR semi-quantitativo mostrando a amplificação de GAPDH por ambos os tipos de células derivadas, GDNF e BDNF somente pelas cO-MSCs..... 45

DERIVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO DE TECIDO OVARIANO NA ESPÉCIE CANINA- RESUMO

O estudo de células tronco em cães corrobora com o progresso das terapias celulares, tanto veterinárias quanto humanas, uma vez que a espécie canina é um modelo de estudo para desenvolvimento de doenças humanas hereditárias e, também, adquiridas. As CT multipotentes derivadas de tecido são geralmente as mais utilizadas, sobretudo pela facilidade de obtenção por meio do próprio animal (autólogas) e por não envolverem questões éticas, as quais limitam o uso das células tronco embrionárias. Estudos recentes e promissores demonstraram a existência de CT no ovário, com grande capacidade de proliferação e possível capacidade pluripotente. Com base nessas evidências, este projeto propôs a obtenção de células tronco isoladas a partir do tecido ovariano de cães adultos, utilizando o tecido adiposo como controle. Para tanto, foram delineados três experimentos: o experimento I possuía o objetivo de verificar as características de crescimento e morfológicas. Então, foi realizado o isolamento de células provenientes do tecido ovariano e adiposo, após digestão em colagenase, Após 3h do inicio do cultivo, foi realizada a primeira troca de meio para seleção de células aderentes ao plástico. Após 72h de cultivo primário, o tecido adiposo possuía mais células por grama de tecido em relação ao ovariano (1937 ± 592,6 vs 1771 ± 262,1), ambas as células derivadas apresentaram morfologia fibroblástica. Em relação às análises de crescimento, o tempo de duplicação da população foi similar em ambos os tipos celulares. Tanto as células do tecido adiposo, como as do ovariano foram capazes de formar colônias, entretanto as do tecido adiposo mostraram uma maior capacidade de formar colônias que as células do tecido ovariano (37,08 ± 2,10 vs. 27,08 ± 1,45, $p<0,05$). O experimento II possuía o objetivo de realizar a caracterização molecular das células obtidas no experimento I. Tanto as células do tecido adiposo como as do ovariano expressaram os genes CD90, CD44, CD184 e CD 105 por PCR. Pela análise de imunocitoquímica, ambas foram negativas para CD45 e CD34 e positivas para CD44, no entanto, somente as derivadas do tecido adiposo foram positivas para CD90. Pela citometria de fluxo, 37,08%+-11,35% da população das células derivadas do tecido ovariano foram positivas para CD90, enquanto 62,05%+-8,40% foram positivas do tecido adiposo. Para o marcador CD44, 57,17%+-11,89% foram positivas para CD44 para o tecido ovariano e 77,67%+-3,56% foram positivas para o tecido adiposo. Para os marcadores de pluripotência, ambos os tipos celulares derivados expressaram Nanog, TERT, Sox2 e Oct4 pelo PCR, sendo

que o Oct4 foi mais expresso pelas células do tecido ovariano (4,96 ± 0,81 vs 0,68 ± 0,51). O mesmo foi observado para o Oct4 pela citometria de fluxo, sendo que 49,47%+-15,17% das células derivadas do tecido ovariano foram positivas para esse marcador, ao passo que 9,70%+-2,64% das células do tecido adiposo foram positivas. O experimento III tinha como objetivo verificar a capacidade de diferenciação das células isoladas no experimento I, foi verificado que ambos os tipos celulares possuem a capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica e neurogênica. Interessantemente, as células do tecido ovariano possuíam mais células diferenciadas para linhagens mesenquimais. Para linhagem neurogênica, somente as células do tecido ovariano expressaram GDNF, BDNF por PCR, ao passo que ambas foram positivas para nestina e beta-tubulina. A identificação de novas fontes de CT é imprescindível para o progresso científico e para o da terapia celular. Deste modo, o presente estudo identificou uma nova fonte de células tronco provenientes de tecido ovariano canino com potencial futuro para uma gama de aplicações clínicas.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, ovário, adiposo, marcadores moleculares, citometria, cão.

DERIVATION OF CANINE OVARIAN STEM CELLS - ABSTRACT

Research with canine stem cells contributes to the progress of veterinary and human cellular therapies, because the dog is often the best animal model for many hereditary and acquired human diseases. While embryonic SC have unlimited differentiation potential (i.e. pluripotent), adult-derived multipotent SC are often preferred for ease of recovery from the patient itself (i.e. autologous) and for avoiding ethical constraints of destroying embryos to obtain pluripotent SC. Recent promising studies have shown the existence SC in ovarian tissue, that have greater proliferative and differentiation potential than SC in other adult tissues. Based on this evidence, the aim of this project was to obtain stem cells isolated from ovarian tissue of adult dogs. In experiment I, we evaluated morphological and kinetic properties of collagenase-digested ovarian and adipose derived SC. Adipose derived cells yielded more cells per tissue after 72h in culture (1937 ± 592.6 vs 1771 ± 262.1), both cells had the same fibroblastic morphology. The growth curve showed that adipose derived cells started the exponential growth before the ovarian derived cells, however when the both were multiplying, the population doubling time was the same. All the derived cells types were able to form colonies, however, adipose derived cells formed more colonies than ovarian derived cells (37.08 ± 2.10 vs. 27.08 ± 1.45). Experiment II aimed at characterizing at the molecular level the SC obtained in experiment I. We evaluated the expression of mesenchymal and pluripotent markers through immunofluorescence (flow cytometry and confocal microscopy) and PCR. Both cells from expressed CD90, CD44, CD194 and CD 105 by PCR, were positive for CD44, CD90 (only the adipose tissue) and negative for CD45 and CD34 by immunocytochemistry analysis. By flow cytometry, 37.08%+-11.35% of the population of cells derived from ovarian tissue was positive for CD90, while 62.05%+-8.40% of adipose tissue was positive. For the CD44 marker, 57.17%+-11.89% were positive for ovarian tissue and 77.67%+-3.56% were positive for adipose tissue. For pluripotency markers, both derived cell types expressed Nanog, TERT, Sox2 and Oct4 by qRT-PCR, however Oct4 was more expressed in the ovarian tissue cells (4.96 ± 0.81 ± 0.50 vs. 0.68). By FACS was observed the same for Oct4 and, 49.47% ± 15.17% of cells derived from ovarian tissue were positive for this marker, whereas 9.70% ± 2.64% of adipose tissue cells were positive. Experiment III was designed to verify the functional ability of isolated cells in experiment I and both cell types have the capacity to differentiate into adipogenic, osteogenic, chondrogenic and neurogenic lineages. Interestingly, cells from the ovarian tissue had more differentiated

cells. For neurogenic lineage, PCR was performed for two neural lineage markers (GDNF, BDNF) and only ovarian derived cells expressed those markers, whereas for nestin and beta-tubulin by immunofluorescence both derived cells were positive. In the present study, ovarian derived stem cells showed some advantages when compared with adipose cells. Nonetheless, the identification of new sources of adult SC is essential for scientific progress in cellular therapy. Overall, we identified an ovarian source of adult SC for a wide range of clinical applications.

Keywords: Mesenchymal stem cells, ovary, molecular markers, flow cytometry, dog.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O termo “Células tronco” foi citado no século XIX por Edmund Beecher Wilson como sinônimo de uma célula primordial germinativa, mitoticamente quiescente de origem embrionária ou de animais adultos, capaz de regenerar uma variedade de tecidos (WILSON, 1963). As células tronco (CT) são definidas por sua capacidade de autorrenovação e pelo seu potencial de diferenciação em células funcionais, sob condições adequadas (GAZIT et al., 2011).

Nos animais, podem ser identificadas duas classes de células tronco: embrionárias (CTE), que estão presentes na massa celular interna do embrião e possuem a capacidade de originar tecidos das três camadas germinativas (endoderme, ectoderme e mesoderme), propriedade que as caracterizam como pluripotentes. Outro tipo celular é denominado células somáticas adultas, que são responsáveis pela homeostase do tecido, de maneira que podem residir em diversos tecidos (GAZIT, et al., 2011).

Apesar da grande vantagem das CTE, a pluripotência, o uso das mesmas é questionado em relação à ética, imunogenicidade e formação de tecidos neoplásicos (DEL CARLO et al., 2008), o que pode limitar a aplicação clínica de tais células, de maneira que a possibilidade de induzir e manter a pluripotência em células adultas torna-se alvo de diversos estudos. Em 2006, células somáticas foram reprogramadas a um estado pluripotente, pela introdução de fatores de transcrição (OCT3/4, SOX2, KLF4 e C-MYC) em seu genoma. Tais células foram denominadas células induzidas para pluripotência (iPS) e possuíam características similares à ESC, incluindo habilidade de originar tecidos provenientes das três camadas germinativas tanto *in vitro* como *in vitro* e apresentam alto potencial proliferativo (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006).

As células tronco mesenquimais (MSC) tem capacidade limitada de diferenciação (multipotentes) e por isso estão em categoria inferior às ESC a hierarquia das células tronco (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). No entanto, a facilidade de obtenção, potencial proliferativo e o fato de serem isoladas de indivíduos adultos e possibilidade de tratamento autólogo, aumentam o interesse pelas MSC, que tornaram–se alvo de diversas pesquisas científicas. Além dessas vantagens, as MSC não expressam antígenos HLA classe II e são

consideradas não imunogênicas, podendo contribuir para transplante alogênico, sem necessidade de imunossupressão (HORWITZ et al., 1999; SAKURADA et al., 2008). Adicionalmente, estudos recentes em uma variedade de doenças, demonstraram a capacidade das MSC em encontrar o sítio da lesão e auxiliar no reparo da injúria quando injetadas (JONES e MCTAGGART, 2008). A plasticidade das MSC tornou possível o desenvolvimento de terapias celular e, para este efeito é interessante realizar a criopreservação, a fim de se obter uma fonte pronta de células tronco autólogas (MARTINELLO et al., 2011). Segundo Gazit et al. (2011), as MSC têm sido palco de bastante discussão pública envolvendo questionamentos sobre a veracidade dessas células, onde a questão central é se elas podem ser diferenciadas em células de natureza não mesenquimal.

Estudos recentes e promissores revelaram a existência de células tronco germinais no ovário de camundongos e humanos adultos (JOHNSON et al., 2004; VIRANT-KLUN, et al. 2008; ZOU et al., 2009; PACCHIAROTTI et al., 2010; ZOU et al., 2011; WHITE et al., 2012), um órgão que durante décadas foi caracterizado por não ser passível de autorrenovação após o nascimento. Zou et al. (2009) relataram que células tronco germinais, isoladas de camundongo, são mitoticamente ativas durante o cultivo in vitro e se proliferam 24 horas após o início do cultivo (ZOU et al., 2011). Além disso, essas células mostraram ser estáveis, continuaram se proliferando por mais de 68 passagens, mantiveram o mesmo potencial após criopreservação e ainda, foram capazes de se diferenciar em oócitos e regenerar folículos quando transplantadas para o ovário de camundongos fêmeas, que haviam sido previamente esterilizadas com quimioterapia (ZOU et al., 2009). Ainda nesse trabalho, foi demonstrado não somente a capacidade das CT em originar oócitos imaturos, mas também a capacidade desses oócitos em produzirem descentes *in vivo* (ZOU et al., 2009). Virant-Klun *et al.* (2008), relataram pela primeira vez, a expressão de marcadores de células tronco embrionárias nas células tronco ovarianas, que foram obtidas a partir da superfície epitelial do ovário de mulheres na menopausa e com infertilidade ovariana. Essas células se diferenciaram em: células semelhantes a mioblastos, semelhantes a neurônios, semelhantes a epitelial e semelhantes a oócitos. Ainda, essas células apresentaram forte expressão de genes relacionados à pluripotência (OCT4,

OCT4A, OCT4B, SOX-2, NANOG). Esses resultados possuem implicações não somente na biotecnologia da reprodução, com a regeneração folicular e geração de novos oócitos, mas também para o uso futuro de CT na medicina regenerativa, proporcionando uma nova perspectiva para tratamento autólogo de infertilidade ovariana e desenvolvimento de modelos para terapia celular.

Portanto, o presente estudo objetivou derivar células mesenquimais do tecido ovariano na espécie canina, utilizando o tecido adiposo como controle, uma vez que é um tecido onde a derivação e caracterização das MSC já foram bastante estudadas. O modelo cão torna-se relevante pois além de ser um importante paciente o cão além de ser um importante paciente na veterinária para a medicina veterinária (MARTINELLO et al., 2011), a cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia é frequentemente realizada, sendo possível a realização de um banco celular. Outra vantagem da utilização da espécie canina é por ser a mais utilizada na pesquisa pré-clínica de transplante (KIRK et al., 2003), representando um modelo experimental para doenças humanas, uma vez que mais da metade das doenças hereditárias possui equivalentes em humano, no que diz respeito às similaridades na apresentação da doença, fisiologia, e respostas clínicas (SCHNEIDER et al., 2010). Além disso, em comparação com o camundongo, o cão mostrou ter uma cinética das células tronco mais semelhante aos seres humanos (HORN et al., 2004). Portanto, neste estudo o modelo cão poderá fornecer subsídios para humanos ou animais que sofreram esterilização química, pela quimioterapia ou em casos de degeneração ovariana. Ainda, o uso de células mesenquimais permite o tratamento autólogo, uma vantagem em relação às iPS e às células embrionárias. A identificação de novas fontes de CT é imprescindível para o progresso da terapia celular, sendo que as células devem possuir boa capacidade proliferativa, manter as características imunofenotípicas quando cultivadas *in vitro* e mais importante, devem possuir boa capacidade de diferenciação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células Tronco Mesenquimais

Células tronco mesenquimais foram isoladas pela primeira vez, a partir de células da medula óssea, baseando-se na habilidade de aderência ao plástico de cultivo, excluindo-se as células não aderentes. As células aderidas possuíam morfologia semelhantes a fibroblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1966). Após um lag inicial, as células se dividem rapidamente e durante o crescimento inicial *in vitro*, formam colônias e por isso podem ser avaliadas pela capacidade formadora de unidade de colônias (CFU). As MSCs possuem a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e multipotência, com um tempo de duplicação que depende do tecido de onde as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial (BYDLOWSKI, et al.,2009). Embora inicialmente a CFU de MSC tenham sido demonstrada em roedores, já foram descritas em diversas espécies, como gatos, cães, ovelhas, coelhos, primatas não-humanos e seres humanos, variando no número de colônias formadas, principalmente pelas diferentes condições de culturas e natureza das células de acordo com a espécie (BROUARD et al., 2003). Em cães, o crescimento *in vitro* das MSC do tecido adiposo é contínuo, com aumento significativo no comprimento das células de acordo com aumento do período de cultivo (PATRICIO, 2010). As MSCs caninas foram descritas como fibroblásticas, com formato fusiforme, podendo ser facilmente identificadas na histologia pelo tamanho (10-20 µm), citoplasma basofílico, núcleo hipercromático (JUN, et al., 2012) esféricos, acompanhando o formato das células (PATRICIO, 2010).

Uma das principais características das células tronco é a capacidade em originar dois tipos celulares: com as mesmas características tronco, e uma célula progenitora, com potencial de autorrenovação reduzido, processo denominado divisão assimétrica (GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). Por exemplo, em tecidos onde a perda celular é contínua como nas criptas intestinas, sangue e epiderme, a população se mantém equilibrada devido a esse processo (SNIPPERT et al., 2010). O microambiente onde as células se encontram, denominado nicho, controla a decisão do destino para o tipo de divisão celular. De maneira geral os

nichos são tecido-específicos, sendo compostos por fatores de crescimento e suporte arquitetural das células presente no tecido, proporcionando condições que influenciam a divisão simétrica ou assimétrica, de acordo com o estado funcional do tecido. Um exemplo interessante da influência do nicho sobre o tipo de divisão celular acontece nas células tronco espermatogônias (SSC). Logo após o nascimento o nicho favorece a divisão simétrica, uma vez um pool celular precisa ser estabelecido. Para isso as células precisam expandir em número sem que a diferenciação aconteça, enquanto na vida adulta, ocorre um equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação, mantendo a espermatogenêse (OATLEY e RALPH, 2012).

Recentemente foi relatada a presença de células tronco pluripotentes na medula óssea (KURODA et al., 2010) e no tecido adiposo (SIMERMAN et al.,.2014), sendo denominadas células "*multilineage differentiating stress-enduring* (*Muse*)". Estas células são consideradas mesenquimais, que possuem morfologia idêntica à das células mesenquimais normais, que adicionalmente expressam de marcadores clássicos de pluripotência, como SSEA3, Sox2, Oct3 / 4, Nanog e TRA1-81 (KURODA; DEZAWA, 2014). A grande vantagem de tais células é representada pela possibilidade de obtenção de células pluripotentes em organismos adultos que, quando transplantadas, não formam tumores, sendo uma fonte de células promissora para tratamentos clínicos de alta relevância pra contribuição na medicina regenerativa.

2.2. Isolamento e cultivo das células mesenquimais

Nos cães as MSCs já foram derivadas da medula óssea (SILVEIRA et al., 2008; HOU et al., 2011; JUN, et al*.,* 2012; HODGKISS-GEERE et al., 2012a; SPENCER et al.¸ 2012; CHUNG et al., 2012) , tecido dentário (DISSANAYAKA et al., 2011; WANG et al., 2013), fluidos fetais (FERNANDES et al., 2012), cordão umbilical (Lim et al. 2007; Zucconi et al. 2009; LEE et al. 2013,) e tecido adiposo (SILVEIRA et al., 2009; ZHANG et al., 2007; CUI et al., 2007; NEUPANE et al., 2008; SILVEIRA et al., 2008; PATRICIO, 2010; MARTINELLO et al., 2011; CHUNG et al., 2012; PARK et al., 2012; BRONZINI et al., 2012; SPENCER et al.¸2012).

Atualmente, a medula óssea e o tecido adiposo são as principais fontes de MSCs na medicina veterinária (CHUNG et al., 2012). No entanto, foram relatadas algumas vantagens do isolamento do tecido adiposo (ATSCs) em relação às células mesenquimais provenientes da medula óssea (BMSCs), incluindo desenvolvimento mais rápido *in vitro* (CHUNG et al., 2012), maior densidade de células do estroma, isolamento mais fácil (NEUPANE et al., 2008) além do tecido adiposo ser encontrado em uma variedade de compartimentos anatômicos nos cães, sendo facilmente coletado por uma cirurgia que é realizada nessa espécie com bastante frequência, a ovário-salpingo-histerectomia (MARTINELLO et al., 2011).

O tecido adiposo do cão é uma boa fonte de cMSC, de fácil acesso, que possibilita o isolamento das células a partir de pequenas quantidades de tecido (PATRICIO, 2010). Em cães, foi relatado que o isolamento de CT é feito com mais sucesso quando é coletado do tecido adiposo subcutâneo, quando comparado com tecido adiposo do omento e de gordura inguinal. Nesse trabalho o isolamento foi realizado por digestão com colagenase tipo 1 (1mg/mL; NEUPANE *et al.*, 2008). Silveira et al. (2009) realizaram um estudo com a finalidade de padronizar a obtenção das cMSCs provenientes da medula óssea e do tecido adiposo de cães, assim como Zhang et al. (2007), que realizaram um estudo das cMSC do tecido adiposo de um cão para estabelecer uma metodologia para isolamento e cultivo *in vitro* das mesmas. Cui et al. (2007), possuíam o objetivo de utilizar as células cultivadas e diferenciadas em osteoblastos em próteses para o tratamento de grandes defeitos ósseos.

Bronzini et al. (2012) realizaram um estudo experimental para avaliar o impacto das condições de transporte sobre as cA-MSCs caninas e, foi relatado que as células podem ser transportadas em PBS, a temperatura ambiente dentro do período de 9-12h, sendo que após 24h, as células adquirem caracteristicas apoptóticas e tornam-se senescentes. Martinello et al. (2011) demonstaram, pela primeira vez, que cMSCs mantém as características de células tronco após criopreservação e, não houve alteração do potencial de diferenciação das células. Os autores indicam que as células podem ser utilizadas na engenharia tecidual e

terapia celular, frescas ou até 25 dias de cultura. Patricio (2010) realizou análise de morfologia nas cMSCs do tecido adiposo e observou que as células possuem comprimento médio de 87,73 µm, largura média de 21,21 µm e média do diâmetro do núcleo de 16,35 µm, observou também que as células formam CFU em placas, com número médio de 30,59 CFU/placa.

Inúmeros métodos para estabelecimento do cultivo primário ou purificação dessa cultura podem ser realizados, tais como aderência ao plástico da placa de cultivo, centrifugação em gradiente de densidade, utilização de marcadores de superfícies para isolamento de linhagens (CONKIE, 1987). Segundo Gazit et al. (2011), as MSCs derivadas do tecido adiposo podem ser isoladas após o tratamento enzimático com a colagenase. Foi descrito por Martin (1994a) que as enzimas proteolíticas são muito eficazes para isolar as células de um tecido, no entanto, podem também danificá-las. A concentração ótima da enzima, o tempo e a temperatura de incubação devem ser cuidadosamente monitoradas durante o processo de derivação. A colagenase, enzima mais frequentemente usada para isolamento das cMSCs, é capaz de clivar as ligações de colágeno, assim as células são facilmente dispersas do tecido após centrifugação (POUNTOS et al., 2007). Já em relação ao isolamento mecânico, o número de células viáveis é menor que o obtido por outros métodos e muitas células podem permanecer aglomeradas, ao invés de dispersas como células individuais (MORASCA e ERBA, 1987).

Quando a célula é removida do seu tecido original ou organismo para ser cultivada *in vitro*, é necessário que o meio de cultivo ofereça todas as condições, as quais ela estava exposta *in vivo*¸ para que seja capaz de sobreviver, proliferar e se diferenciar (MAURER, 1987). Contudo, o cultivo celular é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo, mantendo as características próprias (FRESHNEY, 1994).

As células são mantidas em incubadora a 37ºC com 5% CO2, o que facilita a manutenção do pH do meio de cultivo (FRESHNEY, 1994). É bem estabelecido que as MSCs possuem a característica de adesão ao substrato plástico da placa de cultura (DOMINICI et al., 2006). Superfícies de cultivo mostraram ter melhor eficiência para o crescimento e diferenciação de alguns tipos celulares, quando

tratadas com colágeno (MAURER, 1987). Após um período no cultivo, as células se dividem rapidamente e formam colônias. Sabe-se que as MSCs podem se expandir inúmeras vezes, sem perder seu potencial de crescimento e pluripotência (BYDLOWSKI, et al., 2009).

Uma variedade de meios são utilizados no cultivo de cMSCs: MEM (JUN, et al., 2012), DMEM (SILVEIRA et al.¸2008; MARTINELLO et al., 2011; HOU et al., 2011; HODGKISS-GEERE et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; PARK et al., 2012; SPENCER et al.¸ 2012; LEE et al., 2013), IMDM (HODGKISS-GEERE et al., 2012b). Em um estudo, que objetivou verificar as características proliferativas e de expansão das células tronco em função do meio utilizado, verificou-se que o DMEM com alta concentração de glicose (DMEM- HG) pode atrasar o desenvolvimento das células (BITTENCOURT et al., 2006).

O soro fetal bovino (SFB) é utilizado no meio de cultivo celular como suplemento, sendo uma fonte de fatores de crescimento e nutrientes vitais, o que auxilia no crescimento e expansão das MSCs e na fixação das células à placa de cultivo (SCHWARZ et al.,2012). Muitas vezes é realizada a inativação do SFB, antes do uso (aquecimento do soro a 56 º C por 30 min), com o intuito de evitar reação imunológica entre as proteínas do soro e as células do cultivo (MARTIN, 1994a).

A glutamina tem sido utilizada em alguns estudos com cMSCs (MARTINELLO et al., 2011; HODGKISS-GEERE et al., 2012a; FERNANDES et al., 2012), sendo que a concentração efetiva no meio é de 0,1 – 0,6g/ L (MARTIN, 1994a).

O uso de antimicrobianos é importante para prevenir contaminação, e na escolha do fármaco é necessário avaliar o tipo de contaminação em que as células possam ser expostas e se a dose utilizada não será toxica. Os antibióticos mais comumente utilizados são a penicilina e a estreptomicina, numa combinação efetiva e relativamente não tóxica na concentração de até 100 U/mL e 100 µg/ mL, respectivamente (MARTIN, 1994a).

De acordo com Martin (1994b) o indicado é de 2- 6 x 10^5 células/ml para o cultivo. Quando introduzidas pela primeira vez em uma cultura, as células não

começam sua divisão imediatamente, existe um atraso que caracteriza a primeira fase de divisão celular (fase lag). Após essa fase, a maioria da população se divide de maneira contínua e logarítmica, durante um período limitado, denominado de fase log. Na sequência, a taxa de crescimento da população diminui, fase denominada de *plateau*. Portanto, a mensuração do número de células em crescimento logarítmico irá originar o tempo de duplicação da população (PDT), uma média para todas as células da cultura (MARTIN, 1994b). Essa análise além de dar uma estimativa do tempo em que as células se tornarão confluentes, o que auxilia no desenvolvimento do experimento, irá caracterizar as células isoladas do tecido adiposo e ovário de cão, auxiliando em estudos futuros. Sabe-se que o aumento no tempo de duplicação pode ser indicativo de citotoxicidade (MARTIN, 1994b), o que pode ser útil em testes farmacêuticos e toxicológicos, por exemplo.

2.3. Caracterização das células tronco mesenquimais

Além de adesão, proliferação e diferenciação em várias linhagens, tentativas para formalizar a caracterização das MSCs foram realizadas com base nos marcadores de superfície celular (STEWART e STEWART, 2011). A caracterização das MSCs pode ser feita por avaliação quantitativa da expressão dos antígenos por citometria de fluxo, caracterizando um perfil imunofenotípico das células (DOMINICI et al., 2006). Essa técnica baseia-se na marcação de células da amostra em suspensão com anticorpos específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (ROITT et al., 1999).

A caracterização pode ser feita por uma avaliação qualitativa, pela técnica de imunocitoquímica. Essa técnica é utilizada para localizar proteínas em uma população de células, derivadas de um tecido e consiste na utilização de anticorpos específicos (geralmente IgGs, mas também IgMs) contra a proteína que se pretende identificar, de modo que a proteína de interesse funciona como um antígeno. Dois tipos de anticorpos podem ser utilizados: policlonais e monoclonais, sendo que os monoclonais são mais específicos, por se ligarem a apenas uma região do antígeno/proteína de interesse. O anticorpo que reconhece o antígeno

denomina-se anticorpo primário, enquanto que aquele com o marcador e que reconhece o anticorpo primário denomina-se anticorpo secundário (SIMERLY, et al. 2003). O primeiro passo é a incubação das células com um anticorpo primário seguida da incubação com o anticorpo secundário, esse ao se ligar ao primário permite a visualização da reação, por apresentar a fluorescência conferida pelo corante (MARTIN, 1994b).

A seleção de células que reagem com anticorpo específico têm sido amplamente utilizada para a separação celular em pesquisas básica e clínica. O uso de esferas magnéticas acopladas ao anticorpo de interesse facilita o isolamento e identificação das células tronco, processo denominado seleção imunomagnética. No entanto, a identificação de marcadores específicos da superfície celular adequados continua sendo um problema crucial associada a esta técnica (ZOU et al., 2011).

Outra análise que pode ser utilizada para a caracterização das células é a quantificação da expressão gênica, pela técnica de PCR em tempo real quantitativo (qRT- PCR). A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar a quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica (LADEIRA et al., 2011).

A caracterização das MSCs através da análise da expressão de antígenos de superfície por citometria de fluxo, foi proposta pelo Comitê de Célula Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), que se baseou em estudos de células derivadas da medula óssea para estabelecer os critérios de caracterização das MSCs em humanos. Até o momento não foi identificado nenhum marcador específico para as células tronco mesenquimais de cão, assim as células são positivamente consideradas cMSCs a partir das características de aderência ao substrato plástico da cultura e capacidade de diferenciação em três linhagens germinativas, desafios futuros exigem a identificação padronizada para as cMSCs.

Geralmente, MSCs são negativas para os marcadores hematopoéticos CD45 e CD34, sendo que essa seleção negativa é utilizada para excluir contaminação com células hematopoéticas (DOMINICI et al., 2006). As cMSCs, derivadas de diferentes tecidos, já demonstraram ser positivas para os marcadores STRO-1, CD45, CD146, CD90, CD44, CD140A, CD117, CD29, CD105, CD184 , NESTINA, CK18, VIMENTINA e para os fatores de transcrição OCT3 / 4, NANOG, SOX-2 e SSEA-4 (JUN, et al., 2012; MARTINELLO et al., 2011; CHUNG et al., 2012; SPENCER et al., 2012; LEE et al., 2013; FERNANDES et al., 2012) e são negativas para CD73, um marcador clássico para MSCs humanas (HODGKISS-GEERE et al., 2012).

Diversos genes são responsáveis pela manutenção da pluripotência e capacidade de autorrenovação das CT, incluindo o SOX2 e OCT-4, que embora sejam descritos como marcadores de ESCs, sua expressão pode ser detectada nas MSCs (GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007). Nos cães os principais marcadores de ECSs são SSEA-3, SSEA-4, OCT3/4, TRA-1-60, TRA1-81 (VAAGS et al., 2009), sendo que nas células mesenquimais caninas já foi demonstrada a expressão de OCT3/4, NANOG, SOX-2, SSEA-4, em CT provenientes de tecido do cordão umbilical (LEE et al., 2013), NANOG, em células derivadas do tecido de polpa dentária, (NANOG; DISSANAYAKA et al., 2011), OCT3/4, em células oriundas de líquidos fetais (FERNANDES et al..¸2012) e OCT3/4, NANOG, SOX-2 em cMSCs do tecido adiposo (NEUPANE et al., 2008). A proteína Oct-4 é um fator de transcrição presente na massa celular interna do blastocisto e epiplasto e a perda da expressão dessa proteína indica que a célula entrou no processo de diferenciação (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000). O SOX-2 é um fator de transcrição regulatório expresso durante o desenvolvimento primário em vários tecidos e nas CTEs (AVILION et al., 2003). O NANOG atua principalmente na manutenção da capacidade de autorrenovação e de indiferenciação das CT (GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007).

2.4. Indução e caracterização da diferenciação das células mesenquimais caninas

A diferenciação das MSCs pode ser induzida pela adição de substâncias químicas (indutoras) adicionadas ao meio de cultivo. A indução à diferenciação pode ter início a partir da 3ª ou 4ª passagem (BITTENCOURT et al., 2006; NEUPANE et al., 2008), evitando o uso das células logo após o isolamento e o início do cultivo, o que previne contaminação com células de outras linhagens (POUNTOS et al., 2007).

As cMSC a partir de diferentes tecidos já foram diferenciadas em linhagem adipogênica (MARTINELLO et al., 2011; SPENCER et al., 2012; ZUCCONI et al., 2009; LEE et al., 2013; WANG et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; SCHWARZ et al., 2012; DISSANAYAKA et al., 2011), neurogênica (LEE et al., 2013; DISSANAYAKA et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; OH et al., 2011; PARK et al., 2012), condrogênica (CHUNG et al., 2012; ZUCCONI et al., 2009; LEE et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; HODGKISS-GEERE et al., 2012; SPENCER et al.¸ 2012), osteogênica (DISSANAYAKA et al., 2011; WANG et al., 2013; FERNANDES et al., 2012; LEE et al., 2013; ZUCCONI et al. 2009; SPENCER et al., 2012; CHUNG et al., 2012; MARTINELLO et al., 2011; SCHWARZ et al., 2012) e miogênica (MARTINELLO et al., 2011).

Para indução à diferenciação em osteoblastos em cães, a maioria dos protocolos inclui o uso da dexametasona, ascorbato de sódio-2-fosfato ou L-ácido ascórbico 2-fosfato, β-glicerol fosfato (MARTINELLO et al., 2011; DISSANAYAKA et al., 2011; JUN, et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; SPENCER et al.¸ 2012; SCHWARZ et al.¸ 2012; WANG et al. 2013;) e, ainda dihidroxivitamina D3 (DISSANAYAKA et al., 2011), em concentrações que variam de acordo com cada protocolo.

Para a linhagem adipogênica, os principais protocolos realizados em cães utilizam dexametasona, insulina e isobutil-1-metilxantina (MARTINELLO et al., 2011; DISSANAYAKA et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; SPENCER et al.¸

2012; SCHWARZ et al. 2012; WANG et al. 2013), sendo que a concentrações das substâncias indutoras também dependem do protocolo utilizado.

A indução da diferenciação em condrócitos na espécie canina, já foi realizada na presença de insulina, transferrina, ácido selenioso, dexametasona, piruvato de sódio (FERNANDES et al., 2012; HODGKISS-GEERE et al., 2012a), ascorbato de sódio-2-fosfato, ácido linoleico (FERNANDES et al., 2012) e fator de crescimento e transformação β (TGF- β1; HODGKISS-GEERE et al., 2012a).

A confirmação da diferenciação pode ser realizada de diferentes maneiras: marcadores moleculares (quadro 1) ou técnicas de coloração. Com a avaliação desses marcadores, o potencial de diferenciação pode ser quantificado (TAKADA et al., 2009).

Existem técnicas de coloração para verificar visualmente a eficiência da diferenciação em diversas linhagens celulares. Para confirmação em linhagem adipogênica utiliza-se o Oil Red O, o que torna possível visualizar os vacúolos de lipídeos, que se coram em vermelho (ZUCCONI et al., 2009; MARTINELLO et al., 2011; DISSANAYAKA et al., 2011; SPENCER et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; WANG et al., 2013; LEE et al., 2013). Para verificar a matriz extracelular calcificada, que está presente na diferenciação em linhagem osteogênica, pode-se utilizar o vermelho de alizarina (ZUCCONI et al., 2009; DISSANAYAKA et al., 2011; SPENCER et al., 2012; WANG et al., 2013; LEE et al., 2013;) ou Von Kossa (ZUCCONI et al., 2009; MARTINELLO et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Os glicosaminoglicanos podem ser corados com azul alciano (SPENCER et al., 2012; LEE et al., 2013) ou azul de toluidina (ZUCCONI et al., 2009) como uma confirmação da diferenciação condrogênica.

Quadro 1. Confirmação da diferenciação através dos marcadores específicos nas cMSC

Marcador	Confirmação da linhagem	Referência bibliográfica
Receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARY)	Adipogênica	Martinello et al. (2011); Spencer et al. (2012)
Proteína Ligadora De Ácido Graxo 4 (FABP4)	Adipogênica	Zucconi et al. (2009); Spencer et al. (2012); Lee et al. (2013)
Lipase Lipoprotéica (LPL)	Adipogênica	Zucconi et al. (2009); Spencer et al. (2012); Lee et al. (2013)
Osterix	Osteogênica	Chung et al. (2012)
Fosfoproteína Secretada 1 (SPP1)	Osteogênica	Martinello et al.(2011)
Colágeno Tipo 1 *A* (COL1A)	Osteogênica	Chung et al. (2012); Spencer et al. (2012); Zucconi et al. (2009)
Osteopontina	Osteogênica	Lee et al.(2013); Zucconi et al.(2009)
Sialoproteína Óssea (BSP)	Osteogênica	Lee et al.(2013); Zucconi et al.(2009)
Colágeno Tipo 2 *A* (COL2A)	Condrogênica	Lee et al.(2013); Zucconi et al.(2009)
Aggrecan	Condrogênica	Lee et al.(2013); Zucconi et al.(2009)
Sox-9	Condrogênica	Lee et al.(2013); Zucconi et al.(2009)

2.5. Células tronco no tecido ovariano em mamíferos após o nascimento

Desde o século XX acreditava-se que não ocorre aumento do número de oócitos primários além dos originados durante a vida fetal. Anos após, essa hipótese foi solidificada com a conclusão de que a infertilidade causada pelo envelhecimento ou injúrias ovarianas ocorria pelo fato do pool de folículos ser estabelecido antes do nascimento e não ser passível de renovação ao longo da vida (ZUCKERMAN, 1951). No entanto, estudos demonstraram evidências que contestam essa hipótese, ao identificar células tronco germinais funcionais no ovário de camundongos e humanos (JOHNSON et al., 2004; VIRANT-KLUN, et al. 2008; ZOU et al., 2009; PACCHIAROTTI et al., 2010; ZOU et al., 2011; WHITE et al., 2012).

Johnson et al. (2004) demonstraram que o ovário de camundongos jovens e adultos possuem células germinativas mitoticamente ativas que, com base nas taxas de atresia oocitária são necessárias para a reconstituição contínua do pool folicular. Para validação dessa hipótese, camundongos fêmeas pré púberes foram submetidas ao tratamento químico para eliminar a reserva de folículos primordiais, sem induzir a atresia e foi demonstrado a existência de células que sustentam a produção de oócitos e folículos no ovário mamífero pós-natal. Quando as células foram injetadas no subcutâneo de camundongos imunossuprimidos não foram capazes de produzir teratoma, sugerindo que não são células pluripotentes.

Zou et al. (2009) isolaram células provenientes do ovário através da desagregação enzimática, seguida de purificação imunomagnética, selecionando as células positivas “Mouse Vasa Homolog“ (MVH), uma proteína expressa exclusivamente nas células germinais. Após 68 passagens e criopreservação, as células continuaram com as mesmas características e quando descongeladas, foram re-cultivadas com sucesso. Na caracterização molecular, foi verificado a expressão de OCT4, MVH, Dazl, Blimp-1, Fragilis, Stella e Rex-1 e não houve de FIGLA, SOX2, NANOG, SCP1 e ZP3. As células foram transfectadas com GFP, um gene repórter, e transplantadas em camundongos que sofreram tratamento quimioterápico para induzir infertilidade pela depleção oocitária. Após dois meses

do transplante, os ovários foram coletados e a presença de oócitos foi confirmada pela morfologia e expressão do GFP, indicando que o transplante de células tronco germinais pode regenerar a função oogênica do ovário. Os animais acasalaram e houve o nascimento de filhotes normais. Esse estudo demonstrou, não só a produção de descendentes em animais, que até então eram estéreis, como também a capacidade de gerar descendência transgênica.

Posteriormente, no intuito de melhorar o método de purificação através da presença de MVH, Zou et al. (2011) realizaram um experimento onde a eficiência da purificação celular foi notavelmente melhorada utilizando o Fragilis, marcador germinal, para seleção celular, em comparação com o uso do MVH.

Virant-Klun et al. (2008), relataram pela primeira vez, a expressão de marcadores de células tronco embrionárias nas células tronco ovarianas, que foram obtidas a partir da superfície epitelial do ovário de mulheres na menopausa e com infertilidade ovariana. Após dias de cultivo, as células se diferenciaram em: “myoblast-like”, “neuronal-like”, “epithelial-like” e “oocyte-like”. As células apresentaram forte expressão de OCT4, OCT4A, OCT4B, SOX-2, NANOG, sendo que os dois últimos diminuíram conforme o aumento do período de cultivo. Pela análise de citometria de fluxo, as células foram positivas para SSEA-2, um marcador putativo de células tronco.

No estudo de Pacchiarotti et al. (2010), o GFP foi utilizado para marcar o OCT4, em células ovarianas de camundongos, após o nascimento e em animais adultos. Duas populações celulares distintas expressaram GFP-OCT4, uma com 1-15 µm, localizadas na superfície do epitélio ovariano e células bem maiores de 50-60 µm, localizadas no centro do compartimento folicular, que pela morfologia e padrão de expressão gênica assemelhavam-se a oócitos. A imunohistoquímica e RT-PCR confirmaram que as células positivas para GFP-OCT4 na superfície do epitélio ovariano também eram positivas para o marcador VASA, C-KIT, SSEA-1 e, apresentaram moderada atividade da telomerase. Quando cultivadas, ocorreu diferenciação espontânea em oócitos primários. Posteriormente, foram injetadas em camundongos imunodeficientes e não foram capazes de formar teratoma, concluindo-se que as células eram multipotentes.

White et al. (2012) tiveram como objetivo testar, em camundongos e humanos, se o marcador de Ddx4 está presente nas células tronco ovarianas e, usar essa propriedade para utilizar FACS (citometria de fluxo), como protocolo para purificar as células isoladas do ovário. Todas as células, selecionadas por este método, expressaram marcadores de células germinais (Prdm1, Dppa3, Ifitm3, Tert, Ddx4 e Dazl) e não expressaram marcadores de oócitos (Nobox, Zp3 e Gdf9), mostrando ser uma boa opção para seleção de células tronco germinais, evitando a contaminação por oócitos. Em outra etapa, as células separadas por FACS foram transfectadas com GFP, camundongos foram submetidos à injúria gonadal e as células foram transplantadas nesses animais com infertilidade induzida. Em concordância com resultados anteriores, foram encontrados folículos contendo esse transgene (ZOU et al., 2009). Para testar a proliferação, essas células foram cultivadas in vitro, usando-se fibroblastos mitoticamente inativos no cultivo, e o resultado foi positivo, elas proliferaram e expressaram Ddx4, tanto as derivadas de camundongos como humanos. Ainda, essas células se diferenciaram espontaneamente e se assemelhavam a oócitos, o que foi confirmado por morfologia e análise de expressão gênica, condizendo com estudos anteriores (PACCHIAROTTI et al., 2010).

A possibilidade de obtenção de células com potencial pluripotente em um organismo adulto contribuirá para medicina regenerativa, aumentando a possibilidade dos tratamentos autólogos. Além disso, tais células podem se tornar importante ferramentas para o estudo dos mecanismos relacionados a aquisição da pluripotência.

3. HIPÓTESES

3.1. Células tronco mesenquimais podem ser obtidas a partir do tecido ovariano de cães adultos.

3.2. As células ovarianas, quando cultivadas *in vitro,* expressam além de marcadores de células mesenquimais, marcadores de pluripotência.

3.3. As células derivadas possuem a capacidade de se diferenciar em tecido ósseo, adiposo, condrogênico e neural.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral:

Obter células tronco mesenquimais do tecido ovariano de cães adultos, utilizando o tecido adiposo da região periovariana como controle, para posterior cultivo, caracterização celular e avaliação do potencial de pluripotência.

4.2. Objetivos específicos:

4.2.1. Isolamento, estudo do crescimento in vitro de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Derivar células de cada tecido (ovariano e adiposo) para estudo comparativo de características de crescimento *in vitro* (quantidade de células no cultivo primário, curva de crescimento, tempo de duplicação da população, unidade formadora de colônias), morfologia geral.

4.2.2. Análise da expressão de marcadores de células tronco mesenquimais e dos marcadores de pluripotência das células provenientes do tecido adiposo e ovariano canino

Avaliar células de cada tecido por qRT-PCR (Oct3/4, Nanog, Sox-2, CD90, CD105, CD184, Telomerase, CD44), por imunofluorescência (CD90, CD44, CD45, CD34) e por citometria de fluxo (CD44, CD90, CD105, OCT3/4).

4.2.3. Estudo da capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Células de cada tecido foram avaliadas para sua capacidade de diferenciação (diferenciação em linhagem osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Experimento I - Isolamento, estudo do crescimento in vitro de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Obtenção de Células Mesenquimais Caninas

Foram coletados 0,3-1g de tecido adiposo da região gonadal e ovário de 4 animais, de diferentes raças, com idade de 5 meses a 9 meses. O cultivo das cMSCs foi realizado no laboratório de reprodução animal do professor Dr. Lawrence C. Smith no "Centre de Recherche de Reproduction Animale" (CRRA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Montreal.

Isolamento enzimático

Para a digestão enzimática, os tecidos foram lavados de 2 a 4 vezes em solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (HBSS- Invitrogen-14175095), transferidos para uma placa de Petri, onde fragmentou-se o tecido em cortes de aproximadamente 1mm² (figura 1). Em seguida, os tecidos foram digeridos por 3 horas a 37°C, em 2 ml solução tamponada de fosfato (DPBS-Invitrogen- 14190-144) estéril contendo 40µg/mL de colagenase tipo 1 (Invitrogen-17018-029; figura 1). Após esse período as amostras foram centrifugadas (700 G por 10 minutos; figura 1), o pellet foi ressuspendido no meio de cultivo, para que as células isoladas fossem cultivadas em garrafas de 25cm² por 3 horas, quando foi realizada a primeira troca de meio**,** a fim de selecionar as células mais aderentes ao plástico.

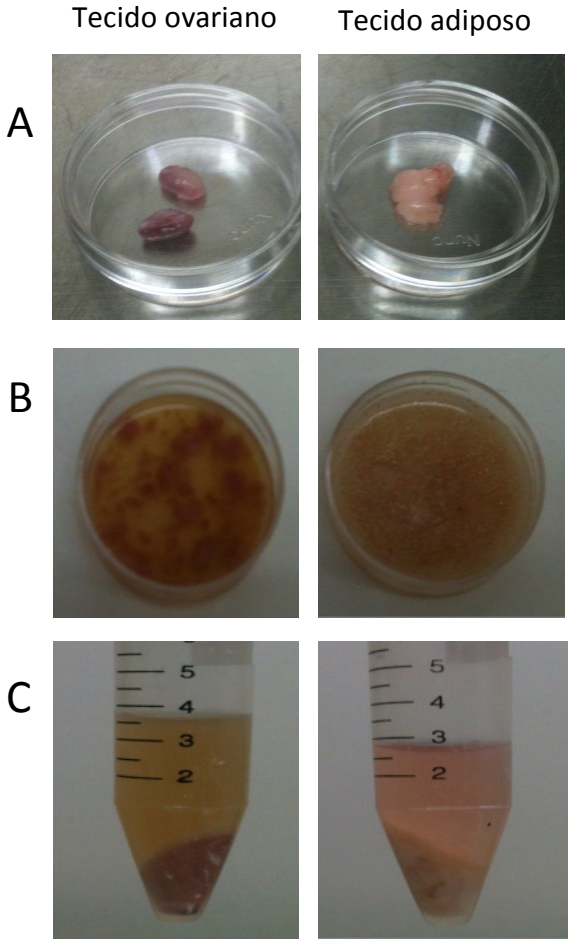


Figura 1. Etapas da derivação celular do tecido ovariano e adiposo. A: tecidos antes da digestão enzimática. B: tecidos fragmentados e incubados com colagenase a 37℃ . C: tecidos após 3 horas de digestão enzimática, seguida de centrifugação.

Cultivo primário

As células isoladas foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² (Corning®, 430639) e mantidas em incubadora a 38,5ºC com 5% de CO_2, com umidade saturada, para crescimento e expansão. Após o início do cultivo, a primeira troca de meio foi realizada com 3 horas, para remoção das células não aderidas, possibilitando a purificação do cultivo com as células mais aderentes ao plástico.

O meio de cultivo utilizado durante todo o experimento foi DMEM baixa glicose com HEPES, piruvato e glutamina (Invitrogen- 12320-032) suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen-16250-078) e solução de 100 µg/ml penicilina e estreptomicina (Invitrogen- 15140-122).

Protocolo para repique celular

Ao atingir 70% de confluência, o meio foi removido e a garrafa foi lavada uma vez com DPBS (Invitrogen- 14190-144) para posterior adição de 1,5 mL de TrypLE (Invitrogen- 12563-029), por 5 minutos (tempo suficiente para que as células se soltassem do fundo da placa) a 37°C. Após esse período, foi adicionado 1,5mL de meio de cultivo para que a suspensão celular fosse centrifugada (700 G por 5 minutos). As células foram ressuspendidas em 1 mL, e então uma alíquota (10 µL) separada para a contagem e o subcultivo realizado na densidade média 0,25 x 10^5 células/garrafa 25cm². Para contagem celular, foi utilizado o contador automático (Countess, Invitrogen- AMQAX1000). As células foram passadas até quando não foram mais capazes de entrar em confluência (70%) se re-cultivadas na densidade média 0,25 x 10^5 células/garrafa 25cm².

Avaliação da curva de crescimento celular, tempo de duplicação da população (PDT) e do número de células (CD)

Essa análise foi realizada em triplicata nas células de passagens inicial e avançada, que foram cultivadas na densidade de 1000 células por poço, em uma placa de 24 poços (Corning® - 3337). Após 48 horas, os três primeiros poços foram tripsinizados e as células foram contadas, procedimento que foi realizado também após 72, 96, 120 horas. Para a contagem das células, o meio foi retirado e 0,5 mL de tripsina foi adicionado e as células incubadas por 5 minutos a 37ºC. As suspensões celulares foram centrifugadas por 5 minutos a 700 G e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo. O número de células em cada poço foi somado e divido por três, obtendo-se uma média aritmética para cada período de tempo, de cada animal (n=4) e, os valores obtidos foram anotados e demonstrados graficamente.

Para estudo do tempo de duplicação no valor médio obtido aplicou-se as seguintes fórmulas, adaptadas de Lei et al. (2007): CD= log2(Nf) - log2(Ni) e DT:

CT/CD, onde CT é o tempo de cultivo celular, CD é o número de duplicação das células, Nf é o número final das células, Ni é o número inicial das células. Para as células derivadas do tecido adiposo (cA-MSC) foi utilizado o período de 48-96 horas e para as células derivadas do tecido ovariano (cO-MSC) foi utilizado o período de 72-120 horas, devido a inclinação da curva, sendo possível calcular o PDT no período no qual as células se encontravam em crescimento exponencial (fase log).

Análise do número de unidades formadoras de colônias

Células de passagens iniciais e tardias foram cultivadas, em triplicata, na densidade de 500 células/poço em placas de 6 poços (Corning® - 3335), para análise de formação de colônias. Após 7 dias de cultivo, o meio foi retirado, a placa foi lavada com DPBS (Invitrogen) e as células foram fixadas com metanol por 15 minutos à – 20ºC. Em seguida foi realizada a permeabilização celular com 0,1% de Triton X-100 em DPBS por 10 minutos à temperatura ambiente para que então as células fossem coradas com Giemsa (Sigma- GS500) por 15 minutos. Após esse período foi possível visualizar as células em roxo no microscópio invertido (aumento 4X) e agregados celulares com mais de 50 células foram contados para mensuração da unidade formadora de colônias. O número de colônias em cada poço foi somado e dividido por três para obtenção da média aritmética das colônias/animal.

5.2. Experimento II - Análise da expressão de marcadores de células tronco mesenquimais e dos marcadores de pluripotência das células provenientes do tecido adiposo e ovariano canino

Imunocitoquímica

A análise foi feita nas células de passagens iniciais, com intuito de verificar a presença ou ausência dos marcadores mesenquimais. As células foram cultivadas em placa de 4 poços, contendo uma lamínula e após 80% de confluência o meio de cultivo foi removido e a placa lavada com DPBS (Invitrogen- 14190-144). Em

seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 15 minutos e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em DPBS por 10 minutos. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com a solução soro de cabra 5 % em DPBS por 60 minutos em temperatura ambiente, para que então as células fossem incubadas com os anticorpos primários overnight a 4℃, os quais estão descritos no quadro 2. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com DPBS, e então incubadas por 40 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luz, com o anticorpo secundário. Em seguida, os poços foram lavados com DPBS e as células foram observadas em microscópio confocal.

Quadro 2. Descrição dos anticorpos que foram utilizados nas análises de imunofluorescência e citometria de fluxo na diluição 1:100

Anticorpo	Descrição	Número de catálogo
CD45	Marcador de células hematopoéticas	MCA2035S- AbD Serotec
CD34	Marcador de células hematopoéticas	MCA2411GA- AbD Serotec
CD90	Marcador de células mesenquimais	MCA1036G- AbD Serotec
CD44	Marcador de células mesenquimais	MCA1041- AbD Serotec
Nestin	Marcador de células neurais	MAB353- Millipore
beta-tubulin	Marcador de células neurais	MAB1637- Milipore
IgG-FITC	Anticorpo secundário	STAR80F-AbD Serotec
IgG-FITC	Anticorpo secundário	STAR120F-AbD Serotec

Citometria de fluxo

Para a análise de FACS (BD Accuri™ C6), as células de passagens iniciais foram tripsizinadas e para cada marcador de membrana celular, 300.000 células foram ressuspendidas em solução de 0,1% de Tween 20 em DPBS e centrifugadas a 700 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de solução de 5% soro de cabra em DPBS por 1 hora. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com 50 µL de anticorpo primário (1:100) por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, foram

incubadas com o anticorpo secundário (10µl) por 40 minutos, na ausência de luz. Para finalizar, as amostras foram fixadas com 200 µL paraformaldeído 4% em DPBS, e mantidas no escuro até passar no citômetro.

Para o marcador nuclear (Oct4) foi utilizado o protocolo sugerido pelo fabricante. 400.000 células foram ressuspendidas em solução de 0,1% de Tween 20 em DPBS e centrifugadas a 700 g por 5 minutos. Em seguida, foram fixadas com 200 µL paraformaldeído 4% por 10 minutos e lavadas em solução de 5% Tween 20 em DPBS. Após a centrifugação foram ressuspendidas em 0,1% de Triton X-100 em DPBS e centrifugadas novamente. As células foram ressuspendidas e incubadas com em anticorpo primário por 1 hora e em seguida, 40 minutos com o anticorpo, na ausência de luz e foram mantidas no escuro até passar no citômetro.

Expressão gênica

Foram realizadas análises de quantificação relativa de expressão gênica através de PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção Rotor gene Q (Qiagen-9001560) e tecnologia SYBR Green (Qiagen- 204072) molécula fluorescente empregada nos kits de amplificação que emite sinal de fluorescência ao intercalar com DNA dupla-fita.

Para extração de RNA foi utilizado um kit específico (RNeasy Micro kit, Qiagen- 74004), seguindo-se as especificações do fabricante. A concentração (ng/µL) do RNA obtido foi analisada por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento Nanodrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA). Foi padronizada a quantidade de 500ng/uL para obtenção de cDNA de cada amostra de RNA.

Posteriormente, para obtenção de cDNA, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT), utilizando-se um kit específico (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen- 205311). As amostras de cDNA armazenadas a -20ºC até a realização da PCR em tempo real.

Os primers utilizados foram desenhados utilizando o programa Oligo 6 e, as sequências estão descritas no quadro 3. As reações foram conduzidas nas células

de passagens iniciais e passagens tardias, em duplicatas para controle da reprodutibilidade dos resultados. O produto de cada reação foi enviado para sequenciamento para confirmação da amplificação do gene desejado.

Para a reação de PCR foi utilizado o método de curva padrão, obtendo-se assim o valor numérico de cada amplificação, em relação a um calibrador. Primeiramente, calculou-se a média aritmética da amplificação dos três genes endógenos (HPRT, RPL13, GAPDH). Para expressão relativa dos genes estudados foi utilizado o resultado da divisão entre o valor amplificado pela média geométrica de três genes endógenos. A estabilidade da expressão dos genes endógenos em cada uma das amostras foi determinada pelo programa estatístico *BestKeeper*.

Quadro 3. Sequência de primers utilizados para análise de PCR

Marcador	Sequência do primer
GAPDH	Forward CCATCTTCCAGGAGCGAGAT Reverse TTCTCCATGGTGGTGAAGAC
RPL13	Forward GGAGAAGGCCAGAGTCATCACA Reverse TTTGCCCTGATGCCAAAAAG
HPRT	Forward CACTGGGAAAACAATGCAGA Reverse ACAAAGTCAGGTTTATAGCCAACA
CD44	Forward GCCCTGAGCGTGGGCTTTGA Reverse TCTGGCTGTAGCGGGTGCCA
`CD90	Forward CAGAACACCTCATGGCTGCTGT Reverse GGAGAAACCAGACAGAAGCGA
CD105	Forward GGTTCACTGCATCAACATGG Reverse AAGCTGAAGCGCACATCACC
CD184	Forward GCGGGCGAGCGGTTACCAT Reverse CCTCCCGGAAGCAGGGTTCCTT
NANOG	Forward GAATAACCCGAATTGGAGCAG Reverse AGCGATTCCTCTTCACAGTTG
TELOMERASE	Forward GCCGTGGTGATCGAGCAGA Reverse GAAACAACCTGCGCTCCATGT
OCT4	Forward GAGTGAGAGGCAACCTGGAG Reverse GTGAAGTGAGGGCTCCCATA
SOX2	Forward CCCACCTACAGCATGTCCTA Reverse GGAGTGGGAGGAGGTAA
BDNF	Forward GCTGGCGGTTCATAAGGATA Reverse GTTTCCCTTCTGGTCATGGA
GDNF	Forward CGCTGACCAGTGACTCCAATATGC Reverse GTTAGCCTTCTACTCCGAGACAGG

5.3. Experimento III: Estudo da capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Diferenciação em linhagens mesenquimais

Uma etapa imprescindível para caracterização das MSCs é verificar a capacidade de se diferenciar em tecido adipogênico, osteogênico e condrogênico. Para esse ensaio, as células de passagens iniciais foram cultivadas na densidade de 10.000 células/poço durante 30 dias em placas de 24 poços, em triplicata, em meios comerciais indutores StemPro (Invitrogen) específicos para cada tecido (adipogênese- A10070-01, condrogênese-A10071-01, osteogênese-A10072-01), de acordo com as instruções do fabricante.

Diferenciação em linhagem neuronal

Para o ensaio de diferenciação em linhagem neuronal, as células foram derivadas na densidade de 1.0 x 10^4 por poço, em triplicata, em placas de 24 poços e incubadas por 10 dias, com troca de meio a cada 4 dias. O meio utilizado foi o DMEM baixa glicose com HEPES, piruvato e glutamina (Invitrogen- 12320-032) , ácido valproico (2mM), hidrocortisona (1uM), forskolina (10um), potássio clorídrico (5mM), insulina (5ug/mL) e butilato hidroxianisol (200uM), todos os reagentes foram obtidos na Sigma. Para avaliação da diferenciação, uma alíquota de células foi utilizadas para realização de PCR semi quantitativo e outra para imunoflourescência.

5.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o test t com correção Welch pelo Graphpad Prim 5 com nível de significância $p \leq 0,05$. Esse teste foi utilizado para avaliar o resultado das análises de rendimento celular, curva de crescimento, tempo de duplicação da população, unidade formadora de colônias, citometria de fluxo, expressão gênica relativa, sendo que foram estudados dois tipos de células (cO-MSC vs cA-MSC), os quais foram comparados através da média de quatro animais (n=4). Os dados são apresentados pela média ± erro padrão da média.

5.6. Delineamento Experimental

5.6.1. Experimento I – Isolamento, estudo do crescimento in vitro de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

O primeiro experimento possuía o objetivo de estudar as características de crescimento das células derivadas, para isso foram avaliados o número de células por grama de tecido (cultivo primário), curva celular e tempo de duplicação da população (passagens iniciais e avançadas), avaliação da formação de colônias (passagens iniciais e avançadas).

5.6.2. Experimento II - Análise da expressão de marcadores de células tronco mesenquimais e dos marcadores de pluripotência das células provenientes do tecido adiposo e ovariano canino

No segundo experimento foi realizada a caracterização molecular das células derivadas no experimento I. Em células de passagens iniciais foram realizadas as análises de imunocitoquímica (CD45, CD34, CD44, CD90) e citometria de fluxo (CD90, CD44, CD45,CD34,Oct4). A análise qRT-PCR foi realizada em células de passagens iniciais e tardias para avaliação da expressão gênica de CD184,CD105, CD90,CD44, Oct4, Sox2, Nanog, TERT.

5.6.3. Experimento III – Estudo da capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

No terceiro experimento foi realizada a indução da diferenciação das células derivadas no experimento I em linhagens adipogênica, condrogênica, osteogênica e neurogênica, em células de passagens iniciais.

6. RESULTADOS

6.1. Experimento I - Isolamento, estudo do crescimento *in vitro* de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Os dois ovários de quatro animais foram dissecados, pesando em média de 0,41 ± 0,11 gramas com a variação de 0,85 a 0,3 (quadro 4). O tecido adiposo da região gonadal também foi dissecado e pesou em media 0,45 ± 0,14, variando de 0,70 a 0,21 gramas (quadro 4).

As células foram isoladas com sucesso, após 3 horas de incubação com colagenase. O número total de células isoladas a partir de cada tecido de cada animal variou em decorrência do tamanho da amostra obtida. Após 72 horas do inicio do cultivo primário, o número médio de células obtidas em 4 amostras do tecido adiposo foi 1937 ± 592.6 e do tecido ovariano foi 1771 ± 262.1 (figura 2).

Quadro 4. Idade dos animais utilizados no experimento, peso em gramas do tecidos utilizados para derivação celular.

Animal	Idade (meses)	Tecido Ovariano (g)	Tecido Adiposo(g)
Cadela 1	5	0,71	0,85
Cadela 2	5	0,22	0,29
Cadela 3	6	0,43	0,41
Cadela 4	9	0,30	0,25

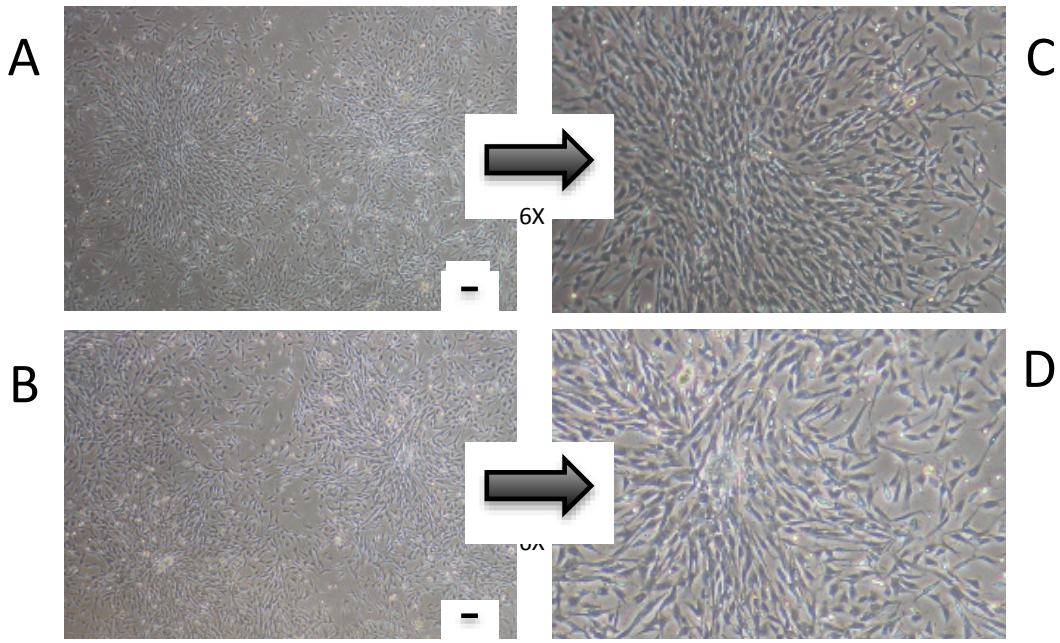


Figura 2. Morfologia fibroblástica das células de origem ovariana (A) e (C) e adiposa (B) e (D), após 72 horas do cultivo primário, observadas em microscópio invertido, em contraste de fase.

Avaliação da curva de crescimento celular

Os resultados da contagem diária das células permitem a análise da cinética do crescimento celular pela observação de sua curva descrita no gráfico (figura 3), o que foi realizado com células dos 4 animais e dos dois tecidos, em triplicata. A primeira tentativa da mensuração da curva de crescimento não foi realizada com sucesso, pois as células atingiram a confluência rapidamente. A segunda tentativa foi obtida com êxito, pois as células foram cultivas em baixa densidade (1000 células/poço).

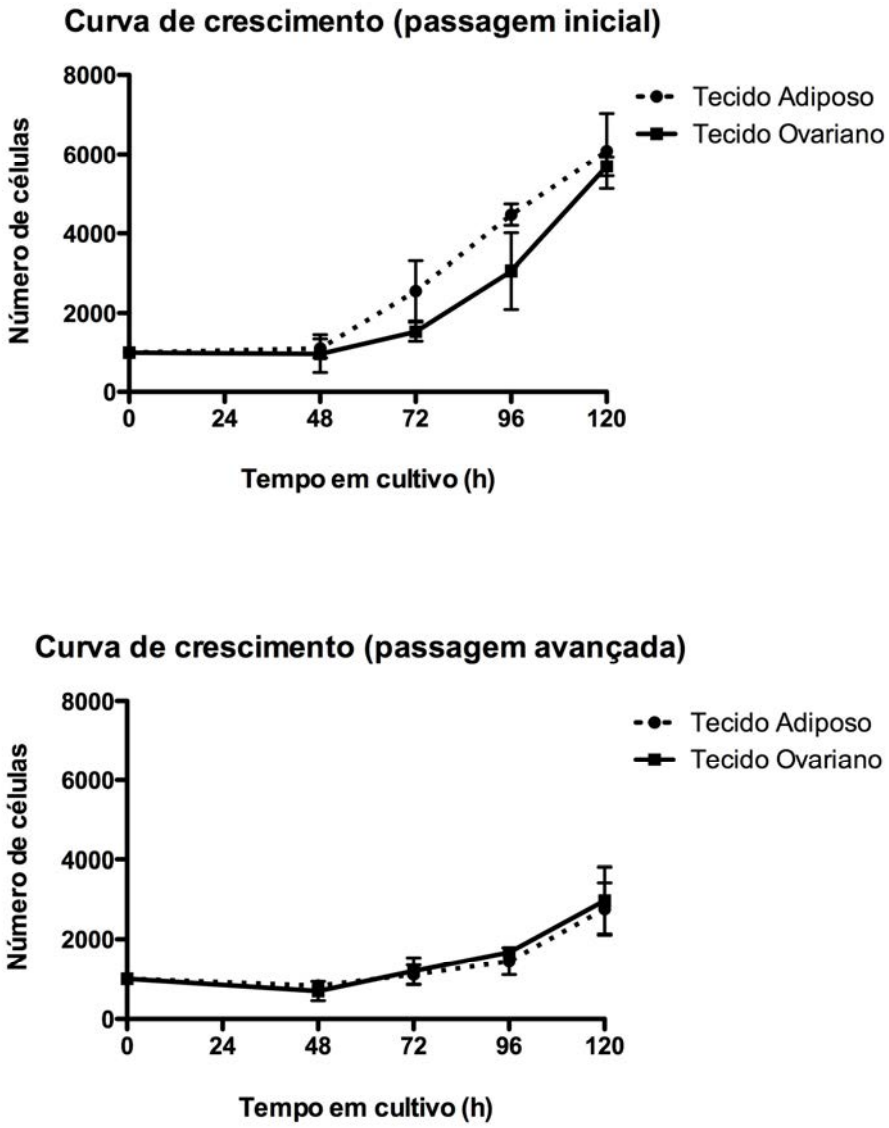


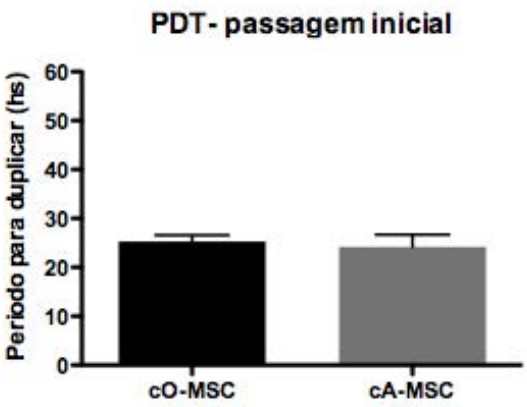
Figura 3. Curva de crescimento celular utilizando-se a média de quatro animais para cada tecido. Não houve diferença estatística, no entanto é possível perceber que as cO-MSCs iniciam o crescimento exponencial mais tarde quando comparadas com as cA-MSCs, na passagem inicial.

Avaliação do tempo de duplicação da população (PDT)

Pela curva de crescimento foi possível observar que as cA-MSCs começaram a se dividir exponencialmente após 48 horas do inicio do cultivo,

enquanto as cO-MSCs demoraram 72 horas. No entanto, quando as cO-MSCs começaram a se multiplicar possuíam um tempo de duplicação similar as cA-MSCs (± 24 h, figura 4).

A



B

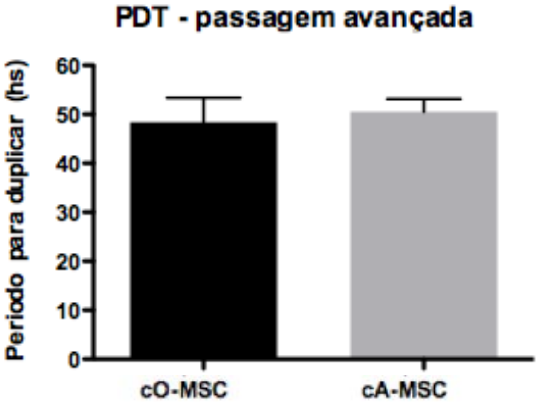


Figura 4. Tempo de duplicação da população nas cO-MSCs e cA-MSCs em passagens inicial e avançada, mostrando (A e B) que não houve diferença estatística entre a média dos quatro animais dos dois tecidos em ambas as passagens. Sendo que o tempo para duplicar praticamente dobrou (B) na passagem avançada em relação à inicial (A).

Avaliação do número de unidades formadoras de colônias (CFU)

Os valores médios de CFU formadas por placa estão apresentados na figura 5. O número médio de CFU após 7 dias de cultivo foi superior nas cA-MSCs em comparação as cO-MSCs, sendo respectivamente 37,08 ± 2,1 vs. 27,08 ± 1,4 ($p \leq 0,05$). No entanto, após 9 passagens, quando cultivadas na densidade de 500 células por poço, não foram capazes de formar agregados celulares com mais de 50 células, mantendo-se dispersas pelo poço, ou em agregados com aproximadamente 20 células.

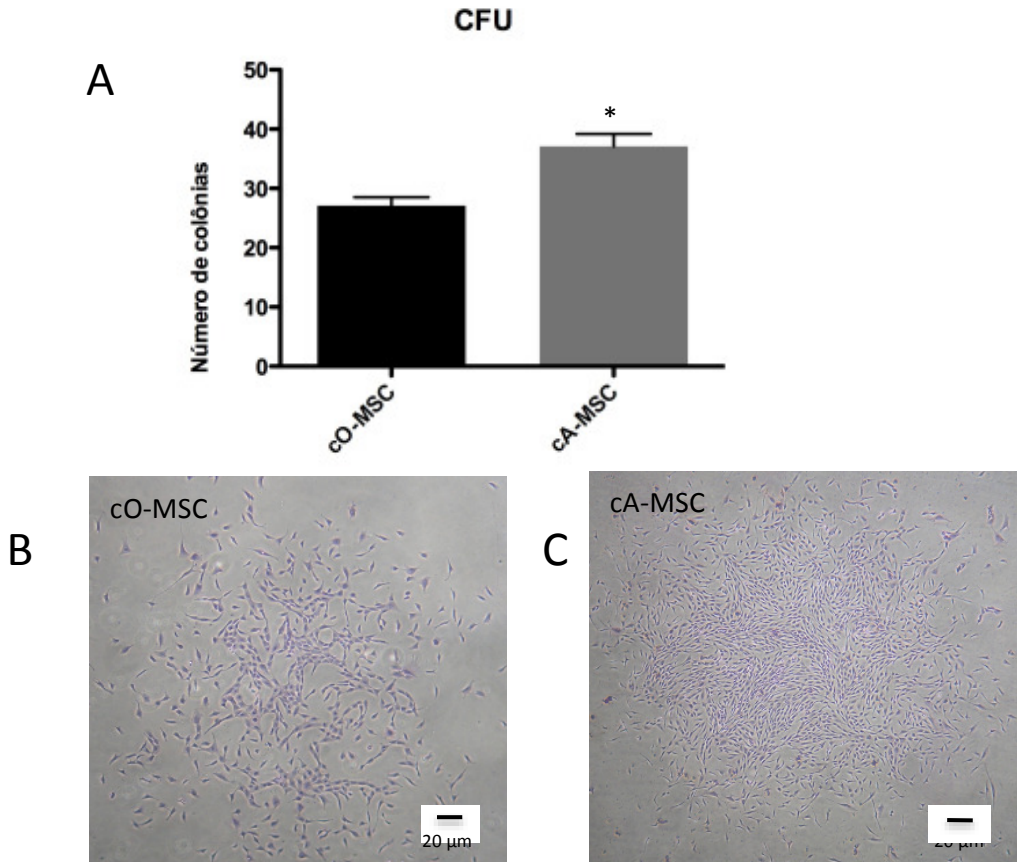


Figura 5. Avaliação do número de colônias formadas. A: as cA-MSCc mostraram maior capacidade de formar colônia em passagem inicial ($p<0,05$).B: as cO-MSCs formaram colônias menores do que as cA-MSC (C).

6.2 Experimento II - Análise da expressão de marcadores de células tronco mesenquimais e dos marcadores de pluripotência das células provenientes do tecido adiposo e ovariano canino

Imunocitoquímica

As análises dos resultados imunocitoquímicos foram realizadas por meio de microscópio confocal (FV-1000, Olympus). As células foram analisadas em triplicata, em passagens iniciais. Foi possível verificar que as cA-MSCs apresentam fluorescência para os marcadores CD44 e CD90. No entanto, as cO-MSCs foram flourescentes para CD44. Ambos os tipos celulares apresentaram ausência de fluorescência para os marcadores hematopoéticos CD45 e CD34 (Figura 6).

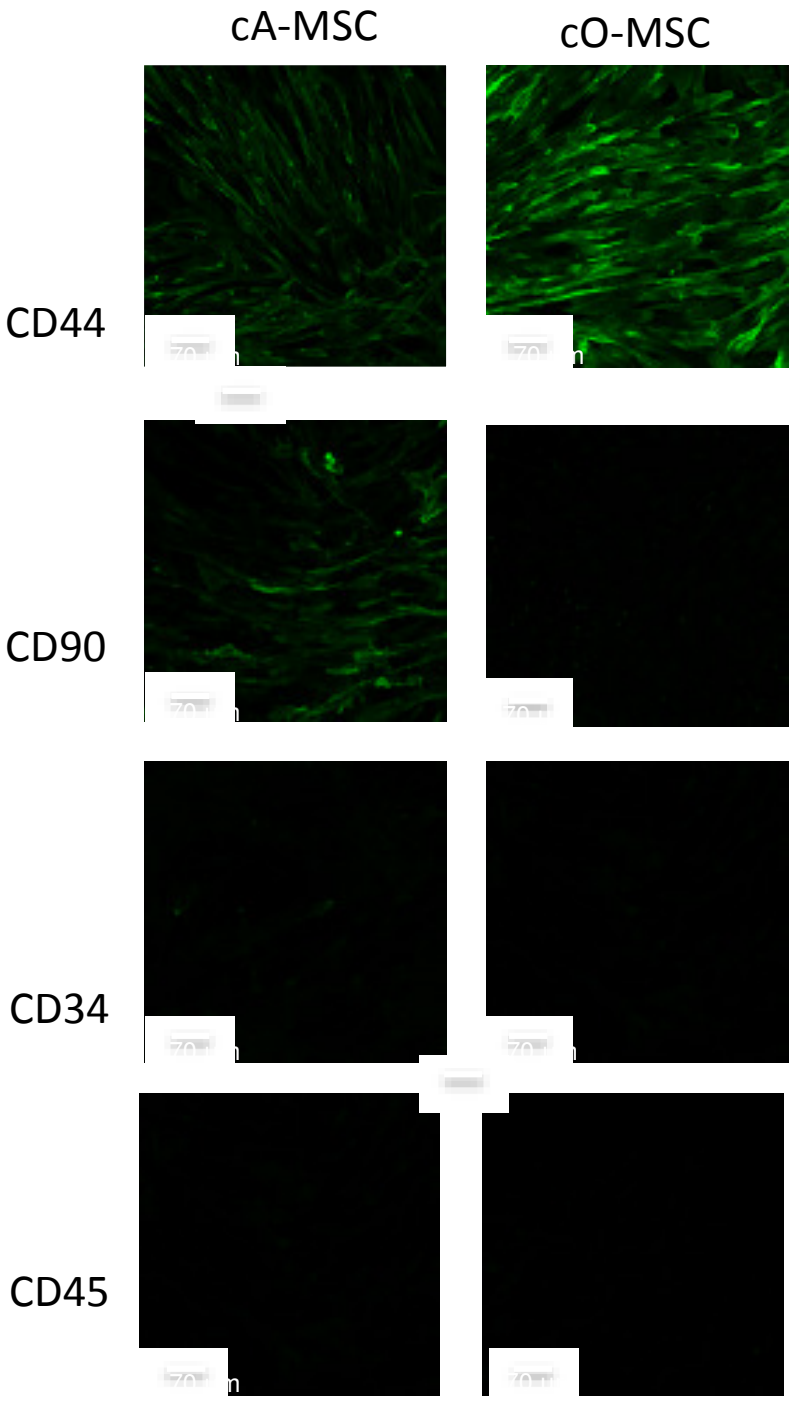
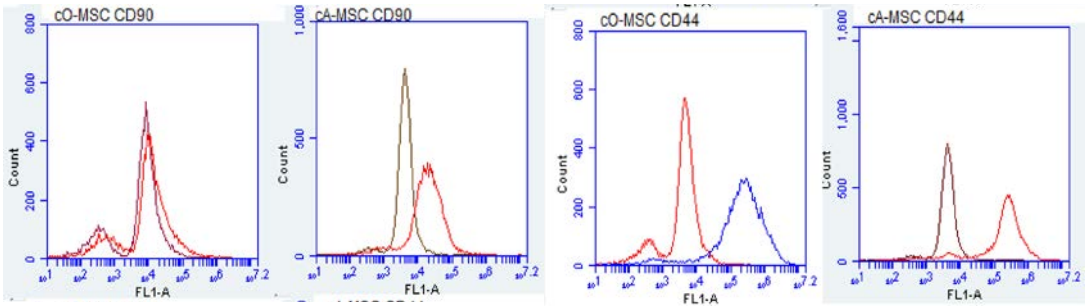


Figura 6. Fotomicrografia do resultado da análise de imunocitoquímica. As cO-MSC mostraram ser positivas para CD44 e negativas para CD90, ao passo que as cA-MSC foram positivas para CD90 e CD44. Ambas foram negativas para marcadores hematopoéticos (CD34 e CD45), utilizando-se anticorpos específicos para cão, descritos no quadro 2.

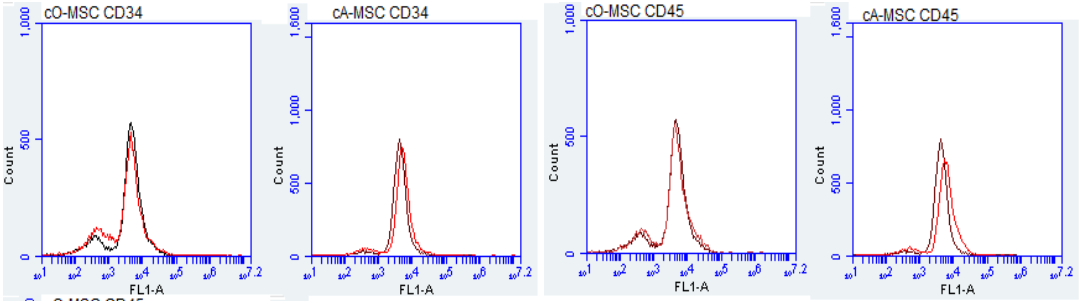
Citometria de fluxo

A análise da citometria de fluxo foi realizada nos quatro animais em células de passagem inicial, sendo efetuada a média aritmética de cada marcador para cada tecido. Não houve diferença significativa entre nenhum dos marcadores estudados (figura 7) entre as células derivadas do tecido adiposo e tecido ovariano, de maneira que os dois expressaram CD44 (cO-MSCs, 57,17 ± 11,01%; cA-MSCs, 77,67 ± 3,56%), CD90 (cO-MSCs, 37,87± 10,14%; cA-MSCs, 62,05 ± 8,40%). Em relação ao marcador de pluripotência Oct 4, 49,47± 15,17% da população das células derivadas do tecido ovariano expressaram um nível relativamente alto, enquanto que para as cA-MSCs somente 9,70 ± 2,64% da população foi positiva para esse marcador.

A"



B"



C

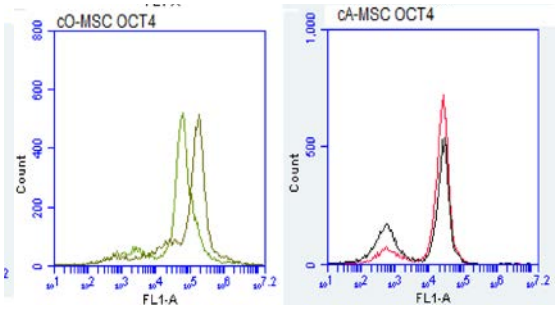


Figura 7. Resultados gráficos da análise de citometria de fluxo, de um animal, para (A) MSC, (B) de células hematopoéticas e (C) de pluripotência.

Expressão gênica

Os genes possuíram uma expressão relativa similar entre os dois tipos celulares estudados (figura 8). Apesar de notável diferença numérica para alguns genes, o que deve ser reflexo da grande variação individual. Somente o Oct4 (figura 9) foi mais expresso nas cO-MSCs que nas cA-MSCs em passagem inicial ($p<0,05$).

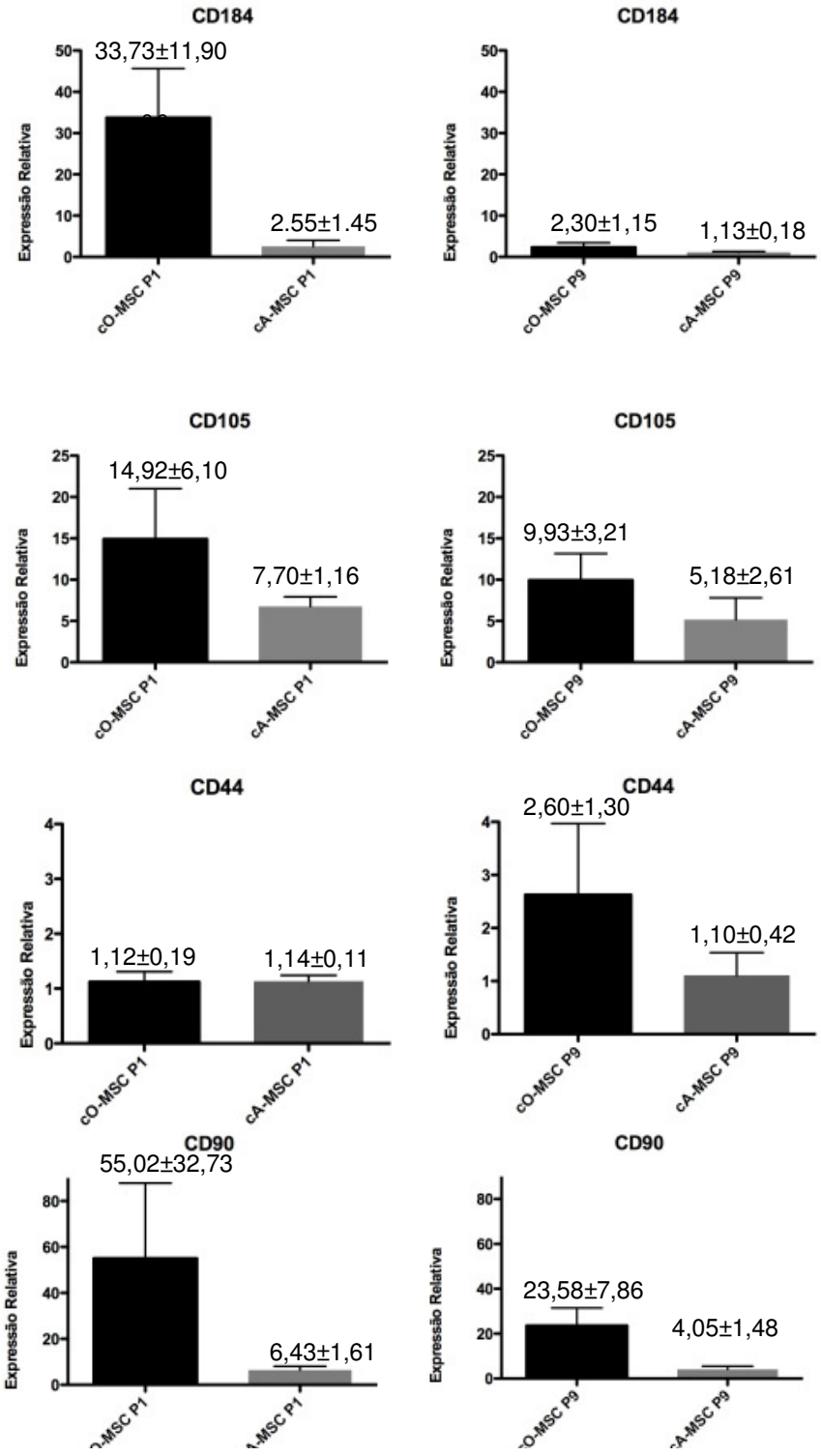


Figura 8. Média da expressão relativa de marcadores de células mesenquimais para as cO-MSCs e cA-MSCs (n=4), em passagens iniciais e avançadas. Não houve diferença estatística (test t com correção de Welch)entre os tecidos para cada marcador (p>0,05).

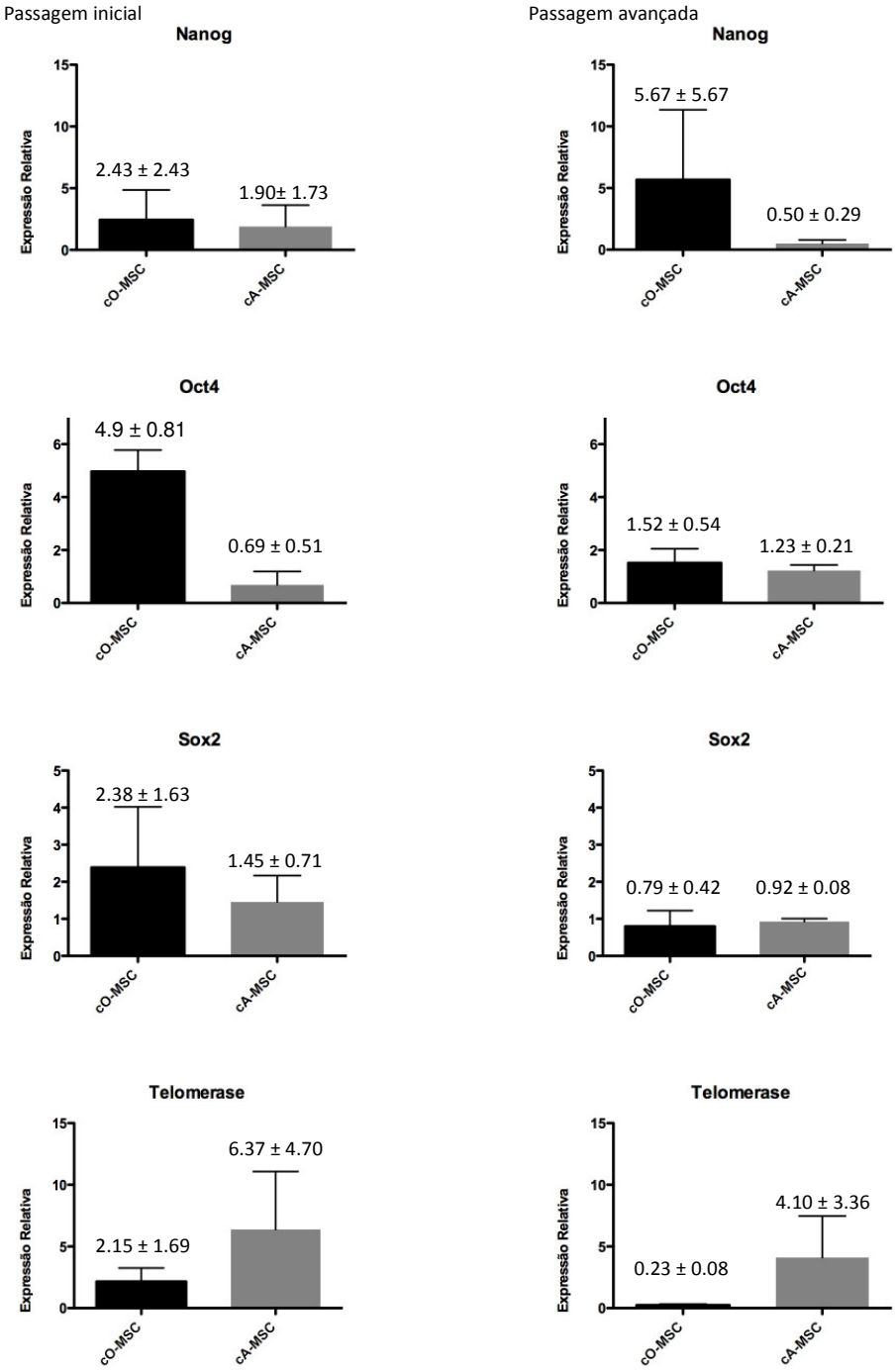


Figura 9. Média da expressão relativa de marcadores de células pluripotentes para as cO-MSCs e cA-MSCs (n=4), em passagens inicial e avançada. Não houve diferença estatística (test t com correção de Welch) entre os tecidos para cada marcador (p>0,05).

6.3. Experimento III – Estudo da capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Diferenciação adipogênica

O corante “Oil Red O” foi utilizado para avaliação da formação de vacúolos lipídicos, o que foi observado em todas as amostras dos dois tecidos de derivação (Figura 10), não havendo diferenciação das amostras controle.

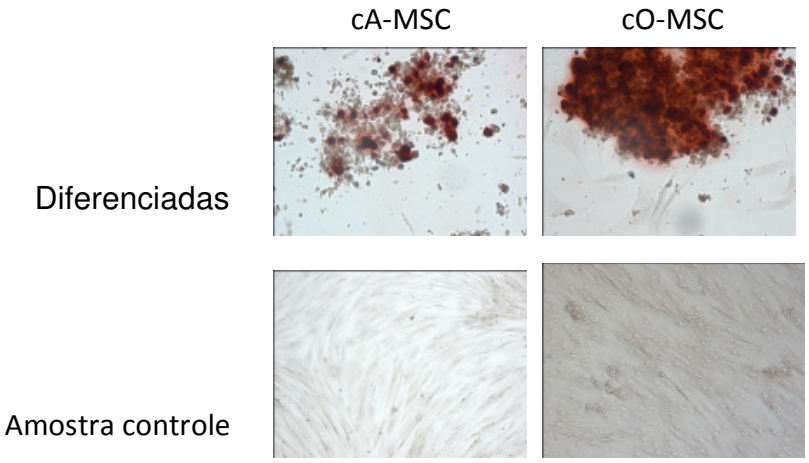


Figura 10. Fotomicrografia da diferenciação adipogênica, após coloração com Oil Red O, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X.

Diferenciação osteogênica

Após o período de indução de 30 dias, as células cultivadas em meio de indução específico para linhagem osteoblástica apresentaram depósitos de matriz extracelular com a técnica de coloração Von Kossa (figura 11), em todas as amostras, exceto nas controle.

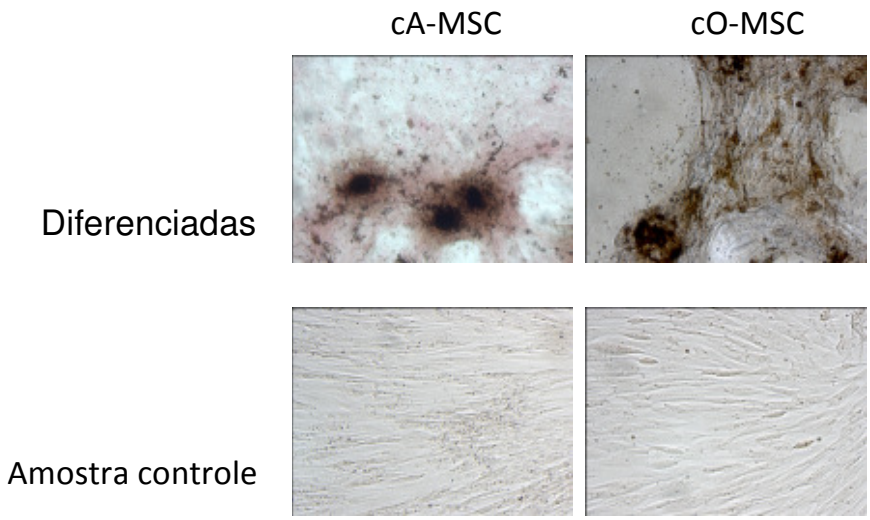


Figura 11. Fotomicrografia da diferenciação osteogênica, após coloração com Von Kossa, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X.

Diferenciação condrogênica

Os condrócitos foram corados com solução de Safroinina O (figura 12), sendo possível observar mucopolissacarídeos da matriz intracelular. Todas as amostras se diferenciaram após 30 dias no meio indutor e nenhuma diferenciação foi observada nas amostra controle. Da mesma maneira que para a linhagem adipogênica, foi possível observar mais células diferenciadas para a linhagem condrogênica nas cO-MSCs que nas cA-MSCs.

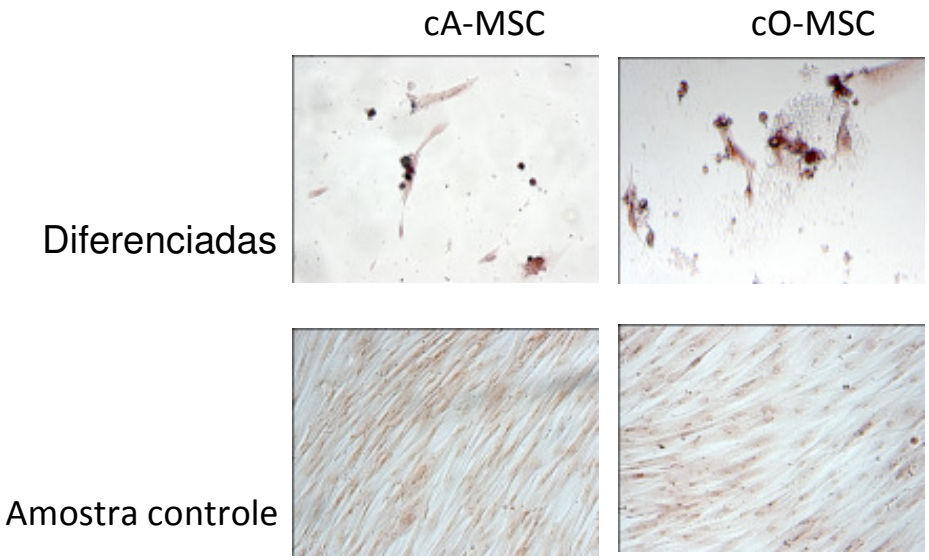


Figura 12. Fotomicrografia da diferenciação condrogênica, após coloração com Safroinina O, observada em microscópio invertido na objetiva de 20X.

Diferenciacão neurogênica

A diferenciação neurogênica foi observada a partir de 4-5 dias de cultivo no meio de indução. Com 10 dias as células foram coletadas para análise de PCR semi-quantitativo, mostrando que as cO-MSCs apresentaram uma forte expressão para os genes BDNF e GDNF (figura 12 C), ao passo que as cA-MSCs não apresentaram amplificação de tais genes. No microscópio confocal foi possível observar a diferença morfológica das células, que antes da indução eram fibroblásticas e após, apresentavam morfologia estrelada e com prolongamento semelhante à axônio. Com essa análise foi possível verificar que ambas as células foram positivas para a proteína nestina (figura 13 A) e tubulina (figura 13 B).

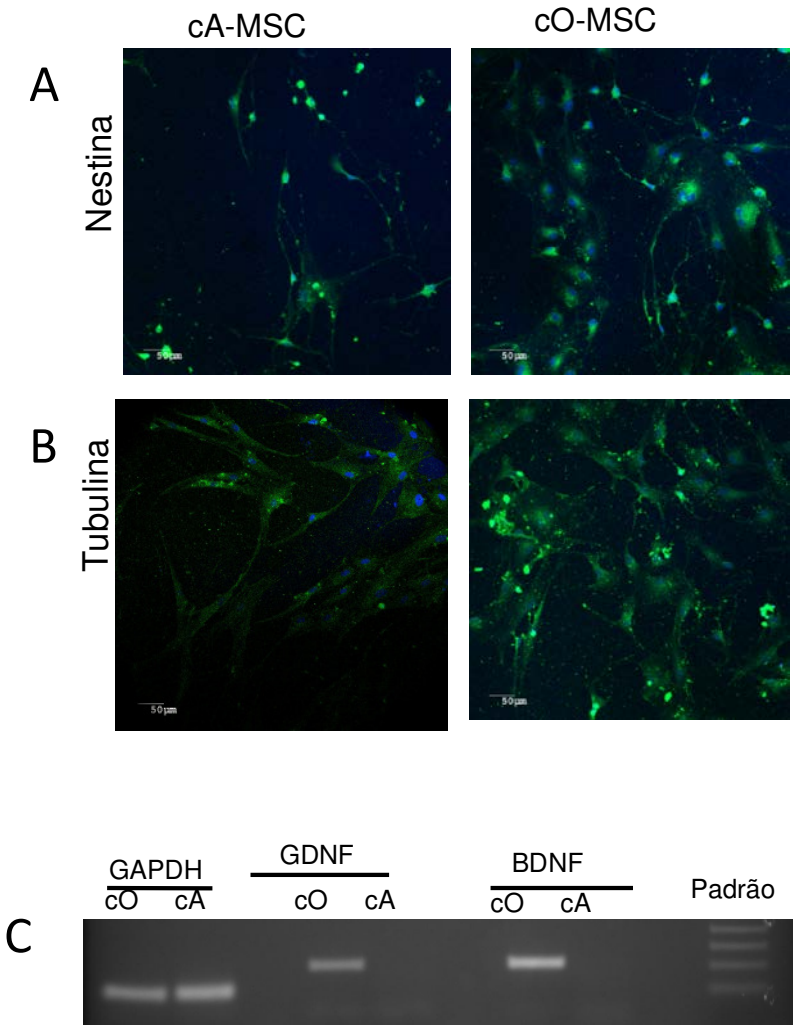


Figura 13. Diferenciação neurogênica. Fotomicrografia do resultado da análise de imunocitoquímica das cA-MSCs e cO-MSCs após 10 dias de indução neural para a proteína nestina (A) e tubulina (B). C: PCR semi-quantitativo mostrando a amplificação de GAPDH por ambos os tipos de células derivadas, GDNF e BDNF somente pelas cO-MSCs.

7. DISCUSSÃO

7.1. Experimento I: Isolamento, estudo do crescimento *in vitro* de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

No presente experimento, células foram isoladas com sucesso, tanto do tecido ovariano como adiposo de todos os animais, baseando-se a sua capacidade de adesividade ao plástico nas três primeiras horas de cultivo, com objetivo de purificar o cultivo e obter uma população mais homogênea com característica de adesão rápida. Foi descrito pela primeira vez o isolamento de células tronco mesenquimais a partir da medula óssea, baseando-se na habilidade das células em se aderirem ao plástico de cultivo, removendo as não aderentes após 24-48 horas de cultivo (FRIEDENSTEIN et al., 1966). No entanto, esse método pode isolar uma população heterogênea, tanto fenotipicamente e funcionalmente (KUZNETSOV et al., 1997; PHINNEY et al., 1999; TREMAIN et al., 2001).

As células derivadas de ambos os tecidos formaram uma monocamada homogênea, com morfologia fibroblastóide, característica típica de MSC (Figura 2). As MSCs caninas foram descritas como fibroblásticas, com formato fusiforme, podendo ser facilmente identificadas na histologia pelo tamanho (10-20 µm), citoplasma basofílico, núcleo hipercromático (JUN, *et al.,* 2012) esféricos, acompanhando o formato das células (PATRICIO, 2010). Sabe-se que as MSCs possuem a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura (BYDLOWSKI, *et al.,*2009). Neste estudo, as células mantiveram uma proliferação estável por cerca de 14 passagens.

Após 72 horas em cultivo, as células de P1 foram contadas para determinar a produção de células em relação à quantidade inicial de tecido digerido. O tecido adiposo produziu mais células por grama de tecido, em comparação com o tecido do ovário (1937 ± 592,6 vs 1771 ± 262,1, $P \leq 0,05$). Após o cultivo primário todas as passagens foram realizadas com uma quantidade padronizada de células, proporcionando as mesmas condições para ambos os tipos celulares, pois foi

relatado que o tempo de duplicação depende do tecido de derivação e da densidade de plaqueamento inicial (BYDLOWSKI, *et al.,*2009).

Quando introduzidas pela primeira vez em uma cultura, as células não começam sua divisão imediatamente, que caracteriza a primeira fase de divisão celular, fase lag. No presente estudo, a curva de crescimento (Figura 3) mostrou que as cA-MSCs iniciaram o crescimento exponencial após 48 horas de cultivo inicial, enquanto as cO-MSCs demoraram 72 horas para iniciar a duplicação, sugestionando que as cO-MSCs podem ser mais afetadas pelo processo de tripsinização e passagem. Após essa fase, a maioria da população se divide de maneira contínua e logarítmica, durante um período limitado, denominado de fase log. Com base na informação que as cO-MSCs possuem um atraso para iniciar a divisão exponencial, o PDT foi calculado em dias diferentes (48-96h para o cA-MSC e 72-120 para cO-MSC), período em que as células possuíam as mesmas condições de crescimento. Essa análise além de dar uma estimativa do tempo em que as células se tornarão confluentes, o que auxiliou no desenvolvimento do experimento, irá caracterizar as células isoladas do tecido adiposo e ovário de cão, auxiliando em estudos futuros. Sabe-se que aumento no tempo de duplicação pode ser indicativo de citotoxicidade (MARTIN, 1994b), o que pode ser útil em testes farmacêuticos e toxicológicos, por exemplo.

Atualmente, a medula óssea e o tecido adiposo são as principais fontes de MSCs na medicina veterinária (CHUNG et al., 2012). No entanto, foram relatadas algumas vantagens do isolamento do tecido adiposo em relação às células mesenquimais provenientes da medula óssea, incluindo desenvolvimento mais rápido *in vitro* (CHUNG *et al*., 2012), maior densidade de células do estroma, isolamento mais fácil (NEUPANE *et al*., 2008). Os dados do presente estudo não mostraram qualquer diferença entre o tempo de duplicação das duas células derivadas, indicando que as cO-MSCs possuem potencial proliferativo similar às cA-MSCs, apesar de que o tecido adiposo derivou mais células que o tecido ovariano.

Um aspecto que foi observado na primeira população de MSC isolada foi a sua capacidade de formar colônia. Após um lag inicial, as células se dividem

rapidamente e durante o crescimento inicial *in vitro*, formam colônias que podem ser denominadas: unidades formadoras de colônia (CFU) de fibroblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1966). No presente estudo, a capacidade de formação de colônia foi observada em ambas as células derivadas, no entanto as cA-MSCs tiveram um CFU superior comparado as cO-MSCs (37,08 ± 2,10 vs 27,08 ± 1,45, $p \leq 0,05$). Ambas diminuíram o número e o tamanho das colônias com o aumento das passagens, não sendo capazes de formar aglomerados com mais de 50 células. Após aproximadamente 14 passagens tanto as cO-MSCs como as cA-MSCs não foram capazes de entrar em confluência. Assim, ambos os tipos celulares derivados neste estudo demonstraram clássicos sinais de senescência (SETHE; SCUTT; STOLZING, 2006) em um período similar, indicando longevidade proliferativa *in vitro* similar.

7.2. Experimento II: Análise da expressão de marcadores de células tronco mesenquimais e dos marcadores de pluripotência das células provenientes do tecido adiposo e ovariano canino

Em 2006, foram propostos alguns critérios para caracterização das MSCs: aderência à superfícies plásticas, capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e, expressão de marcadores de superfície específicos (DOMINICI et al., 2006). No entanto, sabe-se que a expressão de tais marcadores é bastante variável de acordo com a espécie, tecido e método de isolamento celular, meio de cultivo, densidade do cultivo e idade do animal (Bydlowski, 2009). Os marcadores que representam a caraterística mesenquimal propostos por Dominici et al. (2006) são: CD105, CD73 e CD90 e as células não devem expressar CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79α e CD19. A caracterização de tais marcadores de superfícies têm sido desafiadora, principalmente pela falta de disponibilidade de marcadores comerciais para as diferentes espécies animais, pela diferença da expressão de marcadores de acordo com o tecido e método de isolamento. Com o intuito de evitar resultados incorretos causados por reação cruzada de anticorpos, neste trabalho foi estudado o fenótipo das células por três métodos diferentes, PCR, FACS e imunocitoquímica.

Por qRT-PCR tanto as cA-MSCs como cO-MSCs expressaram marcadores típicos de MSC, como CD44, CD90, CD105 e CD184, a expressão relativa em relação a média geométrica de três genes endógenos não se diferenciou entre os dois tecidos de derivação (figura 8). As cMSCs derivadas de diversos tecidos de cães foram positivas para os marcadores: STRO-1, CD45, CD146, CD90, CD44, CD140A, CD117, CD29, CD105, CD184 (MARTINELLO et al., 2011; JUN et al., 2012; CHUNG et al., 2012; SPENCER et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; LEE et al., 2013). Pela citometria, a maioria da população de cO-MSC foi positiva para CD44 e negativa para CD90, ao passo que para as cA-MSCs o CD90 foi mais positivo que o CD44.

A análise de imunocitoquímica foi importante para verificar se houve contaminação por linhagem hematopoética, o que não ocorreu neste experimento, uma vez que não foi detectado fluorescência nas células incubadas com anticorpos primários caninos contra CD34 e CD45.

Após verificar a presença de marcadores mesenquimais, o próximo passo foi verificar a presença de marcadores de pluripotência. Em cães, as cMSCs derivadas de diversos tecidos foram positivas para os fatores de transcrição relacionados a pluripotência: OCT3/4, NANOG, SOX-2 e SSEA-4 (JUN et al. 2012; MARTINELLO et al., 2011, CHUNG et al. 2012; SPENCER et al. 2012, LEE et al. 2013; FERNANDES et al., 2012). Em relação às células ovarianas já foi relatado, a expressão de OCT4, OCT4A, OCT4B, SOX-2, NANOG (VIRANT-KLUN *et al.*, 2008). Estes fatores de transcrição fazem parte dos mecanismos moleculares que regulam o potencial de multipotencialidade, proliferativo e de autorrenovação e proliferação das A-MSCs (TAKEMITSU et al., 2012). O Oct4 é expresso no inicio do desenvolvimento embrionário, desempenhando um papel essencial na formação da massa celular interna do embrião e manutenção das células tronco embrionárias (NICHOLS et al., 1998). O Sox2 é responsável por regular a expressão do Oct4 e manter a pluripotência das células tronco embrionárias (NICHOLS et al., 1998). Ao passo que o Nanog é necessário para autorrenovação das células tronco e manutenção do seu estado indiferenciado (TAKEMITSU et al., 2012). A análise qRT-PCR deste experimento, revelou a expressão de genes relacionados à pluripotência, Oct4, Sox 2, Nanog, e Tert, tanto nas células derivadas do tecido

adiposo como ovariano, que mantiveram a expressão por pelo menos 9 passagens. O Oct4 foi mais expresso pelas cO-MSCs, indicando um possível potencial pluripotente. Esses resultados refletem fenótipo indiferenciado das células e em um possível potencial pluripotente para diferenciação celular. Recentemente foi relatado a presença de células-tronco pluripotentes na medula óssea (KURODA et al., 2010) e no tecido adiposo (SIMERMAN et al., 2014), sendo denominadas células “multilineage differentiating stress-enduring (*Muse*)". Estas células são células mesenquimais, que possuem morfologia idêntica à das células mesenquimais normais, expressam marcadores mesenquimais comuns como CD105, CD90, e CD29, no entanto, elas também têm demostrado propriedades de células tronco pluripotentes, incluindo a autorrenovação, a diferenciação triploblástica e a expressão marcadores clássicos de pluripotência, como SSEA3, Sox2, Oct3/4, Nanog e TRA1-81 (KURODA; DEZAWA, 2014). Uma característica relevante clinicamente é que essas células não formam tumores quando transplantadas, basicamente devido ao fato de apresentarem baixa atividade da telomerase e intermediária expressão de genes relacionados a pluripotência e teratogênese (SIMERMAN et al., 2014). Estas células foram encontradas pela sua resistência a estresse (KURODA et al., 2010), quando as MSCs são cultivadas durante um período longo sob condições indutoras de estresse, por exemplo, incubação com tripsina, baixa nutrição, a grande maioria das MSCs morrem e somente um pequeno número de células sobrevive. Um marcador específico para células *Muse* (SSEA-3) foi investigado comparando o padrão de expressão de células antes e após estresse a longo prazo e foi encontrado que a porção de MSC inicialmente positiva para SSEA-3, um marcador conhecido para células embrionárias humanas indiferenciadas, aumenta drasticamente depois da tensão de incubação (WAKAO et al., 2012). De fato, no presente experimento observou-se aumento da expressão gênica de acordo com o aumento das passagens em cO-MSCs para CD44 e NANOG. Enquanto que para as cA-MSC houve aumento do TERT, sugerindo que essas células possam ser mais susceptíveis a formação de tumor, uma vez que alta atividade da telomerase está relacionada com o desenvolvimento de células neoplásicas (PERINI et al., 2008).

7.3. Experimento III: Estudo da capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido adiposo e ovariano canino

Para continuar a caracterização das células isoladas, o próximo passo foi testar a capacidade de diferenciação das mesmas, para isso foi realizado um ensaio de diferenciação, uma etapa que além de imprescindível para denominação das células em MSCs, de acordo com padrões pré estabelecidos (DOMINICI et al., 2006; PITTENGER et al.,1999), o que contribui para estratégias em terapia celular e engenharia tecidual. Outros trabalhos demonstraram a diferenciação de cMSCs nas mesmas linhagens mesenquimatosas que o presente estudo: adipogênica (ZUCCONI et al., 2009; MARTINELLO et al., 2011; DISSANAYAKA et al., 2011; SPENCER et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; SCHWARZ et al., 2012; LEE et al., 2013; WANG et al., 2013), condrogênica (ZUCCONI et al., 2009; CHUNG et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; HODGKISS-GEERE et al., 2012; SPENCER et al.¸ 2012 LEE et al., 2013), osteogênica (ZUCCONI et al. 2009; DISSANAYAKA et al., 2011; MARTINELLO et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; SPENCER et al., 2012; CHUNG et al., 2012; SCHWARZ et al., 2012; LEE et al., 2013; WANG et al., 2013). No presente estudo, tanto as células derivadas do tecido adiposo como do tecido ovariano foram capazes em se diferenciar nas três linhagens propostas. Interessantemente, é possível observar para diferenciação adipogênica e condrogênica que maior quantidade de células derivadas do tecido ovariano se diferenciaram (figura 10 e figura 12). Para a diferenciação osteogênica, o mesmo aparenta acontecer, no entanto não está tão evidente como nas outras duas diferenciações. Como a medula óssea e o tecido adiposo representam as principais fontes de MSC na medicina veterinária (CHUNG, et al., 2012), alguns trabalhos foram realizados com intuito de comparar as características das células derivadas dessas fontes, sendo uma delas o potencial de diferenciação, no qual foi demonstrado que as células do tecido adiposo podem se diferenciar melhor (SPENCER et al 2012; CHUNG et al., 2012). Contudo, esse foi o primeiro trabalho que demonstrou a capacidade de diferenciação de células mesenquimais derivadas do tecido ovariano, as quais possuem um melhor potencial para diferenciação que

as células derivadas do tecido adiposo, até então a melhor fonte de células mesenquimais.

Como ambas as células expressam genes relacionados à pluripotência, foi realizado um ensaio de diferenciação neuronal, o qual já foi relatado previamente em cMSCS (DISSANAYAKA et al., 2011; OH et al., 2011; FERNANDES et al., 2012; PARK et al., 2012 LEE et al., 2013), apesar de não ter sido relatado estudos comparativos entre dois tipos de células. No presente experimento foi possível verificar que as cO-MSCs expressaram dois marcadores para linhagem neuronal, os quais as cA-MSCs não expressaram, mais um fato que suporta a ideia de que as células de origem ovariana possuem melhor capacidade de diferenciação. Esse ensaio de diferenciação fornece evidências do possível potencial pluripotente destas células, sendo que as células do origem ovariana podem ser mais pluripotentes que as adiposas, não só pelo fato da melhor diferenciação, mas principalmente pela maior expressão gênica do gene Oct4.

De acordo com as características pré estabelecidas que uma MSC deve possuir (PITTENGER *et al.,*1999), é possível afirmar que as células derivadas nesse estudo eram MSC. De acordo com nosso conhecimento este é o primeiro estudo que mostra a possibilidade de derivação de células ovarianas adesivas ao plástico, com morfologia fibroblastóide e com potencial de diferenciação em três linhagens mesenquimais (osteogênica, adipogênica e condrogênica), quando submetidas ao estímulo apropriado. Ainda, as células foram capazes de formar colônias, possuíam rápida proliferação e mantiveram-se em proliferação estável por pelo menos quatorze passagens, demonstrando características de crescimento similares as cA-MSCs. Mais importante, deve ser destacado que possivelmente as cO-MSCs possuem melhor capacidade de diferenciação que as cA-MSCs.

Portanto, os dados apresentados neste trabalho mostram que é possível identificar células tronco no tecido ovariano, após o nascimento e ainda, verificar características semelhantes as cA-MSCs, até então considerado a melhor fonte de MSC. Adicionalmente, as cO-MSCs possivelmente possuem melhor capacidade de diferenciação que as cA-MSCs, podendo ser excelente fonte para ensaios pré-clínicos e terapia celular.

8. CONCLUSÕES

- É possível a derivação de células tronco do tecido ovariano de cadelas, após o nascimento.
- As células derivadas do tecido ovariano, pós-natal, possuem características que as qualificam como MSC: aderência ao plástico, presença de marcadores de senso comum, ausência de marcadores de células hematopoéticas, diferenciação em três linhagens mesenquimais.
- As células derivadas, tanto do tecido ovariano como do adiposo, expressam genes de pluripotência, sendo esses mais expressos pelas células de origem ovariana
- As células de origem ovariana demonstraram melhor diferenciação *in vitro,* em relação às adiposas, tanto em três linhagens mesenquimais como uma ectodermal.

9. PERSPECTIVAS E IMPLICAÇÕES

O presente estudo propôs a derivação de uma linhagem de células provenientes do tecido ovariano de cães. As células derivadas apresentaram características básicas de células mesenquimais. Adicionalmente, tanto as células do tecido adiposo, como as ovarianas demonstraram também um potencial pluripotente pela expressão de Sox2, Nanog, TERT e Oct4. Sendo que este último foi mais expresso nas células ovarianas. Além disso, as células demonstraram a capacidade de se diferenciar em linhagem neurogênica, confirmada pela expressão dos marcadores GDNF, BDNF e Nestina e tubulina.

Este estudo evidenciou a identificação de uma nova fonte de células tronco, com possível potencial pluripotente e melhor diferenciação que o tecido adiposo. A possibilidade de uma fonte pluripotente em um organismo adulto representa uma ferramenta promissora para a medicina regenerativa, aumentando a abrangência do tratamento autólogo. O cão, além de um importante paciente para a medicina veterinária, exerce um importante papel no modelo pré clinico para humanos, neste trabalho em particular, principalmente para mulheres com infertilidade ovariana. Desse modo, este estudo contribuiu para o progresso de terapia celular, contribuindo não somente para aumentar o conhecimento da biologia básica e sistemas celulares, mas também para ensaios pré clínicos.

O próximo desafio para o avanço tecnológico com as células tronco mesenquimais seria explorar o potencial pluripotente dessas células, avaliando as vias de determinação para multipotência ou pluripotência. Para a medicina regenerativa, o próximo passo seria avaliar a segurança e eficácia do uso de tais células.

10. REFERÊNCIAS

AKIHARA, Y.; SHIMOYAMA, Y.; KAWASAKO, K.; KOMINE, M.; HIRAYAMA, K.; TERASAWA, A.; OHMACHI, T.; MATSUDA, K.; OKAMOTO, M.; TANIYAMA, H. Histological and Immunohistochemical Evaluation of Canine Ovary. **Reproduction Domestic Animal.** v. 42, p495-501, 2007.

AVILION, A.A., NICOLIS SK, PEVNY LH, PEREZ L, VIVIAN N, LOVELL-BADGE R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes**, v. 17, n. 1, p. 126-140, 2003.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P., OLIVEIRA, A.P.E., DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta ortopédica brasileira**, v. 14, n.1, p. 22- 24, 2006.

BRONZINI, I. ; PATRUNO, M.; IACOPETTI, I.;MARTINELLO, T. Influence of temperature, time and different media on mesenchymal stromal cells shipped for clinical application. **The Veterinary Journal,** v. 194, p. 121- 123, 2012.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 25-35, 2009. 21

CHOI, S.A.; CHOI, H.S.; KIM K.J.; LEE, D.S.; LEE, J.H.; PARK, JY.; KIM, E.Y.; LI, X.; OH,H.Y.; LEE, D.S.; KIM, M.K. Isolation of canine mesenchymal stem cells from amniotic fluid and differentiation into hepatocyte-like cells. **In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal.** v.49, p. 42-51, 2013

CHUNG, D.J.; HAYASHI, K.; TOUPADAKIS, C. A.; CLARE, A. W.; YELLOWLEY, E. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Research in Veterinary Science,** v.92, p 66-75, 2012.

CONKIE, D. Separation of viable cells by centrifugal elutriation. **Animal cell culture: a practical appronach**. England,IRL PRESS. p.113- 124, 1987.

CUI, L.; LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, W.; CEN, L. ; SUN, J.; YIN, W.; LIU, W.; CAO, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. **Biomaterial**, v.28, p.5477-5486, 2007.

DEL CARLO, R.J.; MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M. Células tronco e fatores de crescimento na reparação tecidual. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 167-169, 2008.

DISSANAYAKA, W. L.; ZHU, X.; CHENGFEI, Z.; JIN, L. Characterization of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Canine Premolars. **Journal of Endodontics,** v. 37, p. 1074-1080, 2011.

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

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, v.109, p. 235-242, 2000.

FERNANDES, R.A.; WENCESLAU, C.V.; REGINATO, A.L.; KERKIS, I.; MIGLINO, M.A. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation**. Placenta**, v. 33, p. 640-644, 2012.

FONG, C.Y.; CHAK, L.L.; SUBRAMANIAN, A.; & TAN, J.H.; BISWAS, A.; GAUTHAMAN, K.; CHOOLANI, M.; CHAN, W.K.; BONGSO, A. A Three Dimensional Anchorage Independent In Vitro System for the Prolonged Growth of Embryoid Bodies to Study Cancer Cell Behaviour and Anticancer Agents. **Stem Cell Rev and Rep**, v.5, p. 410-419, 2009.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animals Cells**: A Manual of Basic Technique – 4th Edition, New York, 672p, 1994.

FRIEDENSTEIN, A.J. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp. Hematol.,** v. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDENSTEIN, A. J. P. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **The Journal of Embryological Experimental Morphology**, v.16, p.381-390, 1966.

GANG, E.J.; HONG, S.H.; JEONG, J.A.; HWANG, S.H.; KIM, S.W.; YANG, I.H.; AHN, C., HAN, H.; KIM, H. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 321, p. 102-108, 2004.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S.A.; ARGYLE, D.J.; Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery**. The Veterinary Journal**, v.191, p. 19-27, 2012. 22

GAZIT, Z.; PELLED, G.; SHEYN, D.; KIMELMAN, N.; GAZIT, D. **Mesenchymal Stem Cells**:Principles of Regenerative Medicine (Second edition), cap. 17, p. 285-304, 2011.

GRECO, S.J.; LIU, K.; RAMESHWAR, P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. **Stem Cell.** v. 25, n. 12, p. 3143-3154, 2007.

HAYES, B.; FAGERLIE, S. R.; RAMAKRISHNAN, A.; BARAN, S.; HARKEY, M.; GRAF, L.; BAR, M.; BENDORAITE, A.; TEWARI, M.; TOROK-STORB, B. Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. **Stem Cells**. v.26, p.465–473, 2008.

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. **The Veterinary Journal**, v. 194, p. 361-368, 2012a.

HODGKISS-GEERE, H. M.; ARGYLE, D. J.; CORCORAN, B. M.; WHITELAW, B.; MILNE, E., BENNETT, D.; ARGYLE, S. A. Characterisation and cardiac directed differentiation of canine adult cardiac stem cells. **The Veterinary Journal**, v. 191, p.176-182, 2012b.

HOU, Y.B.; ZOU, C.-W.; WANG, Y.; LI, D.-C.; LI, Q.-B.; LI, H.-X.; ZHANG, H.-Z.; ZHANG, Q.; FAN, Q.-X. Establishing a New Electrical Conduction Pathway by Anastomosis of the Right Auricle and Right Ventricle Assisted by Mesenchymal Stem Cells in a Canine Model. **Transplantation Proceedings,** v. 43, p. 3980-3986, 2011.

HORN, P.A.; J.C. MORRIS, T. NEFF, H.P. KIEM ; Stem cell gene transfer—efficacy and safety in large animal studies. **Mol Ther,** 10, pp. 417–431, 2004.

JUN,C.; ZHIHUI, Z.; LU, W.; YAOMING, N.; LEI, W.; YAO, Q.; ZHIYUAN, S. Canine bone marrow mesenchymal stromal cells with lentiviral mHCN4 gene transfer create cardiac pacemakers. **Cytotherapy**, v.14, p. 529–539, 2012.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature cell biology,** v.428**, p.** 145–150, 2004.

KIRK, A.D. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. Immunol Rev, 196, pp. 176–196, 2003.

KURODA' Y.; DEZAWA, M. Mesenchymal Stem Cells and Their Subpopulation, Pluripotent Muse Cells, in Basic Research and Regenerative Medicine. The Anatomical Record, Volume 297, Issue 1, pages 98–110, January 2014.

KURODA, Y. *et al*. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 8639–8643, 2010.

LADEIRA, P.R.S.; ISAAC, C.; FERREIRA, M.C. Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. **Rev Med**. V. 90(1), p.47-51, 2011.

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, p.144-151, 2013.

LEI L, LIAO W, SHENG P, FU M, HE A, HUANG G. Biological character of human adipose-derived adult stem cells and influ- ence of donor age on cell replication in culture. **Sci China C Life S**ci 50:320–328, 2007.

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

MARTIN, B. M. Routine cell culture. In: MARTIN, B. M. **Tissue Culture Technques: an introduction**: Berlin, Birkhäuser, 1994. p. 29-89a.

MARTIN, B. M.Primary cell culture. In: MARTIN, B. M. **Tissue Culture Technques: an introduction**: Berlin, Birkhäuser, 1994. p. 113- 136b.

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

MAURER, H.R. Towards Chemically- Defined, Serum- free Media for Mammalian Cell Culture. **Animal cell culture: a practical appronach**. England,IRL PRESS, 1987. p.13- 31.

MORASCA, L. & ERBA, D. Flow citometry. **Animal cell culture: a practical appronach**. England,IRL PRESS, 1987. p.125- 148.

NIWA, H., MIYAZAKI, J., SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet**., v. 24, n. 4, p. 372-376, 2000.

NEUPANE, M.; CHANG, C.C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, p.1007–1015, 2008.

NICHOLS, J., ZEVNIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWE-NEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. ***Cell,*** *95*(3), 379-391, 1998.

OH, H. J. ; PARK, J. E. ; KIM, M. J. ;. HONG, S. G; RA, J. C. ; JO, J. Y. ; KANG, S. K. ; JANG, G. ; LEE, B. C. Recloned dogs derived from adipose stem cells of a transgenic cloned beagle. **Theriogenology**, v. 75, p. 1221–1231, 2011.

PARK, S.S.; LEE, Y. J.; LEE, S.H.; LEE, D.; CHOI, K.; KIM, W. H.; KWEON, O.K.; HAN, H. J. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells. **Cytotherapy**, v. 14, p. 584-597, 2012.

PATRICIO, L.F.L. **Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães.** 2010. 95p. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

PACCHIAROTTI, J.; MAKI ,C.; RAMOS,T.; MARH, J.;HOWERTON, K.; WONG,J.; PHAM, J.; ANORVE,S.; CHOW, Y.C.; IZADYAR, F. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. **Differentiation.** v.79, p.159–170, 2010.

PENHA, E. M.; MACAMBIRA, S. G.; SOARES, M.B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BARROUIN-MELO, S. M.; AGUIAR, P. H. P. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, 2009, Ouro Preto. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.342**,** 2009.

PERINI, SILVANA; SILLA, LUCIA M. R.; ANDRADE, FABIANA M..A telomerase em células-tronco hematopoéticas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 30, n. 1, Feb. 2008 .

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMRY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application.

Injury, International Journal of the Care of the Injured, volume 38, suplemento 4, p.23-33, 2007.

POUREBRAHIM, N.; HASHEMIBENI, B.; SHAHNASERI, S.; TORABINIA, N.; MOUSAVI, B.; ADIBI, S.; HEIDARI, F.; ALAVI, M. J. A comparison of tissue-engineered bone from adipose-derived stem cell with autogenous bone repair in maxillary alveolar cleft model in dogs**. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, In Press, Corrected Proof**, 2012.

ROITT, I. et al. **Imunologia.** São Paulo: Manole, 1999. 424p.

RIVAS, M.P. **Avaliação de marcadores da senescência celular replicativa em células tronco mesenquimais humanas**. 2013. 37p. Trabalho de conclusão de curso (monografia): Universidade Federal da Bahia, instituto de biologia, Salvador, 2013.

SCHNEIDER, M.R.; WOLF, E.; BRAUN, J.; KOLB, H-J.; ADLER, H. Canine embryonic stem cells: State of the art. **Theriogenology,** v. 74, p. 492-497, 2010.

SCHWARZ, C.; LEICHT , U.; ROTHE ,C.;DROSSE, I.; LUIBL, V.; RÖCKEN, M.; SCHIEKER, M**.** Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells**. Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 457–462, 2012.

SILVEIRA, A. C. C.; LIMA, R. S.; PENHA, E. M.; MACAMBIRA, S. G.; SOARES, M.B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BARROUIN-MELO, S. M.; AGUIAR, P. H. P. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. In: 8th International 24 Veterinary Immunology Symposium, 2009, Ouro Preto. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, 2009, p.342.

SILVEIRA, R. F. M.;FERREIRA, L. C.; GINANI,F.; BARBOZA, G.A.V.Influência do protocolo laboratorial no rendimento in vitro de células-tronco mesenquimais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**,v.9, p.17-21, 2010.

SIMERMAN, A. DUMESIC, DA, CHAZENBALK, GD. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy**. Clinical and Translational Medicine**, **3**:12, 2014.

SIMERLY, C.R.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; HEWITSON, L.; SCHATTEN, G. **Confocal imaging of structural molecules in mammalian gametes**. In **A Laboratory Guide of the Mammalian Embryo** (David K. Gardner & Michelle Lane, editores). Oxford University Press, p. 165-183, 2003.

SPENCER, N. D.; CHUN, D.; VIDAL, M.A.; GIMBLE, J.M.; LOPEZ, M. J. In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. **The Veterinary Journal**, v. 191, p. 231-239, 2012.

SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Res. Rev**. **5**, 91–116, 2006.

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

TAKADA, I.; KOUZMENKO, A. P.; KATO, S. Wnt and PPARgamma signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. **Nat. Rev. Rheumatol**, v. 5, p. 442–447, 2009.

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. 150, 2012.

VAAGS, A.K.; ROSIC-KABLAR, S.; GARTLEY, C.J.; ZHENG, Y.Z.; CHESNEY, A.; VILLAGÓMEZ, D.A.; KRUTH, S.A.; HOUGH, M.R.; Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. **Stem Cells**. v.27, p. 329–340, 2009.

VIRANT-KLUN, I.; ZECH, N.; ROZMAN, P.; VOGLER, A.; CVJETICANIN, B.; KLEMENC, P.; MALICEV, E.; MEDEN-VRTOVEC, H. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. **Differentiation.** v.76, p. 843-856, 2008.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogênica and osteogênica capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p.613-622, 2007.

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, p. 279–289, 2010.

WAKAO, S. *et al.* Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 9875–9880, 2011.

WANG, Y.; ZHAO, Y.; YANG, W.J. J.; GE, L. Preliminary Study on Dental Pulp Stem Cell–mediated Pulp Regeneration in Canine Immature Permanent Teeth. **Journal of Endodontics,** v.39, p. 195-201, 2013.

WILSON, E.B. The Cell in Development and Inheritance. **New York, NY: MacMillan**, 1963.

WILCOX, J. T.; SEMPLE, E.; GARTLEY, C.; BRISSON, B. A.; PERRAULT, S. D.; VILLAGO´MEZ, D. A.; TAYADE, C.; BECKER, S.; LANZA, R.; BETTS, D. H.Characterization of canine embryonic stem cell lines derived from different niche microenvironments. **Stem Cells Dev**.v.18, p.1167–1178, 2008.

WHITE**,** Y..A. R.; WOODS**,** D.C.; TAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women**. Nature Medicine**, v. 18, p. 413–421, 2012.

ZHANG, Z.Q.; JIN, Y.; LI, Y.Q.; ZHANG, Y.J. Isolation, culture and multi-directional differentiation potency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v.11, n.42, 2007.

ZOU, K.; YUAN, Z; YANG, Z; LUO, H; SUN, K.; ZHOU, L.; XIANG, J.; SHI, L.; YU, Q.; ZHANG, Y.; HOU, H.; WU, J**.** Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries**. Nature Cell Biology**, v. 11, p. 631–636, 2009.

ZOU, K.; HOU, L.; SUN K.J.; XIE, W.H.; WU, J. Improved efficiency of female germline stem cell purification using fragilis-based magnetic bead sorting. **Stem Cells Dev.** V. 20, p. 2197–2204, 2011.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; BUENO, D. F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C. E.; BUENO, M. R. P.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Mesenchymal Stem Cells Derived From Canine Umbilical Cord Vein—A Novel Source for Cell Therapy Studies. **Stem cells and development**, v. 19, p. 395- 402, 2009.

ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Prog Horm Res**. v. 6, p.63–109, 1951.