

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE ANEXOS FETAIS EQUINOS

BRUNA DE VITA

Botucatu, São Paulo

Dezembro de 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE ANEXOS FETAIS EQUINOS

BRUNA DE VITA

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária
da Universidade Estadual Paulista (Unesp)
para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.Dr. Nereu Carlos Prestes
Co-Orientadora: Prof^a.Dra. Fernanda da
Cruz Landim

Botucatu, São Paulo

Dezembro de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

De Vita, Bruna

Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de anexos fetais equinos / Bruna De Vita. - Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Nereu Carlos Prestes

Coorientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Feto. 3. Células-tronco. 4. Cordão umbilical.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; cordão umbilical; Equino; Líquido amniótico; Membrana amniótica.

Comissão Examinadora

Prof.Dr. Nereu Carlos Prestes
Presidente e Orientador
Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof.Dr. Rogério Martins Amorim
Membro
Depto. de Clínica de Grandes Animais
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof^a.Dra. Claudia Barbosa Fernandes
Membro
Depto. de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Prof^a.Dra. Bruna da Rosa Curcio
Membro
Depto. de Clínicas Veterinárias
FMV – UFPel – Pelotas

Prof^a.Dra. Luciana da Silva Leal
Membro
Depto. de Reprodução Animal
FMV – UNIPAR – Umuarama

Data da defesa: 16 de dezembro de 2011

Dedico este trabalho aos meus pais José e Maria Lucia e aos meus irmãos Camila e Gustavo, que apesar da distância estão sempre presentes em minha vida.

Agradecimentos

Aos meus pais por todo amor, pela vida e educação que me proporcionaram, pelos exemplos de caráter, honestidade.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes por acreditar em mim! À sua generosidade. Pela oportunidade, pelos ensinamentos e acima de tudo pela amizade. Minha eterna gratidão.

À minha co-orientadora Prof^a. Dra. Fernanda da Cruz Landim. Por todo o conhecimento compartilhado. Pela confiança em mim depositada, apoio, carinho e amizade dentro e fora da universidade.

Às minhas grandes amigas Loreta Lemes Campos, Amanda Jerônimo Listoni, Natália P.P. Freitas e Bianca A. Monteiro, pela dedicação e companheirismo, e por tornar os momentos de trabalho sempre divertidos e especiais.

Aos meus amigos, Ian Martin, Leandro Maia pelo apoio, colaboração e amizade.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Reprodução Animal Avançada e Terapia Celular Avançada por todo auxílio prestado.

À Prof^a. Dra. Maria Denise Lopes, que mesmo sem ter ligação direta com meu trabalho na pós-graduação sempre esteve disposta a contribuir. Muito obrigada pela atenção e carinho!

Aos professores Rogério Martins Amorim, Renée Laufer Amorim, Lígia Mota e Bruna da Rosa Curcio, cuja atenção e colaboração permitiram a realização deste trabalho.

Aos frigoríficos Pomar e Foresta, ao Haras Santa Maria de Araras e aos veterinários responsáveis, pelo auxílio prestado.

A todos os meus amigos e colegas do Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

A todos os docentes do Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária minha admiração e agradecimento pelos ensinamentos e atenção prestados.

Aos funcionários do Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária por serem sempre solícitos e atenciosos.

Aos meus grandes amigos de Botucatu e São Paulo por estarem sempre ao meu lado.

Aos animais.

**“Agradeço a todas as dificuldades
que enfrentei; não fosse por elas, eu
não sairia do lugar.”**

(Chico Xavier)

Lista de Quadros

CAPÍTULO 1

Quadro 1: Autores, momento da coleta e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesequimais derivadas do líquido amniótico humano na última década.....14

Quadro 2: Autores e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesequimais derivadas da membrana amniótica humana na última década.....16

Quadro 3: Autores e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesequimais derivadas da matriz extra vascular do cordão umbilical equino na última década.....20

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44 de células fibroblastóides derivadas do líquido amniótico equino coletado no terço inicial, médio e final da gestação.....26

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44 de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina coletada no terço inicial, médio e final da gestação e no momento do parto.....41

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44, bem como controle de autofluorescência e controle negativo do CD44 (%) de células fibroblastóides derivadas do tecido de cordão umbilical equino coletado no terço inicial, médio e final da gestação e no momento do parto.....56

Lista de Figuras

CAPÍTULO 2

Figura 1: Cultivo primário de células aderentes com morfologia fibroblastóide derivadas do líquido amniótico equino coletados de úteros gravídicos de terço inicial (A), médio (B), final (C) de gestação e no momento do parto a termo (D).....25

Figura 2: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas amostras líquido amniótico equino, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).....26

Figura 3: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas de líquido amniótico equino coletado no terço inicial da gestação. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.....26

Figura 4: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas do líquido amniótico equino nas linhagens osteogênica observando-se depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina e em vermelho pela coloração HE.....27

CAPÍTULO 3

Figura 1: Adesão e morfologia fibroblastóide (A) e alcance de confluência (B) de células derivadas da membrana amniótica equina.....40

Figura 2: Células com morfologia poligonal, circunscritas, frequentemente presentes no cultivo de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina.....40

Figura 3: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas da membrana amniótica equina, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).....41

Figura 4: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.....42

Figura 5: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas da membrana amniótica equina nas linhagens osteogênica observando-se

depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina e em vermelho pela coloração HE.....43

CAPÍTULO 4

Figura 1: Adesão e morfologia fibroblastóide (A) e alcance de confluência (B) de células derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino.....55

Figura 2: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas amostras tecido extra vascular de cordão umbilical equino, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).....55

Figura 3: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.....56

Figura 4: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas do tecido de cordão umbilical equino nas linhagens osteogênica observando-se depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas e em vermelho pela coloração HE, em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina.....57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

Introdução.....	1
Objetivos Gerais.....	2
Objetivos específicos.....	3
Revisão de literatura.....	3

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser enviado para a revista “Veterinary Research Communication”: Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais e no momento do parto.....	21
---	----

CAPÍTULO 3

Artigo a ser enviado para a revista “Stem Cell and Development”: Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica equina obtida em três momentos gestacionais e no momento do parto.....	32
---	----

CAPÍTULO 4

Artigo científico a ser enviado a revista “Cell Proliferation” : Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino obtido de fases gestacionais e no momento do parto a termo.....	50
--	----

CAPÍTULO 5

Discussão Geral.....	63
Conclusões Gerais.....	66
Referências.....	66

Capítulo 1

1. Introdução

O Brasil ocupa lugar de destaque na equideocultura mundial sendo que o agronegócio do equino movimenta cerca de R\$7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos em nosso país. O segmento do esporte eqüestre movimenta cerca de R\$705 milhões e emprega cerca de 20 500 pessoas (LIMA et Al, 2006). Neste contexto, muitas pesquisas científicas estão sendo realizadas para o incremento da produção equina nacional. Estas pesquisas refletem a tendência atual da indústria equina, com enfoque na medicina esportiva, neonatologia, diagnóstico clínico, novas tecnologias da reprodução e sanidade dos animais (ALMEIDA & SILVA, 2010).

Sendo assim, o interesse na pesquisa com célula-tronco na medicina veterinária cresceu muito nos últimos anos devido ao seu alto potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico. Pesquisas que utilizam animais como modelos experimentais são de extrema importância para medicina humana, sendo descritas como pré-requisito no caminho da aprovação de sua utilização clínica. Na medicina equina, os estudos com células-tronco estão restritos ao tratamento de lesões músculoesqueléticas e osteoarticulares principalmente de cavalos atletas. Porém, alguns poucos estudos em desenvolvimento também visam utilizar esta tecnologia para diminuir perdas econômicas relacionadas ao potencial reprodutivo de alguns animais.

As células-tronco diferem de outras células do organismo por serem indiferenciadas sendo capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas ou ainda sendo capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular. Estas células podem ser classificadas quanto seu grau de potencialidade como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, e quanto a sua origem como embrionárias ou somáticas (adultas).

Como as células-tronco embrionárias são capazes de diferenciação em todos os tipos celulares encontrados no indivíduo adulto e a utilização destas células em sua forma indiferenciada pode seguir um programa desorganizado de diferenciação dando origem a tumores (teratomas). Este fato, e as implicações éticas na utilização de células embrionárias limitam a utilização das mesmas como instrumento de pesquisa.

Estudos realizados nas últimas décadas resultaram na descoberta de uma grande variedade de células-tronco adultas, sendo as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea as conhecidas há mais tempo. Entre as células-tronco adultas, destacam-se as células-tronco mesenquimais com capacidade de diferenciação em muitas linhagens de células maduras.

A fonte mais utilizada de células-tronco mesenquimais é a medula óssea, no entanto, como o seu número e a capacidade de diferenciação destas células diminuem com a idade, seu potencial terapêutico também declina com o tempo. Devido a estas limitações outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas, sendo que as células derivadas dos anexos fetais tem recebido bastante destaque por se apresentarem como uma fonte de obtenção não invasiva, de tecidos normalmente descartados, com grande possibilidade de colheita ao nascimento para formação de bancos de células para uso posterior.

Além disto, as células-tronco mesenquimais derivadas dos anexos fetais como o líquido amniótico, a membrana amniótica e o cordão umbilical, preservam características dos tecidos embrionários de que se originam e muitos estudos estão indicando que estas células exibem características embrionárias como a expressão do marcador Oct-4, grande capacidade proliferativa sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade e ainda capacidade de diferenciação em diversos tecidos, inclusive extra mesenquimais.

2.Objetivos

2.1. Gerais

Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar as células-tronco mesenquimais derivadas dos anexos fetais de equinos (Líquido amniótico, Membrana amniótica e tecido extra vascular do cordão umbilical), obtidas de diferentes idades gestacionais e no momento do parto e apresentá-las como uma fonte alternativa, ética, de fácil obtenção e com grandes vantagens em sua utilização na medicina veterinária equina.

2.2. Objetivos específicos

A - Identificar células-tronco mesenquimais derivadas do líquido amniótico, membrana amniótica e tecido extra vascular de cordão umbilical de equinos.

B - Caracterizar as células imunofenotipicamente por imunocitoquímica e citometria de fluxo.

C - Realizar a diferenciação in vitro nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

3. Revisão de Literatura

3.1. Expectativas da utilização da Terapia Celular na Medicina Veterinária Equina

Considerando a indústria do cavalo no Brasil como segmento importante do agronegócio e da economia de nosso país, muitas pesquisas científicas estão sendo realizadas para o incremento da produção equina nacional, principalmente nas áreas de medicina, cirurgia, doenças e sanidade. As publicações nestas áreas refletem as tendências atuais da indústria equina, com enfoque na medicina esportiva, neonatologia, técnicas de diagnóstico clínico, novas tecnologias da reprodução de garanhões e éguas, estudos avançados sobre sanidade e doenças dos equinos, assim como estudos sobre o comportamento e bem estar nos sistemas de produção (ALMEIDA & SILVA, 2010).

Na medicina veterinária equina os estudos com células-tronco, principalmente células-tronco mesenquimais, estão restritos particularmente ao tratamento de lesões musculoesqueléticas e osteoarticulares, com resultados promissores para sua utilização no reparo de diversos tecidos, inclusive extra-mesenquimais (MAIA et Al. 2010).

O interesse no tratamento das lesões musculoesqueléticas e osteoarticulares dos equinos deve-se ao fato de que, apesar do cavalo ser um extraordinário atleta (habilidade resultante da evolução destes animais que desenvolveram rapidez para escapar dos predadores e resistência necessária para percorrer grandes distâncias na busca de alimentos e água), o equino moderno está envolvido em atividades esportivas diversas que exigem uma performance superior em razão das exigências

competitivas cada vez maiores. O estresse a que esses atletas são submetidos em treinamentos rigorosos e freqüentemente incorretos, nem sempre oferece os resultados desejados, aumentando consideravelmente o aparecimento de enfermidades e lesões relacionadas a atividades esportivas (RESENDE, 2005), levando conseqüentemente a perdas econômicas.

Dentre as enfermidades ocasionadas em decorrência de treinamento e/ou trabalho rigorosos destacam-se as lesões tendíneas, exostoses metacarpianas, lesões ligamentares, osteoartroses e miosites (PAGANELA et Al., 2008). Apesar de existirem vários métodos terapêuticos para o controle destas lesões, ainda não se encontraram tratamentos ideais, culminando em longos períodos de reabilitação, baixa taxa de sucesso na terapia e grande porcentagem de recidivas (RESENDE, 2005). Portanto, a utilização de células-tronco nestes casos podem ser uma alternativa aos tratamentos convencionais ou ainda, ser utilizados em associação com estes tratamentos visando o sucesso e aceleração da recuperação do animal.

Neste contexto, o interesse em pesquisas relacionadas à utilização de células-tronco na medicina veterinária cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial terapêutico na regeneração de tecidos e órgãos lesados, incluindo a medicina regenerativa (VIOLINI et Al., 2009). Além disto, pesquisas que utilizam animais como modelos experimentais são de extrema importância para a medicina humana. Meisner (2009) incluiu as pesquisas realizadas em animais como pré-requisito no caminho da aprovação da utilização de células-tronco na clínica humana.

Gandolfi et Al. (2011), destacaram o desenvolvimento de pesquisas utilizando animais de médio porte como cães, ovinos e suínos como modelo experimental para o desenvolvimento de terapias das doenças cardíacas humanas (primeira causa de morte nos países em desenvolvimento) e muitos outros autores descrevem bons resultados obtidos em estudos com animais em relação a doenças como osteoartrite, infarto do miocárdio, câncer de mama (BARRY et Al., 2010); doenças neurológicas, musculares, vasculares, hepáticas (PAROLINI & CARUSO, 2011); doenças auto-imunes e distúrbios metabólicos herdados (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

3.2. Definição de Células-Tronco

Células-tronco (CT) diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: São células indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número de células pode originar uma grande população de células semelhantes e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular. Fundamentalmente as células-tronco são capazes de fazer “divisões assimétricas”, ou seja, podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o pool de células-tronco, ou podem se diferenciar em células especializadas (ZAGO & COVAS, 2006).

A classificação das CT é proposta de diferentes maneiras por diversos autores no mundo todo, entretanto Mignoni-Netto & Dessen (2006) propuseram uma descrição clara e objetiva, na qual relataram que as CTs podem ser subdivididas a partir de dois critérios: o grau de potencialidade (capacidade da célula em gerar diferentes linhagens celulares) e o local onde se originam.

Quanto ao grau de potencialidade, as células podem ser classificadas como:

- **Totipotentes:** Quando isoladas são capazes de gerar por si só outro indivíduo completo, incluindo os tecidos placentários. Ex.: Células embrionárias na fase de mórula.
- **Pluripotentes:** Capazes de se diferenciar em todos os tecidos do organismo, exceto nos anexos embrionários, ou seja, podem dar origem a todas as linhagens celulares que compõem um organismo animal. Ex.: Células embrionárias na fase de blastocisto.
- **Multipotentes:** Possuem potencial de diferenciação mais restrito, limitando-se a apenas alguns tipos celulares. É encontrada em estágios posteriores ao desenvolvimento fetal e que persistem após o nascimento. Também chamadas de células-tronco adultas. Ex.: Células da medula óssea, do cordão umbilical e as células-tronco dos tecidos.
- **Unipotentes:** Capazes de gerar um único tipo celular, responsáveis pela regeneração de tecidos particulares. Ex.: Células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, espermatogônias.

Quanto ao local de origem a classificação descrita é a seguinte:

- **Embrionárias:** São as células isoladas do embrião. O que estabelece seu potencial de diferenciação é a fase em que se encontra no embrião quando as células são isoladas. Por isso, quanto mais jovem o embrião mais indiferenciadas serão suas células.
- **Adultas ou somáticas:** São células multipotentes ou presentes em todos os tecidos do organismo, incluindo o tecido nervoso, as quais têm a função de repor células lesionadas ou que se degeneram durante a vida do indivíduo. Nos tecidos essas células estão localizadas em sítios específicos, chamados de nichos, que são diferentes para cada tipo de tecido, porém geralmente se encontram aderidos à membrana basal, em áreas protegidas (CHA E FALANGA, 2007). Dentre as CT adultas estão as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais.

3.3 Células-Tronco Embrionárias

A capacidade das células-tronco embrionárias (CTE) de se diferenciarem em diversos tipos celulares em cultura permite que sejam vistas como uma fonte quase ilimitada de tecidos para transplante no tratamento de diversas doenças. Terapias com CT adultas, como as presentes na medula óssea, envolvem a injeção destas células em pacientes sem que elas tenham sido submetidas a qualquer processo de proliferação e diferenciação *in vitro*. Em contraste as CTE são cultivadas por longos períodos e devem ser diferenciadas *in vitro* antes de serem transplantadas, já que, se injetadas em sua forma indiferenciada, podem seguir um programa desorganizado de diferenciação, dando origem a tumores (teratomas) em vez do tecido terapêutico desejado (PEREIRA, 2008). Além disto, a questão ética envolvendo o uso de embriões para obtenção de células-tronco é de conhecimento de todos (ZAGO & COVAS, 2006). Levando-se em consideração estes fatos, a utilização de células-tronco embrionárias costuma ser limitada a instrumento de pesquisa.

3.4. Células-Tronco Adultas

As células-tronco adultas (CTA) são células indiferenciadas classificadas como multipotentes encontradas em organismos adultos. Fazem parte das CTA as células presentes na medula óssea (MO), sangue de cordão umbilical (SCU),

sangue periférico, polpa dentária, tecido adiposo, músculo esquelético, epitélio da pele, epitélio do sistema digestório, córnea, medula espinhal e alguns órgãos, como o pâncreas, fígado e cérebro (Zago & Covas, 2006).

No organismo adulto, células se encontram em constante atividade e ficam expostas a alterações de comportamento e estrutura pela influência de inúmeros fatores, sejam eles injúrias físicas, doenças, inflamações, estímulos químicos, dentre outros. Quando isso ocorre o organismo ativa um sistema de substituição das células lesadas ou promovem o aumento do número celular, como é o caso das células de defesa. São as CTA que promovem essa regeneração do organismo, proliferando e diferenciando-se a fim de compensar as células perdidas (ZAGO & COVAS, 2006).

Pesquisas desenvolvidas nos últimos anos resultaram na descoberta de uma grande variedade de tipos de células-tronco adultas. As hematopoiéticas (CTH), que originam todos os tipos de células sanguíneas, são as CTA conhecidas há mais tempo, sendo o transplante de medula óssea praticado há mais de 40 anos em humanos. Outros tipos de CTAs incluem as epiteliais, as musculares, as neuronais e as mesenquimais, sendo que a plasticidade, ou seja, a capacidade de originar diferentes tipos de células maduras é mais elevada nas células-tronco mesenquimais (NARDI, 2007).

3.4.1 Células-Tronco da Medula Óssea

A medula óssea (MO) é um tecido esponjoso que preenche o interior dos ossos longos presentes, sendo o local de produção de todas as células da linhagem sanguínea e do sistema imunológico (FREITAS, 2005).

As células-tronco provenientes da MO são as mais conhecidas e estudadas pelos pesquisadores. Desde a década de 50 são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético. O primeiro transplante de CT de medula óssea em humanos foi feito em 1957, em irmãos gêmeos univitelinos portadores de leucemia. Estas células têm recebido grande atenção por apresentarem alto potencial de desenvolvimento, além de seu fácil isolamento e facilidade de adesão (MAYHALL et Al., 2004).

Na década de 1960 pesquisadores descobriram que a MO era composta por dois tipos de CT: as hematopoiéticas, responsáveis por originar e repor todos os tipos de células sanguíneas (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, hemácias e

plaquetas) e as estromais, as células-tronco mesenquimáticas – também conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTM) – uma população multipotente progenitora de diversas linhagens celulares (ARAÚJO, 2005).

Em determinadas condições as CTMs poderiam dar origem a células de diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, gordura e músculo (BITTENCOURT et Al., 2006). As CTMs se destacam ainda por apresentar características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam sua utilização terapêutica. As CTMs secretam uma variedade de citocinas antiinflamatórias e fatores de crescimento por meio de moléculas bioativas, que proporcionam a modulação de uma resposta inflamatória e a reparação adequada do tecido (MONTEIRO et Al, 2010).

3.4.2 Células-Tronco Mesenquimais

Células-tronco mesenquimais são células que correspondem a uma população de células progenitoras multipotentes. Estas células foram inicialmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e colaboradores (1966). A propriedade básica que permite o isolamento e a cultura de células-tronco mesenquimais é a facilidade de adesão a superfícies como vidro ou plástico (ZAGO & COVAS, 2006). Outra característica importante das CTMs é que estão presentes em diversos tecidos do organismo, sendo a medula óssea um dos mais ricos. No entanto estas células já foram encontradas e isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como sangue periférico, sangue de cordão umbilical e placentário, tecido muscular e esquelético, derme e tecido adiposo (PRATA, 2006).

Esse tipo de comportamento sugere que, apesar de se originarem da medula óssea, as CTMs são circulantes, passando por órgãos e tecidos quando estes necessitam de reparos. Isso ocorre através de um processo fisiológico estreitamente regulado por uma complexa interação de citocinas, particularmente após a mobilização das células da medula óssea. Alguns experimentos têm mostrado que CTMs circulantes têm alta capacidade de diferenciação em células do tecido hematopoiético, células do tecido intestinal e ainda podem melhorar a função do sistema cardíaco (MANGI et Al., 2003). Sendo assim, a regeneração do tecido de

origem mesenquimal é, em grande parte, dependente da quantidade de CTMs existentes durante a vida adulta (MULLER et Al., 2010).

A característica fundamental da CMTs em cultura é sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura. A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores que incluem o betaglicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias as células mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e depositar matriz extra celular rica em cálcio. A diferenciação condrogênica ocorre quando as CTMs são cultivadas com baixa concentração de soro fetal bovino e na presença de TGF- β . Nestas condições as CTMs rapidamente mudam sua morfologia e passam a secretar glicosaminoglicanos, agreganos, fibromodulina, proteína oligométrica da matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II e condroaderina. A diferenciação adipogênica das CTMs ocorre quando a monocamada celular é cultivada em presença de isobutilmetilxantina, assim as células rapidamente acumulam gotículas de lipídeos no citoplasma (ZAGO & COVAS, 2006). Além disto, foi descrito que a diferenciação das CTMs em miócitos pode ocorrer na presença de 5-azacitidina (WAKITANI et Al., 1995).

As CTMs têm grande potencial terapêutico, pois regulam a inflamação, previnem a formação de feridas, além de promoverem a regeneração de tecidos. O uso deste tipo de célula tem sido uma excelente alternativa para tratamentos de lesões ortopédicas (BORJESSON & PERONI, 2011). Porém, de acordo com Ying et Al (2002), o desenvolvimento de tecido específico é limitado e ditado pelo ambiente original o qual as células se encontram, sendo assim este potencial pode ser alterado de acordo com o ambiente do qual as células são extraídas.

Dados científicos confirmam que as células-tronco mesenquimais liberam diversos fatores de crescimento no local implantado, dentre eles o VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) e IGF-1 (insulin-like growth factor I) tendo uma importante ação parácrina no ambiente em que são transplantadas, promovendo imunomodulação (WANG et Al. 2006).

Portanto, conclui-se que a terapia com CTMs é um procedimento promissor para o tratamento de vários tipos de doenças degenerativas, graças a sua elevada capacidade plástica (sendo capazes de originar diversos tipos celulares *in vitro*),

elevado potencial migratório e aos seus efeitos parácrinos com ação antiinflamatória e imunomoduladora. (MAIA et Al., 2010).

Na medicina humana as CTMs estão sendo testadas para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas, lesões ósseas, condrais, tendíneas, da medula espinhal, sistema nervoso central, fígado e doenças genéticas como a osteogênese imperfeita (ZAGO & COVAS, 2006). Já na medicina veterinária equina ainda são escassos os estudos em relação à utilização de células-tronco mesenquimais. No entanto, foi observado que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo equino tiveram maior potencial de proliferação *in vitro*, quando mantidas em um meio de cultura adequado, em comparação com células derivadas da medula óssea (VIDAL et Al., 2007). A partir deste preceito, Carvalho e colaboradores (2009) isolaram e cultivaram as CTMs derivadas do tecido adiposo com êxito, e concluíram que a terapia celular melhorou a organização tecidual e melhorou o processo de cicatrização de lesões tendíneas induzidas.

A fonte mais utilizada de CTM é a medula óssea, no entanto, como número e a capacidade de diferenciação destas células diminuem com a idade, seu potencial terapêutico também declina com o tempo (MULLER, 2001). Devido a estas limitações, outras fontes de CTMs foram identificadas, sendo possível isolá-las em trabéculas ósseas, tecido adiposo, líquido sinovial, sangue periférico, musculoesquelético (MIGUELL et Al., 2001) e a partir de anexos embrionários como o líquido amniótico (STEIGMANN et Al., 2008; CABRAL et Al., 2009; LOVATI et Al., 2010), membrana amniótica (TSAI et Al., 2004, MIKI et Al., 2005, LANGE-CONSIGLIO et Al., 2010) e matriz extravascular do cordão umbilical (FAUZA, 2004; GUCCIARDO et Al., 2008; CREMONESI et Al., 2011).

3.4.3 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais

A identificação precisa das células-tronco é possível utilizando-se marcadores de superfície que, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais das células de forma a permitir também a individualização de um determinado tipo celular. As células-tronco mesenquimais apresentam muitos marcadores imunofenotípicos, entretanto estes marcadores não são específicos, ocorrendo em outros tipos celulares (DE BARI et Al. 2001).

O termo CD (Cluster Designation: denominação de grupamento) é utilizado para denominar anticorpos monoclonais criados em diferentes laboratórios de todo o mundo contra os antígenos leucocitários humanos (ROITT, 1999).

De Ugarte e colaboradores (2003) e Kern e colaboradores (2006) relataram que CTMs devem expressar em sua superfície os marcadores CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD166 e não devem expressar os marcadores CD11c, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD56, CD133, CD144. Posteriormente, um critério mínimo criado para a caracterização da célula-tronco mesenquimal humana propôs que a célula deve ser aderente ao plástico quando mantida em condições de cultura; deve possuir habilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica; deve expressar CD73, CD90, e CD 105 e não deve expressar os marcadores da linhagem hematopoiética c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α e MHC II (DOMINICI et Al. 2006).

A maioria dos marcadores utilizados para a caracterização das células tronco-mesenquimais ainda não foi desenvolvida especificamente para a espécie equina e há evidência de que alguns marcadores disponíveis para outras espécies não apresentam reação cruzada com as CTM dos equinos (TAYLOR et Al. 2007). Um exemplo desta não reação inter-espécies foi demonstrada em um estudo, no qual não houve expressão entre o marcador humano CD29 e as células-tronco derivadas do tecido adiposo da espécie equina (MAMBELLI et Al. 2009).

Atualmente apenas alguns anticorpos que reconhecem epítomos equinos são vendidos comercialmente: CD13, CD44, MHC II. Portanto o desenvolvimento de produtos espécie-específicos para equinos é necessário, para que se possa realizar uma padronização da caracterização fenotípica das CTMs equinas. No entanto, sugere-se que este critério mínimo deve ser adotado para esta espécie: a expressão de CD29, CD44 e CD90 e a não expressão dos marcadores CD14, CD79 α e MHC II, já que a presença ou ausência destes marcadores já foram relatadas em muitas pesquisas (DE SHAUWER et Al., 2011)

3.4.4 Células-Tronco Mesenquimais Derivadas dos Anexos Fetais

Na última década houve um crescente interesse na investigação quanto à presença de células-tronco mesenquimais em tecidos fetais como na placenta,

líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, matriz extravascular de cordão umbilical e membrana amniótica (PRUSA et Al, 2004; MIKI et Al, 2005; URANIO et Al, 2011; CREMONESI et Al., 2011). Este fato se deve a busca de novas fontes ricas de células-tronco em alternativa a utilização da medula óssea e à possibilidade da formação de bancos de armazenamento de células colhidas ao nascimento e congeladas para uso posterior (PRUSA et Al, 2004; MIKI et Al, 2005; GUCCIARDO, 2008; STEIGMAN et Al, 2008; CREMONESI et Al., 2011).

Os anexos fetais são fontes de células-tronco extra-embrionárias, com grande potencial de aplicação na medicina regenerativa e perinatal. Células derivadas das membranas placentárias, líquido amniótico, cordão umbilical ou tecidos fetais são encontradas em maior quantidade e possuem maior potencial de expansão e de diferenciação do que as células-tronco derivadas de tecidos adultos (GUCCIARDO et Al., 2008). Fauza (2004) descreveu as membranas placentárias e o líquido amniótico como únicas fontes que contém diferentes populações de células-tronco, apresentando subpopulações mesenquimais, hematopoiéticas, trofoblásticas e possivelmente células-tronco ainda mais primitivas e indiferenciadas.

O uso dos anexos fetais como fonte de células-tronco tem inúmeras vantagens em potencial. Além da grande quantidade de células, grande potencial de expansão e diferenciação, permite uma forma de colheita não invasiva e de tecidos que, normalmente, são descartados após o parto. Este fato permite que o uso dessas células na medicina humana seja éticamente aceitável, fazendo dessas fontes um grande atrativo para medicina regenerativa (CREMONESI et Al., 2011).

As células-tronco derivadas dos anexos fetais preservam características dos tecidos embrionários de onde se originaram e muitos estudos indicam que exibem algumas características de células-tronco embrionárias como a expressão de alguns marcadores de superfície como o Oct-4 e grande capacidade proliferativa, sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade. Entretanto, o potencial de diferenciação destas células seria intermediário, ou seja, entre as pluripotentes embrionárias e as multipotentes adultas. Estas características abriram uma nova perspectiva no estudo do desenvolvimento biológico e na medicina regenerativa, não só para humanos como para animais (CREMONESI et Al., 2011).

3.4.4.1 Células-Tronco Derivadas do Líquido Amniótico

O líquido amniótico é formado por uma grande quantidade de células em suspensão, derivadas do embrião ou de origem extra-embrionária. Esta população celular varia com a fase gestacional e traduz as mudanças ocorridas no feto e seus anexos, estando bastante vinculada com a maturidade fetal (GOSDEN, 1983). As células apresentam tamanho variável de 6 a 50 μm , e morfologia também variável de escamosas a arredondadas (BYDLOWSKI et Al, 2009).

A detecção de células progenitoras no líquido amniótico humano foi inicialmente relatada em 1993, quando células arredondadas, pequenas e nucleadas, foram encontradas antes da 12^a semana de gestação e identificadas como progenitoras hematopoiéticas, possivelmente provenientes da vesícula vitelínica (TORRICELLI et Al., 1993). Hoje, sabe-se que três tipos celulares são encontrados no líquido amniótico: Células Epitelióides (E), oriundas da pele e trato urinário do feto; Células Amnióticas (AF) propriamente ditas, originadas nas membranas placentárias e trofoblasto (produtoras de estrógenos, progesterona e gonadotrofina coriônica humana); e Fibroblastóides (F), originadas dos tecidos conjuntivos, apresentando características e marcadores para CTMs e devem ser chamadas de CTMs derivadas do líquido amniótico (GUCCIARDO et Al., 2008).

É importante salientar que as células dos tipos AF e E aparecem no início do cultivo enquanto as células F aparecem posteriormente, porém somente AF e F persistem enquanto as células do tipo E regridem com o passar do tempo (PRUSA & HENGSTSCHLAGER, 2002).

Na medicina humana o líquido amniótico possui como vantagem a facilidade de obtenção, uma vez que a amniocentese é procedimento de rotina como modo de propedêutica fetal e associado a um baixo número de complicações, podendo também ser colhido em cesarianas eletivas (CABRAL et Al., 2009, GUCCIARDO et Al, 2009, CREMONESI et Al 2011). Já na medicina veterinária podem ser facilmente obtidos no momento do parto normal ou em cesarianas e também em frigorífios abatedouros, já que úteros gravídicos são considerados como descarte (CREMONESI et Al., 2011; PARK et Al, 2011; URANIO et Al., 2011; LOVATI et Al., 2011).

Células derivadas do líquido amniótico, isoladas e cultivadas in vitro têm expressado, frequentemente, marcadores de pluripotencialidade e capacidade de diferenciação em tecidos das três camadas germinativas (PRUSA et Al., 2004; TSAI et Al., 2004; YOU et Al., 2009; URANIO, et Al., 2011). De Coppi et Al., 2007 observaram a diferenciação de CT do líquido amniótico em até 6 diferentes linhagens: osteogênica, adipogênica, miogênica, endotelial, neurogênica e hepática.

O quadro abaixo demonstra as principais observações realizadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de CTMs do líquido amniótico humano na última década.

QUADRO 1: Autores, momento da colheita e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesequimais derivadas do líquido amniótico humano na última década

Autores	Momento da colheita	Principais observações
Tsai et Al., 2004	Quarto mês da gestação	Expressão de Oct-4, diferenciação na linhagem osteogênica, adipogênica e neurogênica.
Prusa et Al., 2004	Quarto mês da gestação	Expressão de marcadores neurogênicos esporadicamente e aumento considerável da expressão destes marcadores quando cultivados em meio de indução da diferenciação.
Tsai et Al., 2006	Quarto mês da gestação	Expressão de Oct-4, NANOG e diversos marcadores neurogênicos: NES, TUBB3, NEFH, NEUNA 60, GALC e GFAP antes e após a o cultivo em meio de indução de diferenciação.
De Coppi et Al., 2007	Quarto mês da gestação	Diferenciação em 6 linhagens celulares: osteogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica, endotelial, neurogênica e Hepática
Steigman et Al., 2008	Quarto mês da gestação	Expressão de CD73, CD105, CD44, CD29, CD90 e CD13. Não expressão CD45 e CD34. 80% viabilidade após a congelação por 5 meses.
Peister et Al., 2008	Quarto mês da gestação	Robusta mineralização de cálcio em cultivo 3D.
Antonucci et Al., 2009	Quarto mês da gestação	CTMs cultivadas diretamente em meio de indução osteogênica demonstraram depósitos de mineralizações de cálcio em 18 dias, expressão de todos os marcadores de osteogênese em 30 dias.
Cabral et Al., 2009	Quarto mês da gestação	Diferenciação miogênica e adipogênica confirmadas por método enzimático calorimétrico (triglicérides e creatinofosfoquinase, desidrogenase láctea e aldolase) e cariótipo sem alterações cromossômicas.
You et Al., 2009	Cesariana a termo	Facilmente expandidas e induzidas à diferenciação de diversos tipos celulares, expressão de Oct-4, expressão de marcadores de CTM. Não tumorogênicas.
Steigman et Al., 2009	Cesariana a termo	Isoladas, cultivadas e expandidas com sucesso, não tumorogênicas, diferenciação osteogênica, expressão dos marcadores de CTM e Oct-4
Phermthai et Al., 2010	Quarto mês da gestação	Expressão de Oct – 4 , SSEA-4, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e diferenciação osteogênica, adipogênica e neurogênica.

Na medicina veterinária equina ainda são poucos os estudos realizados com células-tronco derivadas do líquido amniótico. No entanto alguns autores já descreveram o isolamento e caracterização de células desta fonte colhidas durante

o parto de equinos. A população de células de fluido amniótico demonstrou ter maior taxa de crescimento e proliferação do que populações de células adultas e outras células fetais. Estas células apresentaram diferenciação avançada para diversas linhagens celulares: adipogênica, osteogênica, miogênica e neurogênica, bem como outra característica marcante: a expressão de marcadores de pluripotência como o Oct-4 (LOVATI et Al., 2010). Mais recentemente CTMs do líquido amniótico equino foram também isoladas com sucesso, demonstrando grande capacidade de proliferação e apresentando a expressão de marcadores típicos de CTMs e capacidade de diferenciação em três diferentes linhagens celulares (PARK et Al, 2011).

3.4.4.2. Células-Tronco Derivadas da Membrana Amniótica

A membrana amniótica apresenta propriedades antiinflamatórias, antibióticas e de proteção às feridas. Estas propriedades, combinadas com a ausência ou baixa imunogenicidade, levaram ao uso clínico da membrana amniótica como curativo para queimaduras de pele, úlceras nos membros inferiores e diversas lesões oftálmicas em seres humanos. No entanto, nos últimos anos um novo foco de pesquisa quanto às células derivadas da membrana amniótica surgiu: sua utilização na terapia celular e medicina regenerativa em transplantes alogênicos ou xenogênicos (PAROLINI & CARUSO, 2011).

Na membrana amniótica estão presentes dois tipos celulares de diferentes origens: células epiteliais amnióticas derivadas do ectoderma embrionário e células amnióticas mesenquimais derivadas do mesoderma embrionário (SAKURAGAWA et Al., 2004). As células epiteliais amnióticas humanas desenvolvem-se a partir do epiblasto, oito dias após a fertilização e antes da gastrulação do embrião, abrindo a possibilitando que essas células mantenham a plasticidade das células embrionárias.

A tabela abaixo demonstra as principais observações realizadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de CTMs da membrana amniótica humana na última década (Quadro 2).

QUADRO 2: Autores e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica humana na última década

Autores	Principais observações
Igura et Al., 2004	Diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.
Miki et Al., 2005	Expressão de Oct-4 e NANOG. Esferas 3D de aglomerados celulares. Diferenciação em células das linhagens endodermis, mesodermis e ectodermis. Não tumorogênicas.
Yen et Al, 2005	Expressão de marcadores para CTM e SSEA-4, TRA-1-61 e TRA-1-80. Diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica. Taxa proliferativa maior do que as CTMs da MO.
Shuang-zhi, Ping & Xi-ning, 2011	Expressão de CD44, CD90, Vimentina, não expressão de CD45.
Díaz-Prado et Al., 2011	Ambas as céls (epitelial e mesenquimal) expressaram perfil imunofenotípico de CTM, diferenciação em 3 linhagens mesodermis.

Os estudos com células-tronco provenientes da membrana amniótica de equinos são ainda mais escassos do que os estudos com células derivadas do líquido amniótico. No entanto, nosso grupo de estudo obteve sucesso no cultivo e na caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica canina e equina. Estas células foram obtidas através da digestão enzimática em solução de collagenase e após o cultivo demonstraram habilidade de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, e foram marcadas positivamente para vimentina e não coradas para citoqueratina pelo ensaio de imunocitoquímica, além de expressar os marcadores característicos de células mesenquimais CD44 e CD 90 e não expressarem o CD34 (DE VITA et Al ., 2010^a, DE VITA, B., 2010^b).

Recentemente Lange-Consiglio et Al., 2011 relataram que células isoladas tanto da porção epitelial, como da porção mesenquimal da membrana amniótica equina, colhidas durante parto a termo, expressaram marcadores de pluripotencialidade (TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4 e Oct-4), marcadores de CTMs (CD29, CD105, CD44 e CD166, com ausência de expressão do CD34) e capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica, antes e

após serem criopreservadas. Estas células foram transplantadas alogenicamente em três cavalos com lesões tendíneas e resultaram em uma rápida redução do tamanho da lesão nas imagens ultrassonográficas, concluindo-se que esta fonte pode ser utilizada para a terapia celular.

3.4.4.3 Células-Tronco derivadas do Cordão Umbilical

3.4.4.3.1 Células-Tronco derivadas do Sangue do Cordão Umbilical

Na medicina humana o sangue de cordão umbilical é utilizado há mais de 20 anos como fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplante. Além disto, as células do sangue de cordão umbilical e as células derivadas do tecido extravascular do cordão já demonstraram potencial de diferenciação pluripotente, ou seja, para diversas linhagens celulares das três camadas germinativas, o que as torna uma rica, ética e interessante fonte de células-tronco (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

O sangue do cordão pode ser colhido ao nascimento utilizando-se um kit estéril que consiste em uma bolsa contendo um anticoagulante (citrato ou heparina) conectados a uma ou várias agulhas de colheita. Estas amostras podem ser colhidas *in útero*, após o nascimento e antes da liberação da placenta ou ainda, *ex útero*, em partos normais ou em cesarianas sem causar dor à criança ou à mãe (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

O potencial clonogênico de células hematopoiéticas do cordão umbilical humano foi observado pela primeira vez em 1974 por Knudtson e em 1989 Broxmeyer e colaboradores confirmaram a presença de células-tronco hematopoiética no sangue do cordão umbilical. A partir de então muitos outros estudos foram realizados sobre o potencial clonogênico, a propriedade de auto-renovação e a capacidade de expansão *in vitro* destas células (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de muitas doenças malignas e benígnas (BROXMEYER, 2010).

Além disto, em 2004 foi relatada a descoberta de células-tronco não hematopoiéticas, pluripotentes chamadas de células-tronco *embryonic-like* (MCGUCKIN et Al., 2004) que foram capazes de se diferenciar *in vitro* em células neuronais, hepatobiliares, pancreáticas, endoteliais, do músculo liso, adipócitos,

condroblastos e osteoblastos (BIEBACK et Al., 2004; KOGLER et Al., 2004; MCGUCKIN & FORRAZ, 2006;).

Na medicina veterinária equina ainda são poucos os estudos sobre as células-tronco do sangue de cordão umbilical e seu armazenamento comercial para futuros transplantes autólogos. No entanto CTMs do cordão umbilical equino foram isoladas, utilizando-se amostras a fresco colhidas no momento do parto, pela primeira vez em 2007. Estas células apresentaram rápida aderência à placa de cultivo e expansão, morfologia fibroblastóide, e foram eficientemente diferenciadas *in vitro* em osteócitos, condrócitos e adipócitos (KOCH et Al., 2007). Foi demonstrado que uma população de CTMs do sangue de cordão umbilical equino colhidos ao nascimento, expressaram os marcadores de pluricelularidade Oct-4, SSEA,-I, Tra I-60 e Tra I-8. Estas células também foram diferenciadas para condrócitos, osteócitos, hepatócitos, adipócitos e miócitos (REED & JOHNSON, 2008).

Ao comparar o potencial condrogênico de CTMs do sangue do cordão umbilical e da medula óssea de equinos, observou-se que ambas foram capazes de se diferenciar em condrócitos, coradas positivamente para proteoglicanos e expressando marcadores para cartilagem. No entanto as células de origem no sangue de cordão umbilical apresentaram alteração morfológica para cartilagem hialina em menor tempo (6 dias). Já, a expressão de colágeno tipo II, aggrecan, CD-RAP e Sox9 foi alta em ambos os tipos celulares utilizados (Berg et Al., 2009).

Schuch e colaboradores (2009) demonstraram que em 80% das 79 amostras de sangue de cordão umbilical equino, colhidas no momento do parto, as células foram isoladas, expandiram e foram capazes de diferenciação *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Os autores sugerem que a utilização de fibronectina nas placas de cultivo e a redução da tensão de oxigênio de 20% para 5% na estufa melhoram a taxa de isolamento destas células, e ainda que a senescência das mesmas é atingida após a vigésima passagem.

3.4.4.3.2 Células-Tronco Derivadas da Matriz Extravascular do Cordão Umbilical

O cordão umbilical é recoberto pelo epitélio amniótico que protege uma matriz gelatinosa e elástica de mucopolissacarídeos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina) chamada de "Wharton's Jelly" após sua descrição por Thomas Wharton

em 1856. O âmnion e a gelatina de Wharton protegem três importantes vasos sanguíneos, essenciais para o desenvolvimento do feto: um grande vaso sanguíneo que supre o desenvolvimento fetal com sangue placentário, rico em nutrientes e oxigênio e dois vasos menores, que retornam o sangue fetal, com dióxido de carbono, resíduos e outras toxinas (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

Muitos estudos da medicina humana têm reportado a possibilidade de obtenção de CTMs não apenas do sangue do cordão umbilical, como também da gelatina de Wharton. Em 1991 a possibilidade de isolamento de células fibroblastóides derivadas da gelatina de Wharton foi relatada pela primeira vez. A academia francesa de medicina, em 2010, relatou que consideram as pesquisas com células derivadas do cordão umbilical extremamente promissoras, podendo fornecer novas ferramentas para o tratamento de inúmeras doenças (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

Um simples fragmento de 5 a 10 mm³ de gelatina de Wharton tem o potencial de render a produção de mais de um bilhão de CTMs em 30 dias (DEGOUL et Al. apud Forraz & McGuckin, 2010). Considerando-se o tamanho médio do cordão umbilical de humanos de 50cm e, o ainda mais longo cordão umbilical equino, pode-se prever que esta fonte será cada vez mais clinicamente relevante com os avanços das pesquisas médicas e veterinárias.

Recentemente inúmeros estudos da medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação das células derivadas do tecido extravascular do cordão umbilical em células da pele, ósseas, endoteliais, hepáticas e em linhagens neurogênicas (XU et Al., 2010; CABALLERO et Al., 2010; ZHANG, LIE & WEI, 2009; ZHANG & FAN, 2010).

A medicina veterinária equina também tem demonstrado interesse nesta fonte de CTMs. O Isolamento e cultivo de CTMs obtidas da gelatina de Wharton de cordões umbilicais equinos foram realizados com sucesso. A tabela abaixo demonstra as principais observações realizadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de CTMs derivadas da gelatina de Wharton equina na última década (QUADRO).

QUADRO 3 3: Autores e principais observações relatadas no estudo do isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas da matriz extra vascular do cordão umbilical equino na última década

Autores	Principais observações
Hoynowski et Al., 2007	Morfologia fibroblastóide, expressão de Oct-4, SSEA-4 e c-kit, c-Myc, CD54, CD90, CD105, CD46, não expressão de CD34, CD45 e CD133. Diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica.
Cremonesi et Al., 2008	Alta taxa de proliferação, expressão de Oct-4 e Sox-2, formação de esferas 3D de aglomerado celular durante o cultivo.
Passeri et Al., 2009	Suplementação com EGF promoveu aumento considerável na taxa de proliferação sem afetar a diferenciação condrogênica e adipogênica e aumentou a deposição de cálcio na diferenciação osteogênica.
Lovati et Al., 2011	Comparou CTMs da medula óssea, tecido de cordão umbilical (TCU) e líquido amniótico (LA). Expressão de CD105, CD29, CD44 e ausência de expressão CD34, Oct-4, SSEA-4, TRA-I-60. Mesma capacidade de diferenciação osteogênica. Células da MO e LA: taxa de proliferação mais altas do que MCU.
Martino et Al., 2011	Suplementação com Cálcio ou Calciomimético NPS R-476 aumentou consideravelmente a taxa de proliferação.

Capítulo 2

Artigo científico a ser enviado para a revista “Veterinary Research Communication”

Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais

De Vita, B.^{1*}; Campos, L.L.¹; Listoni, A.J.¹; Maia, L.¹; Martin, I.¹; Freitas, N.P.P.¹; Sudano, M.J.¹; Curcio, B.R.²; Golim, M. A.³; Laufer-Amorin, R.¹; Landim-Alvarenga, F.C.¹; Prestes, N.C.¹.

*bruddev@gmail.com

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP Brasil

²Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil

³Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu/SP – Brasil

Resumo: O interesse nas pesquisas com células-tronco obtidas dos anexos fetais de diversas espécies aumentou muito nas últimas décadas em virtude de serem fontes de células-tronco adultas com potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares, sem riscos de desenvolvimento de tumores malignos ao serem transplantadas e com a vantagem de possibilitar bancos de armazenamento, no entanto, os estudos para espécie equina ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas do líquido amniótico equino obtidas do terço inicial, médio e final da gestação (LA-CTMs) e comparando suas características. Foram obtidas 23 amostras de líquido amniótico dos terços inicial, médio e final da gestação as quais foram submetidas às análises morfológica, imunocitoquímica, imunofenotípica por citometria de fluxo e às diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*. Todas as amostras demonstraram adesão ao plástico e morfologia fibroblastóide. No ensaio imunocitoquímico as células de todos os grupos foram imunomarcadas para CD44, PCNA e vimentina com ausência de marcação para citoqueratina e Oct-4. Na citometria de fluxo observou-se a expressão de CD44 e CD90 e ausência de expressão de CD34, sendo que a expressão de CD44 e CD90 apresentaram um padrão decrescente durante os períodos gestacionais. As amostras obtidas de todos os momentos gestacionais foram capazes de diferenciar-se nas 3 linhagens celulares estudadas. Estes resultados demonstram que CTMs podem ser isoladas do líquido amniótico equino obtido de todas as fases gestacionais, apresentando-o como uma fonte vantajosa de CTMs também para a medicina veterinária equina, no entanto mais pesquisas devem ser realizadas, principalmente quanto à expressão de marcadores de pluripotencialidade (como o Oct-4) e ao potencial de diferenciação das mesmas em linhagens extra mesodermiais já relatados na literatura.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, anexos fetais, imunocitoquímica, citometria de fluxo.

Introdução

O líquido amniótico é formado por uma grande quantidade de células, de origem embrionária ou extra-embrionária, em suspensão. Esta população celular varia com a fase gestacional e traduz as mudanças ocorridas no feto e seus anexos, estando bastante vinculada com a maturidade fetal (Gosden, 1983). As células apresentam tamanho variável de 6 a 50 µm, e morfologia também variável de escamosas a arredondadas (Bydlowski et Al, 2009).

A detecção de células progenitoras no líquido amniótico humano foi inicialmente relatada em 1993 quando células arredondadas, pequenas e nucleadas, foram encontradas antes da 12ª semana de gestação e identificadas como progenitoras hematopoiéticas, possivelmente provenientes da vesícula vitelínica (Torricelli et Al., 1993). Hoje, sabe-se que três tipos celulares são encontrados no líquido amniótico: Células Epitelióides (E), com origem na pele e trato urinário do feto; Células Amnióticas (AF) propriamente ditas, originadas nas

membranas placentárias e trofoblasto (produtoras de estrógenos, progesterona e gonadotrofina coriônica humana); e Fibroblatóides (F), originadas dos tecidos conjuntivos, apresenta características e marcadores para CTMs e devem ser chamadas de CTMs derivadas do líquido amniótico (Gucciardo et Al., 2008). As células dos tipos AF e E aparecem no início do cultivo enquanto as células F aparecem posteriormente, porém somente AF e F persistem enquanto as células do tipo E regridem com o passar do tempo (Prusa & Hengstschlager, 2002).

A descoberta das CTMs derivadas do líquido amniótico humano, na última década, demonstrando a expressão do marcador de pluripotência Oct-4, alta capacidade de proliferação e potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares, iniciou um novo e promissor campo na pesquisa de células-tronco (Siegel et Al., 2007). Tsai e colaboradores (2004) relataram a expressão de Oct-4 e a diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e neurogênica de CTMs obtidas do líquido amniótico colhido no quarto mês de gestação de mulheres submetidas a amniocentese para avaliação citogenética do feto. No mesmo ano, Prusa e colaboradores relataram a expressão esporádica de marcadores neurogênicos pelas LA-CTMs e que esta expressão aumentou consideravelmente após o cultivo destas células sob meio de indução de diferenciação neurogênica. Em 2006, Tsai e colaboradores confirmaram a expressão de marcadores neurogênicos antes e após a indução da diferenciação e relataram ainda a expressão de mais um marcador de pluripotência, o NANOG-.

Muitos outros estudos descreveram a expressão de Oct-4 (YOU et Al., 2009; STEIGMAN et Al., 2009; PHERMTHAI et Al. 2010) e capacidade de diferenciação em muitas linhagens celulares (DE COPPI et Al., 2007; PEISTER et Al., 2008; ANTONUCCI et Al., 2009; CABRAL et Al., 2009) tais como osteogênica, condrogênica, adipogênica, miogênica, neurogênica, endotelial e Hepática das CTMs do líquido amniótico humano. Além disso, as células não apresentaram alterações em seu cariótipo após o cultivo (CABRAL et Al., 2009), não induziram a formação de tumores quando foram transplantadas (YOU et Al., 2009; PHERMITHAI et al., 2010) e apresentaram 80% de viabilidade após 5 meses de criopreservação (STEIGMAN et Al., 2008). Apesar da grande maioria das pesquisas serem realizadas com amostras colhidas durante a amniocentese para ensaio citogenético dos fetos no quarto mês de gestação, estudos realizados com amostras colhidas durante a cesariana a termo obtiveram o mesmo padrão de resultados (YOU et Al., 2009; STEIGMAN et Al., 2009).

Na medicina veterinária equina, o isolamento e caracterização de CTMs derivadas do líquido amniótico colhido durante o parto foram descritos recentemente. A população de células do líquido amniótico demonstrou ter maior taxa de crescimento e proliferação do que populações do que CTMs da medula óssea e do tecido extra vascular do cordão umbilical. Estas células apresentaram capacidade de diferenciação para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, bem como outra característica marcante: a expressão de marcadores de pluripotência como o Oct-4 (Lovati et Al., 2011). CTMs do líquido amniótico equino foram também isoladas com sucesso, demonstrando grande capacidade de proliferação, apresentando a expressão de marcadores típicos de CTMs e capacidade de diferenciação em três diferentes linhagens celulares (Park et Al, 2011).

Os resultados encontrados na medicina humana indicando as CTMs do líquido amniótico indicando-as como uma fonte providencial e conveniente na formação de bancos de armazenamento e a escassez de estudos encontrados na medicina veterinária equina sobre este assunto motivaram a realização do presente estudo visando a otimização do isolamento, cultivo *in vitro* e o estudo das características das CTMs do líquido amniótico equino para utilizá-las como instrumento da medicina veterinária regenerativa. Sendo assim, o

objetivo deste trabalho foi isolar, cultivar, caracterizar imunofenotipicamente e avaliar a capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica de CTMs derivadas do líquido amniótico equino obtidos dos terços inicial, médio e final da gestação comparando os resultados encontrados entre os grupos estudados.

Material e Métodos

Colheita das amostras

Vinte e três amostras de líquido amniótico de éguas sem raça definida foram colhidas em matadouros comerciais localizados na cidade de São Gabriel/ RS (30°46'42" S, 54°52'50" O) e Araguari/MG (18°39'4" S, 48°11'7" O). Os úteros foram abertos e a partir da exposição do âmnio, amostras de 15 mL de líquido amniótico foram aspiradas com seringa agulhada estéril.

Durante as colheitas, realizou-se a mensuração da distância céfalococcígea (CC) de todos os fetos para realização da divisão das amostras de acordo com a idade gestacional (IG) segundo equação $IG = 22,623 + 4,2528 CR - 0,0124 CC^2$ sugerida por Naves et Al (2008). Consideraram-se as amostras de terço inicial (TI) de gestação àquelas obtidas de gestações de até 112 dias; de terço médio de gestação (TM) as amostras de 113 dias até 224 dias; e de terço final de gestação (TF) as amostras de 225 dias em diante. As mensurações totalizaram em TI: 8 amostras, TM:10 amostras e TF: 5 amostras.

Após a colheita, todas as amostras foram transferidas para tubos de centrífuga estéreis, armazenados e transportados a 5°C por até 72 horas até o laboratório localizado na cidade de Botucatu/SP (22°53'09"S, 48°26'42"O) no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botutainer® (Botupharma, Botucatu, Brasil).

Isolamento e cultivo

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram centrifugadas a 1750 RPM/10 min, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspensionado em 4 mL do meio composto por 40% de DMEM baixa glicose, 40% de F12, 20% de soro fetal bovino, anfotericina B, estreptomicina e penicilina (Gibco, Carisbad, USA). Cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 2mL e cultivadas em frascos de cultivo de 25cm³ (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha), em estufa com 90% de umidade e 5% de CO₂ a 37,5°C. As amostras em cultivo foram suplementadas com meio inicialmente a cada cinco dias. Após a adesão das células, os meios foram trocados a cada 48-72 horas e as passagens foram realizadas quando do alcance de 80% de confluência. Para isto, as monocamadas foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS, foram adicionados 2 mL de TrypLE™ Express (Invitrogen, Carisbad, USA) e os frascos de cultivo mantidos na estufa por 5 minutos. Após a confirmação de que a dissociação entre as células havia ocorrido, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes no meio citado para completa remoção da tripsina. Os "pellets" foram então ressuspensionados em 10 mL de meio e divididos em duas alíquotas e recolocados em dois novos frascos de cultivo com 5mL cada.

Imunocitoquímica

Após a passagem, as amostras foram cultivadas em placas 24 wells no meio de cultivo citado por 48 horas, quando apresentaram adesão e morfologia fibroblásticoide. As células foram então fixadas (paraformaldeído 4%)

e permeabilizadas (Saponina) com Fix & Perm fixation and permeabilization Kit (Invitrogen, Carisbad, USA), lavadas 3 vezes com PBS, incubadas com solução de leite desnatado a 3% por 1 hora para o bloqueio de proteínas inespecíficas, lavadas 3 vezes em PBS novamente e incubadas por 18 horas a 5°C com os anticorpos primários monoclonais *mouse anti horse* CD44, *mouse anti human* PCNA, vimentina e citoqueratina, e policlonal *goat anti Oct-4*. Os anticorpos primários foram detectados por meio da incubação com os anticorpos secundários ligados a peroxidase (Advance, Dako, USA), exceto para o Oct-4, para o qual foi utilizado o anticorpo secundário anti *goat* por 30 minutos e o complexo ABC Kit Vectastain (Vector Laboratories Inc., CA, USA). As reações foram reveladas utilizando-se solução de substrato cromogênico - DAB por 5 minutos (Liquid DAB Cromogen® – DakoCytomation – CA, USA).

Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo as amostras foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS. As amostras foram divididas em alíquotas e incubadas com os anticorpos, anti-CD90 e anti-CD34 conjugados com a sonda FITC e com o anticorpo primário anti-CD44 por uma hora, seguida da incubação com o anticorpo secundário conjugado com a sonda PE ou FITC por mais uma hora. Duas amostras de cada terço gestacional foram analisadas no citômetro FACS Calibur BD®. Foram realizados os controles de autofluorescência das células e controle negativo para o CD44.

Diferenciação

Osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, as amostras foram cultivadas em placas 6 “well”. Quando as mesmas apresentaram cerca de 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Alizarin Red 2% e pH 4,2 (Sigma, USA) por 3 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de depósitos de matriz de cálcio, corados em vermelho.

Adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as monocamadas foram cultivadas em placas 6 “well” e quando as mesmas apresentavam 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (StemPro Adipogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 10 a 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguida de duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Oil Red O (Sigma, USA) por 50 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação gotículas de lipídeo intracitoplasmático, corados em vermelho.

Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as monocamadas foram tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células. O cultivo foi realizado em tubos de centrífuga e os “pellets” foram mantidos por 24-48 horas no meio de manutenção quando o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco). Os meios foram trocados a cada 48-72 horas por 14 dias, e então foram fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para realização dos cortes para formação de três lâminas por amostras, as quais foram coradas com HE, Alcian Blue e Azul de Toluidina. As lâminas foram então observadas por microscopia de luz para avaliação da morfologia, presença de nódulos celulares entremeados por uma matriz extracelular de glicosaminoglicanos que podem ser especificamente detectadas pelas colorações Alcian Blue e Azul de Toluidina.

Análise Estatística

Para análise estatística, a variável dependente binomial expressão das marcações (CD34, CD90 e CD44) na citometria fluxo dos diferentes grupos (terço inicial, médio e final da gestação) foi analisada por meio do teste de Regressão Logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o LSD com o comando LSMEANS PDIF do PROC GLM do SAS. Fontes de variação no modelo incluindo os diferentes grupos experimentais foram consideradas como efeito fixo. Como efeito aleatório adotou-se os animais (grupo). Os resultados estão apresentados como porcentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Morfologia

Todas amostras apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide. As amostras provenientes do terzo inicial, médio e final apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide em 7 dias em média e permaneceram em cultivo primário por aproximadamente 21 dias, quando alcançaram confluência de 80% e as passagens foram realizadas (Fig.1).



Fig.1: Cultivo primário de células aderentes com morfologia fibroblastóide derivadas do líquido amniótico equino colhidos de úteros grávidos de terzo inicial (A), médio (B), final (C) de gestação aos 7 dias de cultivo.

Imunocitoquímica

Todas as amostras dos períodos gestacionais foram avaliadas e apresentaram imunomarcção para os anticorpos anti CD44, PCNA e vimentina e ausência de marcação para os anticorpos anti citoqueratina e Oct-4. Todas as amostras estavam em terceira passagem (P3) (Fig.2).

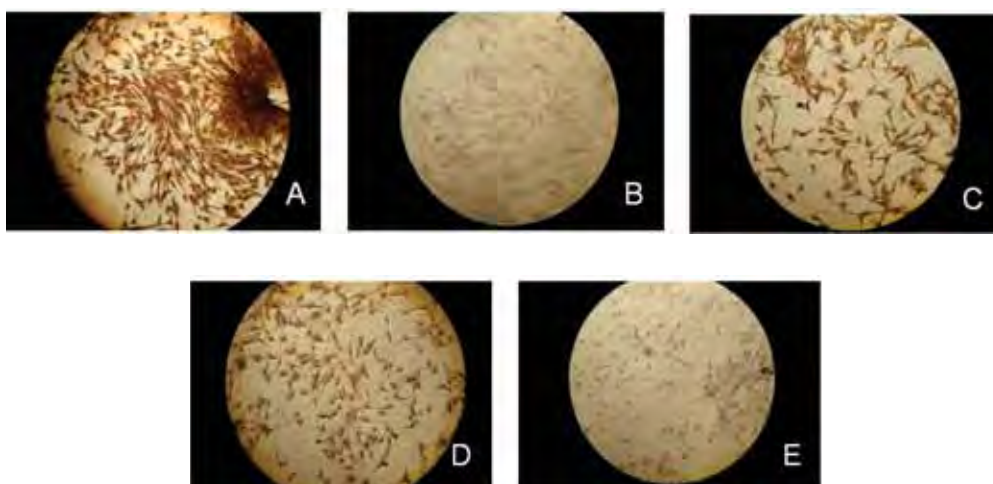


Fig.2: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas amostras líquido amniótico equino, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).

Citometria de fluxo

Todas as amostras dos períodos gestacionais avaliadas apresentaram expressão de CD44, expressão de CD90 e ausência de expressão do CD34. Os marcadores CD44 e CD90 demonstram padrão de expressão decrescente durante as fases gestacionais conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44 de células fibroblastóides derivadas do líquido amniótico equino colhido no terço inicial, médio e final da gestação.

Marcação	Grupo Terço Inicial	Grupo Terço Médio	Grupo Terço Final	Valor de P
CD34	2,0	1,8	2,7	0,8686
CD90	96,5 ^a	68,9 ^b	34,3 ^c	<0,0001
CD44	96,6 ^a	91,7 ^b	86,9 ^{ab}	0,0337

^{a,b,c} Letras sobrescritas incomum na mesma linha diferem ($P < 0,05$). N = 20.000.

A expressão dos marcadores CD44, CD90, CD34 e os controles negativo do CD 44 e de autofluorescência das células fibroblastóides do líquido amniótico estão representadas nos gráficos da figura 3 a seguir.

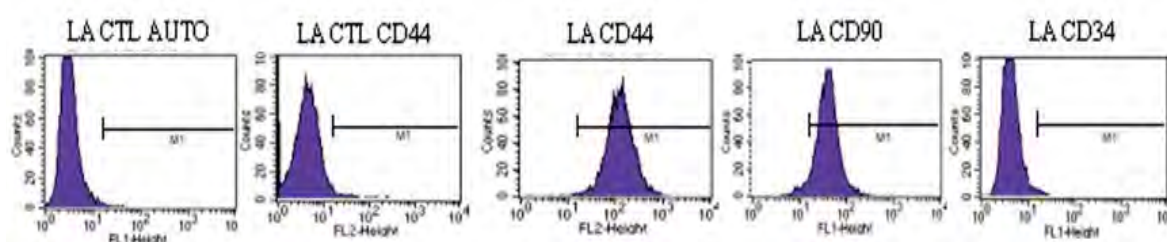


Fig.3: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas de líquido amniótico (LA) equino colhido no terço inicial da gestação. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.

Diferenciação

Todas as amostras dos períodos gestacionais apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. As amostras estavam em segunda passagem (P2). Não foram observadas diferenças na capacidade de diferenciação entre as amostras obtidas do terço inicial, médio e final da gestação.

O cultivo das LA-CTMs realizado em meio indutor de diferenciação osteogênica por 14 dias resultou na produção de cristais de cálcio extracelular identificados em vermelho pela coloração Alizarin Red (Fig.4A).

As LA-CTMs cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica por 14 dias apresentaram mudanças morfológicas tornando-se arredondadas e apresentaram o acúmulo de gotículas lipídicas em seu citoplasma coradas em vermelho pela coloração Oil Red O (Fig.4B e C).

A análise histológica do cultivo em 3D das LA-CTMs sob meio indutor diferenciação de condrogênica por 14 dias apresentou células arredondadas cercadas de matriz de glicosaminoglicanos (coradas em vermelho pela coloração HE, em azul pela coloração Alcian Blue e pelo fenômeno de metacromasia observado pela coloração Azul de Toluidina (Fig.4D, E e F).

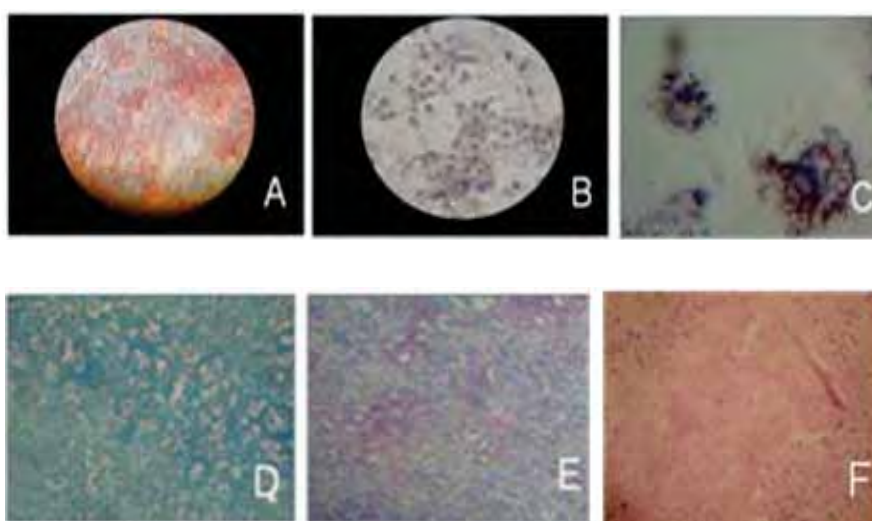


Fig.4: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas do líquido amniótico equino nas linhagens osteogênica observando-se depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina e em vermelho pela coloração HE.

Discussão

A busca de novas fontes de células-tronco mesenquimais como alternativa à medula óssea foi crescente na última década principalmente na medicina humana. Neste sentido, os anexos fetais destacaram-se por serem fontes de fácil obtenção, de colheita não invasiva quando realizada ao nascimento e com grande possibilidade de formação de bancos de armazenamento na medicina humana (Fauza, 2004; Gucciardo 2008) e veterinária (Cremonesi et Al., 2011). No entanto, os estudos sobre a identificação de células-tronco mesenquimais

derivadas do líquido amniótico equino são raros tendo sido relatados apenas por Lovati e colaboradores e Park e colaboradores, ambos em 2011, utilizando amostras colhidas durante o parto.

Visando o surgimento de novos modelos terapêuticos para medicina veterinária regenerativa, principalmente para lesões dos cavalos atletas, nosso trabalho teve o objetivo de identificar CTMs derivadas do líquido amniótico equino colhido em diferentes momentos gestacionais e comparar suas características, bem como contribuir para otimização do isolamento, caracterização e diferenciação *in vitro* das mesmas. Os resultados deste estudo demonstraram que células-tronco mesenquimais podem ser isoladas do líquido amniótico colhido em qualquer fase da gestação equina. Sendo assim, estes resultados estão de acordo com Steigman et Al., 2009 e You et al., 2009 que demonstraram que as CMTs do líquido amniótico do último terço gestacional de mulheres obtidos durante cesariana de fetos a termo, e não somente amostras obtidas do segundo terço gestacional, podem ser isoladas e cultivadas com sucesso.

As amostras de todos os grupos estudados apresentaram morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico corroborando com os achados de Tsai et Al. 2004 e You et Al., 2009 na medicina humana, com Uranio et Al., 2011 na medicina veterinária canina e ainda, com Park et Al. (2011) e Lovati et Al (2011) na medicina veterinária equina. Porém, tivemos uma dificuldade inicial no isolamento destas células a qual foi superada diminuindo-se o volume de meio utilizado no cultivo primário de 5mL para 2mL (deixando as células em suspensão mais próximas da superfície plástica do frasco de cultivo) e aumentando-se o tempo para a realização da primeira troca de meio de dias para 7 dias (evitando-se o descarte de células com capacidade de aderência que ainda estivessem em suspensão).

Na análise imunocitoquímica realizada na placa de cultivo observou-se a marcação positiva para CD44 e Vimentina e para o marcador de proliferação celular PCNA e ausência de marcação para Citoqueratina confirmando a origem mesenquimal e potencial de proliferação de todos os grupos colhidos no período gestacional, mantendo-se a morfologia característica das células. A ausência de marcação para Oct-4 discorda do encontrado na literatura tanto humana (Prusa et Al.2004, Tsai et Al., 2004; You et Al., 2009), quanto veterinária equina (Park et Al., 2011 e Lovati et Al., 2011), porém está de acordo com Uranio et Al., 2011 que relata a ausência de expressão em CTMs derivadas do líquido amniótico canino.

É conhecido que no líquido amniótico encontra-se uma mistura de células e que as células com características epiteliais são aquelas com maior tendência a expressar os marcadores de pluripotência (Gucciardo et Al., 2008). Com o avançar do tempo de cultivo, estas células tendem a ser eliminadas, permanecendo aquelas com características fibroblastóides. No entanto, no presente experimento a avaliação foi realizada somente após a terceira passagem, desta forma, o número de passagens realizadas pode ter sido responsável pela eliminação, da população celular com características pluripotentes. Além disso, deve-se considerar ainda que a metodologia utilizada neste experimento difere da descrita na literatura e por ser uma avaliação qualitativa a observação de uma subpopulação positiva para Oct-4 pode ter sido prejudicada, sugerindo a necessidade de uma avaliação mais acurada, quantitativa como a citometria de fluxo. Entretanto, alguns autores alertam para o fato da detecção do sinal de *Oct-4* e até de proteínas semelhantes ao *Oct-4* serem resultado da transcrição de pseudogenes semelhantes a este fator e não do *Oct-4* propriamente dito (Liedtke et Al., 2007).

Na avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, todas as amostras avaliadas demonstraram expressão de CD44 (TI: 96,61%^a; TM: 91,68%^b e TF: 86,85%^{ab}), de CD90 (TI: 96,56%^a; TM: 68,85%^b e TF: 34,26%^c) e ausência de expressão do marcador de células hematopoiéticas CD34: (TI: 1,95%; TM: 1,83% e TF: 2,74%) corroborando com os resultados obtidos em humanos (Steigmann et Al., 2008; You et Al., 2009; Phermtai et Al., 2010) e com a caracterização imunofenotípica das CTMs equinas sugeridas por De Schauwer (2011) e apresentadas por Park et Al. (2011) e Lovati et Al. (2011) na avaliação de CTMs derivadas do líquido amniótico equino colhido no momento do parto. O CD90 tem sido considerado um dos principais marcadores de células-tronco hematopoiéticas (Mestas e Hughes, 2004; Majeti et Al., 2007; Boitano et Al., 2010), reconhecendo também CTMs (Masson et Al., 2006), queratinócitos (Nakamura et Al., 2006) e células progenitoras endometriais (Gargett, 2006).

As maiores porcentagens de expressão do CD90 e do CD44 durante os períodos mais iniciais da gestação equina podem refletir as mudanças fisiológicas observadas durante a gestação e uma maior indiferenciação das CTMs nas fases iniciais da gestação equina. Este achado pode indicar as fases iniciais da gestação como melhor momento de colheita de amostras para obtenção de CTMs para formação de bancos de armazenamento de células, no entanto não inviabilizam a colheita nos fases finais da gestação e no momento do parto. Este aspecto ainda precisa ser melhor estudado, uma vez que de acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que compara as características de células tronco obtidas do líquido amniótico em diferentes momentos da gestação na espécie equina.

Uma das propriedades biológicas mais importantes na caracterização das CTMs é a capacidade destas células em se diferenciarem em pelo menos 3 tecidos da linhagem mesenquimal. Desta forma, no presente experimento as amostras de todos os grupos estudados apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica quando expostas aos respectivos meios indutores de diferenciação por 14 dias. Não foram observadas diferenças quanto a deposição de cálcio extra-celular, formação de gotículas de lipídeos intracitoplasmáticos e formação de matriz de glicosaminoglicanos entre os períodos gestacionais estudados, já que metodologia utilizada não permitiu uma quantificação destes fatores. Pequenas diferenças quanto a estes fatores foram subjetivamente observadas entre as amostras, independentemente das fases gestacionais das quais eram provenientes. Estes resultados estão de acordo com os achados encontrados por Park et Al. (2011) e Lovati et Al. (2011). Este último grupo relatou que a capacidade de diferenciação condrogênica das CTMs derivadas do líquido amniótico equino foi menor do que a observada em CTMs derivadas da medula óssea e do tecido extra-vascular de cordão umbilical, no entanto, o mesmo tipo de comparação não foi realizado em nosso experimento.

Conclusões

Podemos concluir as células fibroblastóides derivadas do líquido amniótico equino colhidas em qualquer fase gestacional possuem características morfológicas e imunofenotípicas de células-tronco mesenquimais, além de capacidade de diferenciação in vitro nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, apresentando-se como uma fonte vantajosa, não invasiva e com a possibilidade de formação bancos de armazenamento ao nascimento para a medicina veterinária equina para sua futura utilização em terapias regenerativas.

As amostras colhidas em períodos gestacionais foram avaliadas apenas como instrumento de pesquisa, já que a amniocentese durante a gestação não é uma indicação de rotina para a espécie equina, dificultando sua

aplicabilidade a campo. No entanto, amostras colhidas em matadouros comerciais podem constituir uma excelente fonte para formação de bancos. Além disto, o sucesso no isolamento de CTMs derivadas do líquido amniótico de amostras transportadas refrigeradas a 5°C por até 72 horas pode viabilizar a colheita a campo e envio do material para o processamento em centros especializados.

Novos estudos quanto à expressão de marcadores de pluripotência como Oct-4, quanto à capacidade de diferenciação in vitro em linhagens extra-mesodermas das LA-CTMs e quanto ao uso autólogo e heterólogo destas células em terapias regenerativas devem ser realizados.

Agradecimentos

Às agências Fapesp, Fundunesp e Capes pelo apoio financeiro, Frigoríficos Pomar (Araguari-MG) e Frigorífico Foresta (São Gabriel-RS) pela colaboração na execução desta pesquisa.

Referências

ANTONUCCI, I.; IEZZI, I.; MORIZIO, E.; MASTRANGELO, F.; PANTALONE, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; GIGANTE, A.; SALINI, V.; CALABRESE, G.; TETÈ, S.; PALKA, G.; STUPPIA, L. Isolation Of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step cultura protocol. **BMC Biotechnol.**, n.9, p. 1-9, 2009.

BOITANO, A.E.; WANG, J.; ROMEO, R.; BOUCHEZ, L.C.; PARKER AE, SUTTON SE, WALKER JR, FLAVENY CA, PERDEW GH, DENISON MS, SCHULTZ PG, COOKE MP. aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. **Science**, v. 329 (5997), p. 1345–8, 2010.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; DUARTE, S.A.; JANZ, F.L.; CAVAGLIERI, R.C.; MASELLI, L.M. Células-tronco do líquido amniótico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, p. 45-52, 2009.

CABRAL A.C.V.; ÂNGELO, P.C.; LEITE, H.V.; PEREIRA, A.K.; LPOES, A.P.B.M.; OLIVEIRA, M.B.; BORGES, K.B.G.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células-tronco de líquido amniótico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.54, n. 6, p. 489-493, 2009.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE, C.A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology**, v.75, n.8, p.1400-1415, 2011.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R.; SOON, A.V. Markers os stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v.75, p.1431-1443, 2011.

FAUZA, D. Amniotic fluid stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v.18, n. 6, p. 877-891, 2004.

GARGETT CE Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 46 (3), p. 250–3, 2006.

GOSDEN, C.M. Amniotic fluid cell types and culture. **Br. Med. Bull.**, v.39, n.4, p.348-354, 1983.

GUCCIARDO, L.; LORIES, R.; OCHSENBEIRI-KÖLBLE, N.; DONE, E.; ZWIJSEN, A.; DEPREST, J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potencial use in perinatology and regenerative medicine. **Int. J. Obstet. Gynaecol.**, v.16, p.166-172, 2008.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; CONSIGLIO, A.L.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid- derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun.**, v.35, p.103-121, 2010.

MAJETI R, PARK CY, WEISSMAN IL Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. **Cell Stem Cell**, v. 1 (6), p. 635–4, 2007.

- MASSON NM, CURRIE IS, TERRACE JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, v. 291 (1), p. G45–54, 2006.
- MESTAS J, HUGHES CC Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol*, v. 172 (5), p. 2731–8, 2004.
- NAKAMURA Y, MUGURUMA Y, YAHATA T, MIYATAKE H, SAKAI D, MOCHIDA J, HOTTA T, ANDO K Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br. J. Dermatol*, v. 154 (6), p. 1062–70, 2006.
- NAVES, C.S.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; BELLETI, M.E.; OLIVEIRA, R. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. *Ciência Rural*. v.38, n.2, p.416-422. 2008
- PARK, S.B.; SEO, M.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *Cytotherapy*, v.13, n.3, p.341-349, 2011.
- PASSERI, S.; NOCCHI, F.; LAMANNA, R.; LAPI, S. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell. Biol. Int.*, v.33, p.100-105, 2009.
- PEISTER, A.; DEUTSCH, E.R.; KOLAMBBKAR, Y. HUTMACHER, D.W.; GULDBERG R.E. Amniotic fluid stem cells produce robust mineral deposits on biodegradable Scaffolds. *Tissue Eng. Part A*, v.15, p.3129-3138, 2008.
- PERMTHAI, T.; ODGLUN, Y.; JULAVIJITPHONG, S.; TITAPANT, V.; CHUENWATTANA, P.; VANTANASIRI, C.; PATTANAPANYASAT, K. A novel method to derive amniotic fluid stem cell for therapeutic purposes. *BMC Cell Biol.*, v.11, n.79, p.1-9, 2010.
- PRUSA, A.R.; HENGSTSCHLAGER, M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med. Sci. Monit.*, v.8, p. RA253-RA257, 2002.
- PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D. LUBEC, G. POLLACK, A.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, n.191, p.309-314, 2004.
- SIEGEL, N.; ROSNER, M.; HANNEDER, M.; VALLI, A.; HENGSTCHLÄGER, M. Stem Cells in Amniotic Fluid as New Tools to Study Human Genetic Diseases. *Stem Cell Rev.*, n.3, p.356-364, 2007.
- STEIGMAN, S.A.; ARMANT, M.; BAYER-ZWIRELLO, L.; KAO, G.S.; SILBERSTEIN, L.; RITZ, J.; FAUZA, D.O. Preclinical regulatory validation of 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. *J. Pediat. Surg.*, v.43, p.1164-1169, 2008.
- TORRICELLI, F.; BRIZZI, L.B; BERNABEI, P.A. Identification of hematopoietic progenitors cells in human amniotic fluid before 12th week of gestation. *Ital. J. Anat. Embryol.*, v.98, p.118-126, 1993.
- TAI M.S.; LEE, J.L.; CHANG, Y.J.; HWANG, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.*, v. 19, n. 6, p. 1450- 1456, 2004.
- URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study os amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. *Mol. Reprod. Dev.*, doi: 10.1002/mrd.21311, 2011.
- YOU, Q.; TONG, X.; GUAN,Y.; ZHANG, D.; HUANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. The biological characteristics of human third semester amniotic fluid stem cells. *J. Int. Méd. Res.*, v. 37, p. 105-112, 2009.

Capítulo 3

Artigo a ser enviado para a revista “Stem Cell and Development”**Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica equina obtida em três momentos gestacionais e no momento do parto.**

De Vita, B.^{1*}; Campos, L.L.¹; Listoni, A.J.¹; Maia, L.¹; Martin, I.¹; Freitas, N.P.P.¹; Sudano, M.J.¹; Curcio, B.R.²; Golim, A.M.³; Laufer-Amorim, R.¹; Landim-Alvarenga, F.C.¹; Prestes, N.C.¹.

*bruddev@gmail.com

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP Brasil

²Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil

³Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu/SP – Brasil

Resumo: A medula óssea é a fonte mais utilizada de células-tronco mesenquimais (CTMs) para os equinos, no entanto como o número destas células diminuiu com a idade, seu potencial terapêutico também declina com o tempo. Por isso, os anexos fetais têm sido reportados como fontes interessantes de CTMs para diferentes espécies, como alternativa à medula óssea e com a vantagem de ser colhidas ao nascimento e armazenadas para uso posterior. No entanto, estudos na espécie equina ainda são raros. O objetivo do presente estudo foi identificar, caracterizar e diferenciar CTMs da membrana amniótica (MA-CTMs) de equinos, colhidas em três momentos gestacionais (inicial, médio e final) e no momento do parto a termo e comparar suas características. As células foram recuperadas através da digestão enzimática dos fragmentos de tecido, realizada com solução de collagenase 0,4%. Foi obtido um total de 35 amostras de membrana amniótica as quais foram submetidas às análises morfológica, imunocitoquímica, imunofenotípica por citometria de fluxo e às diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*. As células das amostras de todos os momentos demonstraram adesão ao plástico e morfologia fibroblastóide. As MA-CTMs de todos os grupos foram imunomarcadas para CD44, PCNA e vimentina com ausência de marcação para citoqueratina e Oct-4; demonstraram alta expressão de CD44, expressão de CD90 e ausência de expressão de CD34; e foram capazes de diferenciação *in vitro* nas 3 linhagens celulares estudadas. Concluímos que a membrana amniótica representa uma interessante fonte de obtenção de CTMs também para a espécie equina, podendo ser colhida em qualquer fase gestacional e no momento do parto.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, anexos fetais, imunocitoquímica, citometria de fluxo.

Introdução

A membrana amniótica demonstra propriedades antiinflamatórias, antibióticas e de proteção às feridas. Estas propriedades, combinadas com a ausência ou baixa imunogenicidade, levaram ao uso clínico da membrana amniótica como curativo para queimaduras de pele, úlceras nos membros inferiores e diversas lesões oftálmicas. No entanto, nos últimos anos um novo foco de pesquisa quanto às células derivadas da membrana amniótica surgiu: Sua utilização na terapia celular e medicina regenerativa em transplantes alogênicos ou xenogênicos (1).

Na membrana amniótica estão presentes dois tipos celulares de diferentes origens: células epiteliais amnióticas derivadas do ectoderma embrionário e células amnióticas mesenquimais derivadas do mesoderma embrionário (2). As células epiteliais amnióticas humanas desenvolvem-se a partir do epiblasto, 8 dias após a fertilização e antes da gastrulação do embrião, possuindo portanto, a possibilidade de manter a plasticidade de células tronco embrionárias.

Células epiteliais amnióticas humanas foram isoladas e apresentaram marcadores de superfície característicos de células pluripotentes como NANOG e Oct-4 (2). Sob certas condições de cultivo estas formam estruturas esféricas de aglomerados celulares que preservam características de células-tronco embrionárias. Estas células possuem a vantagem de não necessitar de *feeder* como as células-tronco embrionárias e apesar de possuir capacidade de diferenciação *in vitro* nos tecidos endodermis (células do fígado e pâncreas), mesodermis (cardiomiócitos) e ectodermis (células neurais), não produziram tumores após o transplante em ratos (3).

As Células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas da placenta humana foram capazes de se diferenciar nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (4). Estes resultados

foram confirmados por Yen et al (5), que mostraram que as células-tronco derivadas da placenta apresentaram marcadores de superfície de CTMs e embrionárias como SSEA-4, TRA-1-61, TRA-1-80 e 9 também são capazes de sofrer diferenciação neurogênica. Os mesmos autores documentaram uma taxa proliferativa significativamente maior das células derivadas da placenta do que das células derivadas de medula óssea.

Ainda sobre humanos, recentemente estudos demonstraram o isolamento eficiente de CTMs da membrana amniótica, sendo que as mesmas expressaram marcadores de superfície característicos de células mesenquimais como CD44, CD90 e vimentina e não expressaram o marcador de células hematopoiéticas CD45 (6). Díaz-Prado e colaboradores (7) demonstraram que ambas as células epiteliais e as células mesenquimais da membrana amniótica apresentaram o perfil imunofenotípico e o potencial de diferenciação na maioria das linhagens mesodermis similares, propondo a utilização de células derivadas deste tecido como boas candidatas para a terapia celular e medicina regenerativa.

Apesar dos resultados obtidos em humanos demonstrarem a membrana amniótica como uma interessante fonte de células-tronco multipotentes, com a expressão de marcadores de pluripotência e diferenciação in vitro em tecidos mesodermis e extra mesodermis, os estudos com CTMs provenientes da membrana amniótica na medicina veterinária são raros. Uranio et Al. (8) relataram a expressão de Oct-4 CD44, CD184 e CD29 e que não foram encontradas expressões de marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 por CTMs isoladas da membrana amniótica canina e, recentemente, Lange-Consiglio et Al. (9) relataram que células isoladas tanto da porção epitelial como da porção mesenquimal da membrana amniótica equina, colhidas durante o parto, expressaram marcadores de pluricelularidade (TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4 e Oct-4), marcadores de CTMs (D29, CD105, CD44 e CD166, com ausência de expressão do CD34) e capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica, antes e após serem criopreservadas. As células da

porção epitelial apresentaram morfologia poligonal enquanto as células da porção mesenquimal apresentaram morfologia fibroblastóide. Estas células foram transplantadas alogenicamente em três cavalos com lesões tendíneas e resultaram em uma rápida redução do tamanho do tendão nas imagens ultrassonográficas, concluindo que esta fonte pode ser utilizada para a terapia celular.

O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica equina colhidas nos terços inicial, médio e final da gestação e no momento do parto, e ainda comparar as suas características, visando contribuir com a otimização do cultivo *in vitro* e do estudo das características das CTMs desta origem para sua futura utilização na medicina regenerativa equina.

Material e Métodos

Colheita

Um total de trinta e cinco amostras de membrana amniótica foi obtido. Vinte e três amostras provenientes das fases gestacionais foram colhidas de úteros gravídicos de éguas sem raça definida em abatedouros comerciais localizados nas cidades de Araguari-MG (18°39'4" S, 48°11'7" O) e São Gabriel-RS (30°46'42" S, 54°52'50" O). Após a abertura do útero e exposição da membrana amniótica foram colhidos fragmentos de aproximadamente 3cm² de áreas pouco vascularizadas. Outras doze amostras foram colhidas no momento do parto de 12 éguas da raça Puro Sangue Inglês no Haras Santa Maria de Araras localizado na cidade de Bagé-RS (29°47'01,63" S, 55°47'27,54" O).

Durante as colheitas em abatedouros comerciais realizou-se a mensuração da distância céfalococcígea (CC) de todos os fetos para realização da divisão das amostras de acordo com a idade gestacional (IG) segundo equação $IG = 22,623 + 4,2528 CR - 0,0124 CC^2$ sugerida por Naves et Al (10). Consideraram-se as amostras de terço inicial de gestação àquelas

obtidas de gestações de até 112 dias; de terço médio de gestação, as amostras de 113 dias até 224 dias; e de terço final de gestação as amostras de 225 dias em diante.

Após a colheita, as amostras foram lavadas com PBS e transferidas para tubos de centrífuga estéreis contendo 10 mL do meio de cultivo composto por DMEM baixa glicose, F12, soro fetal bovino, anfotericina B, estreptomicina e penicilina (Gibco,USA). Os tubos foram armazenados e transportados a 5°C por até 72 horas no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botutainer (Botupharma, Botucatu, Brasil), até o laboratório localizado em Botucatu-SP (22°53'09"S, 48°26'42"O).

As amostras foram divididas em 4 grupos de acordo com o momento da colheita: Terço Inicial da gestação (7 amostras); Terço Médio (10 amostras); Terço Final (5 amostras) da gestação e Momento do Parto (12 amostras).

Isolamento e cultivo

Ao chegar ao laboratório, as amostras foram lavadas em PBS e refragmentadas para facilitar a digestão enzimática em solução de collagenase a 0,4% (Invitrogen, USA). A solução foi filtrada em filtros de 70nm (BD, USA), centrifugadas a 1750 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado em 10 mL do meio composto por 40% de DMEM baixa glicose, 40% F12, 20% de soro fetal bovino, anfotericina B, estreptomicina e penicilina (Gibco, USA). Cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 5mL e cultivadas em frasco de cultivo de 25cm³ (Sarstedt, Alemanha), em estufa com 90% de umidade e 5% de CO₂ a 37,5°C.

Após a adesão das células, os meios foram trocados a cada 48-72 horas e as passagens foram realizadas quando do alcance de 80% de confluência. Para isto, as monocamadas foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS, foram adicionados 2 mL de TrypLETM Express (Invitrogen, USA) e os frascos de cultivo mantidos na estufa por 5 minutos. Após a

confirmação de que a dissociação entre as células havia ocorrido, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes no meio citado para completa remoção da tripsina. Os “pellets” foram então ressuspensos em 10 mL de meio e divididos em duas alíquotas e recolocados em dois novos frascos de cultivo com 5mL cada.

Imunocitoquímica

As amostras foram cultivadas em placas 24 wells no meio citado por 48 horas, quando apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide. As células foram então fixadas (paraformaldeído 4%) e permeabilizadas (Saponina) com Fix & Perm fixation and permeabilization Kit (Invitrogen, USA), lavadas 3 vezes com PBS, incubadas com solução de leite desnatado a 3% por 1 hora para o bloqueio de proteínas inespecíficas, lavadas 3 vezes em PBS novamente e incubadas por 18 horas a 5°C com os anticorpos primários monoclonais *mouse anti horse* CD44, *mouse anti human* PCNA, vimentina e citoqueratina, e policlonal *goat anti Oct-4*. Os anticorpos primários foram detectados por meio da incubação com os anticorpos secundários ligados a peroxidase (Advance, Dako, USA), exceto para o Oct-4, para o qual foi utilizado o anticorpo secundário anti *goat* por 30 minutos e o complexo ABC Kit Vectastain (Vector Laboratories Inc., USA). As reações foram reveladas utilizando-se solução de substrato cromogênico - DAB por 5 minutos (Liquid DAB Cromogen® – DakoCytomation, USA).

Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo as amostras foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS. As amostras foram divididas em alíquotas e incubadas com os anticorpos, anti-CD90 e anti-CD34 conjugados com a sonda FITC e com o anticorpo primário anti-CD44 por uma hora, seguida da incubação com o anticorpo secundário conjugado com a sonda FITC por mais uma hora. Duas amostras de cada grupo foram analisadas no citômetro FACS Calibur BD®

Diferenciação

Osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, as amostras foram cultivadas em placas 6 “well”. Quando as mesmas apresentaram cerca de 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Alizarin Red 2% com pH 4,2 (Sigma, USA) por 3 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de depósitos de matriz de cálcio corados em vermelho.

Adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as monocamadas foram cultivadas em placas 6 “well” e quando as mesmas apresentavam 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (StemPro Adipogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 10 a 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguida de duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Oil Red O (Sigma, USA) por 50 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação gotículas de lipídeo intracitoplasmático, corado em vermelho.

Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as monocamadas foram tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células. Os “pellets” foram mantidos por 24-48 horas no meio de cultivo quando o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco). Os meios foram trocados a cada 48-72 horas por 14 dias, e então foram fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para realização dos cortes para formação de três lâminas por amostras, as quais foram coradas com HE, Alcian Blue e Azul de Toluidina. As lâminas foram então observadas por microscopia de luz para avaliação da morfologia e presença de matriz de glicosaminoglicanos.

Análise Estatística

Para análise estatística, a variável dependente binomial expressão das marcações (CD34, CD90 e CD44) na citometria fluxo dos diferentes grupos (terço inicial, médio e final da gestação, e momento do parto) foi analisada por meio do teste de Regressão Logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o LSD com o comando LSMEANS PDIF do PROC GLM do SAS. Fontes de variação no modelo incluindo os diferentes grupos experimentais foram considerados como efeito fixo. Como efeito aleatório adotou-se os animais (grupo). Os resultados estão apresentados como porcentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Morfologia

Todas amostras estudadas apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia majoritariamente fibroblastóide. As amostras provenientes do terzo inicial,

médio, final e momento do parto apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide em 24 horas e alcançaram confluência de 80% em 48-72 horas, quando as passagens foram realizadas (Fig.1).

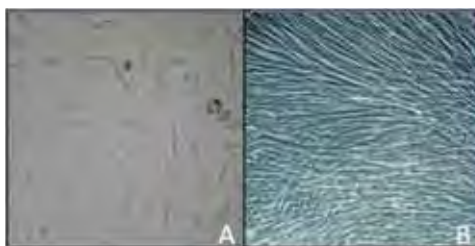


Fig.1: Adesão e morfologia fibroblastóide (A) e alcance de confluência (B) de células derivadas da membrana amniótica equina.

No cultivo primário, as amostras derivadas de membrana amniótica apresentaram frequentemente formações circunscritas de células com morfologia poligonal compatíveis com as células epiteliais de membrana amniótica derivadas do epiblasto do embrião em desenvolvimento (Fig.2).



Fig.2: Células com morfologia poligonal, circunscritas, frequentemente presentes no cultivo de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina.

Imunocitoquímica

Todas as amostras foram avaliadas e apresentaram imunomarcacão para os anticorpos anti CD44, PCNA e vimentina e ausência de marcação para os anticorpos anti citoqueratina e Oct-4. Todas as amostras estavam em terceira passagem (P3) (Fig.3).

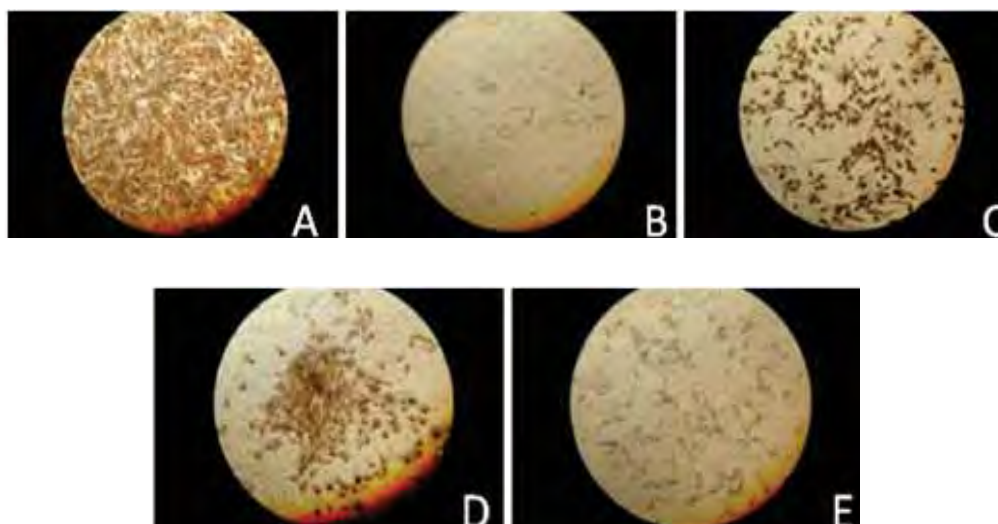


Fig.3: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas da membrana amniótica equina, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).

Citometria de Fluxo

Todas as amostras avaliadas apresentaram expressão de CD44, expressão de CD90 e ausência de expressão do CD34 conforme demonstrado na tabela 1.

TABELA 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44 de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina colhida no terço inicial, médio e final da gestação e no momento do parto.

Marcação	Grupo Terço Inicial	Grupo Terço Médio	Grupo Terço Final	Grupo Momento do Parto	Valor de P
CD34	3,4	3,2	1,1	5,7	0,3223
CD90	39,4	38,3	45,0	39,7	0,7528
CD44	74,5	83,8	86,0	85,5	0,1562

N = 20.000.

A expressão dos marcadores CD44, CD90, CD34 e os controles negativo do CD 44 e de autofluorescência das células fibroblastóides da membrana amniótica equina estão representadas nos gráficos da figura 4 a seguir.

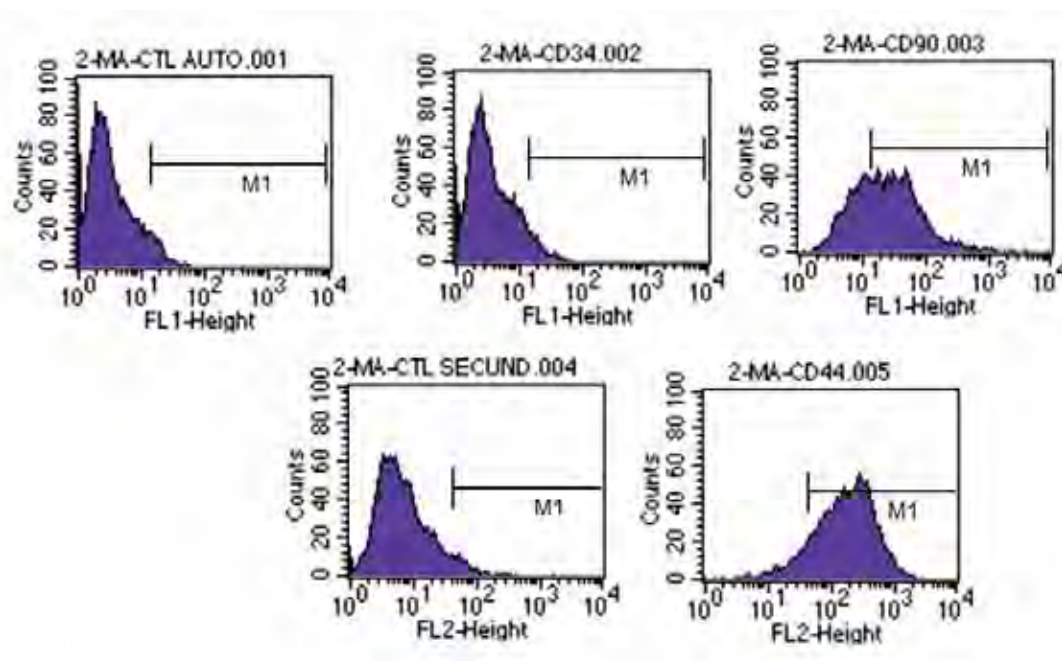


Fig.4: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas da membrana amniótica equina. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.

Diferenciação

Todas as amostras dos períodos gestacionais e momento do parto apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. As amostras estavam em segunda passagem (P2). Não foram observadas diferenças na capacidade de diferenciação entre as amostras obtidas do terço inicial, médio e final da gestação.

O cultivo das MA-CTMs realizado em meio indutor de diferenciação osteogênica por 14 dias resultou na produção de cristais de cálcio extracelular identificados em vermelho pela coloração Alizarin Red (Fig.5A)

As MA-CTMs cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica por 14 dias apresentaram mudanças morfológicas tornando-se arredondadas e apresentaram o acúmulo de

gotículas lipídicas em seu citoplasma coradas em vermelho pela coloração Oil Red O (Fig.5B).

A análise histológica do cultivo em 3D das MA-CTMs sob meio indutor diferenciação de condrogênica por 14 dias apresentou células arredondadas cercadas de matriz de glicosaminoglicanos, coradas em vermelho pela coloração HE, em azul pela coloração Alcian Blue e pelo fenômeno de metacromasia observado pela coloração Azul de Toluidina (Fig.5C,D e E).

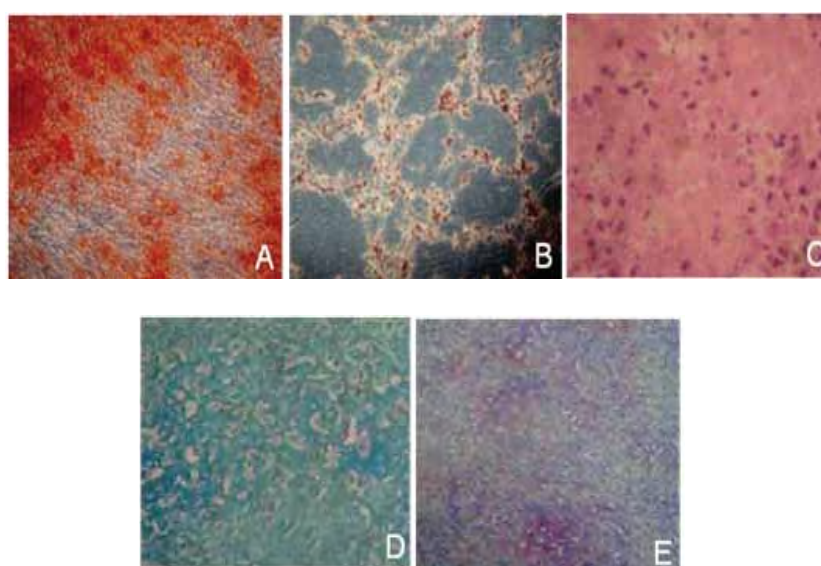


Fig.5: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas da membrana amniótica equina nas linhagens osteogênica observando-se depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina e em vermelho pela coloração HE.

Discussão

Os anexos fetais como o líquido amniótico, membrana amniótica, sangue do cordão umbilical e tecido extra-vascular do cordão umbilical surgiram na última década como fontes alternativas de células-tronco mesenquimais extramamente vantajosas para a medicina regenerativa humana (10, 11) e veterinária (8, 13). As vantagens relatadas são a colheita não

invasiva, indolor, de tecidos que são considerados como descarte após o parto. Além disso, a placenta é fundamental para a manutenção da tolerância feto-materna durante a gestação sugerindo que as células presentes no tecido placentário apresentam baixa imunogenicidade (14) com a grande possibilidade de formação de bancos de armazenamento de células derivadas de tecidos colhidos logo ao nascimento, para transplantes autólogos e heterólogos.

Muitos estudos foram realizados na última década quanto à presença de CTMs na membrana amniótica humana (2-5, 7). No entanto, Na literatura foi encontrado um único estudo realizado por Lange-Consiglio et Al (9) que relataram a caracterização e o potencial de aplicação de células progenitoras obtidas da membrana amniótica equina. Desta forma, com o objetivo de identificar CTMs derivadas da membrana amniótica equina, nosso trabalho visou colaborar para a otimização do isolamento, caracterização e diferenciação das mesmas. Neste estudo, avaliamos a obtenção de células-tronco mesenquimais obtidas de três fases gestacionais (TI, TM, TF) e do momento do parto (MP). O resultados encontrados neste estudo demonstram que CTMs podem ser isoladas da membrana amniótica equina colhida em qualquer fase gestacional e no momento do parto.

As amostras obtidas em todas as fases gestacionais e no momento do parto apresentaram células aderentes ao plástico com morfologia fibroblastóide em 24 horas de cultivo que alcançaram confluência de 80% em 48/72 horas de cultivo corroborando com os achados relatados nos estudos com células humanas (2-5,7) e em equinos (9). Além disto, as células frequentemente apresentaram formações circunscritas de células de morfologia poligonal as quais foram descritas como células da porção epitelial da membrana amniótica humana por Miki et Al (3) e equina por Lange-Consiglio et Al (9). Estes autores relataram que tanto as células de morfologia fibroblastóide quanto as de morfologia poligonal expressaram marcadores de CTMs, marcadores de pluricelularidade como o Oct-4 e capacidade de diferenciação *in vitro* para linhagens endodermis como hepatócitos (3),

mesodermas como as células ósseas, cartilaginosas e adiposas e ainda ectodermas como células neurais (3,9). Com a realização das passagens a presença das células com características epiteliais foi diminuindo, desta forma, no presente trabalho o seu potencial de diferenciação não foi avaliado.

No presente experimento a análise imunocitoquímica, realizada na placa do cultivo, demonstrou marcação positiva para CD44 e Vimentina e para o marcador de proliferação celular PCNA e ausência de marcação para Citoqueratina confirmando a origem mesenquimal e o potencial de proliferação das células de todos os grupos colhidos nos diferentes períodos gestacionais. Estes achados estão de acordo com a literatura tanto em humanos (6) quanto em equinos (9). No entanto, a ausência de marcação para Oct-4 discorda do observado na literatura em relação à CTMs derivadas de anexos fetais humanos (15-17), caninos (8) e equinos (9, 18, 19). O Oct-4 tem sido descrito como marcador fundamental para a identificação de células pluripotentes em cultivo (20 - 22).

Entretanto, em condições especiais esta proteína tem sido encontrada também em outros tipos celulares. Pochampally et Al (23) submeteram CTMs obtidas da medula óssea humana ao cultivo primário em ausência de soro por um período de 15 a 30 dias e observaram que as células originadas nestas condições de cultivo mantinham todas as características de CTMs, ou seja, se diferenciavam em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, além de expressarem genes típicos de CTMs como o Bmi-1. Estas células foram marcadas positivamente para o Oct-4 demonstrando tratar-se de uma sub-população de células progenitora muito precoces. Entretanto, a presença deste tipo celular diminuiu com o número de passagens e elas não mais puderam ser isoladas após a terceira passagem. Desta forma, no presente trabalho, a falha na marcação para o Oct-4 pode estar relacionada ao momento na

qual esta foi realizada (sempre na terceira passagem) quando esta sub-população de células mais indiferenciadas poderia já ter sido eliminada do cultivo.

Na avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, todas as amostras avaliadas demonstraram expressão de CD44 (TI: 74,52; TM: 83,81; TF:86,06 e MP: 85,48) e de CD90 (TI: 39,37; TM: 38,30; TF:44,95 e MO: 39,72) e não expressaram CD34 (TI: 3,38; TM: 3,21; TF:1,05 e MP:5,66) corroborando com os resultados obtidos em humanos (2-5,7) e com a caracterização imunofenotípica das CTMs equinas sugeridas por De Schauwer et Al (24) e apresentadas por Lange-Consiglio et Al (9) na avaliação de CTMs derivadas da membrana amniótica equina colhida no momento do parto.

Todos os grupos estudados também apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica quando expostos aos respectivos meios indutores de diferenciação por 14 dias. Não foram observadas diferenças quanto a deposição de cálcio extra-celular, formação de gotículas de lipídeos intracitoplasmáticos e formação de matriz de glicosaminoglicanos entre os períodos gestacionais estudados, já que a metodologia utilizada não permitia a quantificação dos mesmos. Pequenas diferenças quanto a estes fatores foram subjetivamente observadas entre as amostras, independentemente das fases gestacionais das quais eram provenientes. Estes resultados estão de acordo com os achados encontrados por Igura et Al, Yen et Al, Miki et Al, Díaz-Prado et Al (3-5, 7) na pesquisa científica humana e por Lange-Consiglio et Al (9) avaliando CTMs de equinos.

Conclusões:

Concluimos que CTMs podem ser isoladas com facilidade de amostras de membrana amniótica colhidas em abatedouros comerciais durante as fases gestacionais e no momento do parto de equinos. Estas células apresentaram as características morfológicas e

imunofenotípicas de CTMs e ainda demonstraram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica.

A princípio, a avaliação das amostras obtidas das fases gestacionais foi realizada como instrumento de pesquisa, já que sua colheita in vivo não é viável, enquanto que a colheita das amostras do momento do parto é perfeitamente capaz de ser realizada a campo. No entanto, a colheita de membrana amniótica em abatedouros comerciais se apresenta como uma excelente alternativa para a formação de bancos de células-tronco. Além disto, o sucesso no isolamento de CTMs derivadas da membrana amniótica de amostras transportadas refrigeradas a 5°C por até 72 horas pode viabilizar a colheita a campo ao nascimento e envio do material para o processamento em centros especializados.

Estes resultados sugerem que as CTMs derivadas da membrana amniótica equina como excelentes alternativas para a medicina regenerativa equina. No entanto, novos estudos quanto à expressão de marcadores de pluripotência como Oct-4 e quanto à capacidade de diferenciação in vitro em linhagens extra-mesodermas das MA-CTMs, devem ser realizados.

Agradecimentos:

Fapesp, Fundunesp e Capes pelo apoio financeiro e Frigorífico Pomar (Araguari-MG), Frigorífico Foresta (São Gabriel-RS) e Haras Santa Maria de Araras (Bagé-RS) pela colaboração na execução desta pesquisa.

Referências:

- 1- PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. **Placenta**, v.32, supp.2, p.s186-195.
- 2- SAKURAGAWA, N.; KAKISHITA, K.; KIKUCHI, A.; OKANO, H.; UCHIDA, S.; KAMO, I.; KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. **J. Neurosc. Res.**, v.78, p.208-214, 2004.

- 3- MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v.23, p.1549-1559, 2005.
- 4- IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUSHI, S.; TAKASHI, T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from corionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v.6, n.6, p. 543-553, 2004.
- 5- YEN, B.L.; HUANG, H.I.; CHIEN, C.C.; JUI, H.Y.; KO, B.S.; YAO, M.; SHUN, C.T.; YEN, M.L.; LEE, M.C.; CHEN, Y.C. Isolation of multipotent cells from human placenta. **Stem Cells**, v.23, n.1, 2005.
- 6- SHUANG-ZHI, H.; PING, S.; XI-NING; P. Culture and indentification of human amniotic mesenchymal stem cells. **Chin. Med. Sci. J.**, v.25, n.4, p.211-214, 2010.
- 7- DÍAZ-PRADO, S.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; HERMIDA-GOMEZ, T.; CICIONE, C.; RENDAL-VÁZQUEZ, M.E.; FUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F.J.; BLANCO, F.J. Human amniotic membrane as na alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation**, v.81, n.3, p.162-171, 2011.
- 8- URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study os amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, doi: 10.1002/mrd.21311, 2011.
- 9- LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; MAGATTI, M.; RESSEL, L.; TASSAN, S.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **J Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. DOI: 10.1002/term.465
- 10- NAVES, C.S.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; BELLETI, M.E.; OLIVEIRA, R. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. **Ciência Rural**. v.38, n.2, p.416-422. 2008.
- 11- FAUZA, D. Amniotic fluid stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v.18, n. 6, p. 877-891, 2004.
- 12- GUCCIARDO, L.; LORIES, R.; OCHSENBEIRI-KÖLBLE, N.; DONE, E.; ZWIJSEN, A.; DEPREST, J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potencial use in perinatology and regenerative medicine. **Int. J. Obstet. Gynaecol.**, v.16, p.166-172, 2008.
- 13- CREMONESI, F.; VIOLINI, S.; CONSIGLIO-LANGE, A.; RAMELLI, P.; RANZENIGO, G.; MARIANI, P. Isolation in vitro culture and characterization of foal umbilical cord cells at birth. **Vet. Res. Commun.**, v.32, suppl. 1, p. S139-S142, 2008.
- 14- EVANGELISTA M., SONCINI M., PAROLINI O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cryotechnology**, v.58, p. 33042, 2008
- 15- PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D. LUBEC, G. POLLACK, A.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, n.191, p.309-314, 2004.

- 16- TSAI M.S.; HWANG, S.M.; TSAI, L.Y.; CHENG, F.J.; LEE, J.L. Clonal Amniotic Fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cell. **Biol. Reprod.**, v.74, p.545-551, 2006.
- 17- YOU, Q.; TONG, X.; GUAN,Y.; ZHANG, D.; HUANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. The biological characteristics of human third semester amniotic fluid stem cells. **J. Int. Méd. Res.**, v. 37, p. 105-112, 2009.
- 18- PARK, S.B.; SEO, M.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. **Cytotherapy**, v.13, n.3, p.341-349, 2011.
- 19- LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; CONSIGLIO, A.L.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid- derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun.**, v.35, p.103-121, 2010.
- 20- PALMIERI, S.L.; PETER, W.; HESS, H.; SCHOLER, H.R. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. **Dev Biol**, 166, 259-267, 1994.
- 21- PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, 19: 271-278, 2001.
- 22- YEOM, Y.I.; HA, H.S.; BALLING, R.; SCHOLER, H.R.; ARTZT, K. Structure, expression, and chromosomal location of the Oct-4 gene. **Mech Dev**, 35: 171-179, 1991.
- 23- POCHAMPALLY R R., SMITH J R., YLOSTALO J, PROCKOP D J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of *OCT-4* and other embryonic genes. **Blood**, vol. 103 no. 5, p. 1647-1652, 2004.
- 24- DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R.; SOON, A.V. Markers os stemness in equine mesenchyal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v.75, p.1431-1443, 2011.

Capítulo 4

Artigo científico a ser enviado para a revista “Cell Proliferation”

Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino obtido de três fases gestacionais e no momento do parto

De Vita, B.¹; Campos, L.L.¹; Listoni, A.J.¹; Maia, L.¹; Martin, I.¹; Freitas, N.P.P.¹; Sudano, M.J.¹; Curcio, B.R.²; Golim, A.M.³; Laufer-Amorim, R.¹; Landim-Alvarenga, F.C.¹; Prestes, N.C.¹.

***bruddev@gmail.com**

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP Brasil

²Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS – Brasil

³Hemocentro do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu/SP – Brasil

Resumo: O tecido extravascular do cordão umbilical ou gelatina de Wharton, como é conhecido, já foi descrito como uma fonte de células-tronco mesenquimais (CTMs) com grande perspectiva de uso na medicina regenerativa humana e veterinária. O objetivo do presente estudo foi identificar, caracterizar e diferenciar CTMs do tecido extra vascular do cordão umbilical equinos (TCU), colhidos no terço inicial, médio e final da gestação e no momento do parto, comparando suas características. As células foram recuperadas por meio de digestão enzimática dos fragmentos de tecido, realizada com solução de collagenase 0,4%. Foram obtidas 35 amostras de TCU de equinos de diferentes idades gestacionais e do momento do parto as quais foram submetidas às análises morfológica, imunocitoquímica, imunofenotípica por citometria de fluxo e às diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica in vitro. Todas as amostras demonstraram adesão ao plástico e morfologia fibroblastóide. As TCU-CTMs de todos os grupos foram imunomarcadas para CD44, PCNA e vimentina com ausência de marcação para citoqueratina e Oct-4; demonstraram alta expressão de CD44, expressão de CD90 e ausência de expressão de CD34; e foram capazes de diferenciação in vitro nas 3 linhagens celulares estudadas. Concluímos que o TCU representa uma fonte promissora de CTMs também para a espécie equina, com a vantagem de uma colheita não invasiva e indolor e a possibilidade da formação de bancos de armazenamento de células.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, anexos fetais, imunocitoquímica, citometria de fluxo.

Introdução

O cordão umbilical é recoberto pelo epitélio amniótico que protege uma matriz gelatinosa e elástica de mucopolissacarídeos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina) chamada de “Wharton’s Jelly” após sua descrição por Thomas Wharton em 1856. O âmnion e a gelatina de Wharton protegem três importantes vasos sanguíneos, essenciais para o desenvolvimento do feto (Forraz & McGuckin, 2011).

Um simples fragmento de 5 a 10 mm³ de gelatina de Wharton tem o potencial de render a produção de mais de um bilhão de CTMs em 30 dias (Degoul et Al apud Forraz & McGuckin, 2011). Considerando-se o tamanho médio do cordão umbilical de humanos de 50cm e, o ainda mais longo

cordão umbilical equino, pode-se prever que esta fonte será cada vez mais clinicamente relevante com os avanços das pesquisas médicas e veterinárias.

Recentemente inúmeros estudos da medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação das células derivadas do tecido extravascular do cordão umbilical em células ósseas, da pele, endotélio, hepáticas e em linhagens neurogênicas (Zhang, Lie & Wei, 2009; Xu et Al., 2010; Caballero et Al., 2010; Zhang & Fan, 2010).

A medicina veterinária equina também tem demonstrado interesse nesta fonte de CTMs. O Isolamento e cultivo de CTMs obtidas da gelatina de Wharton de cordões umbilicais equinos foram realizados com sucesso. As células demonstraram morfologia fibroblastóide e apresentaram a expressão de marcadores embrionários como Oct-4, SSEA-4 e c-Kit, bem como a expressão de c-Myc, CD54, CD90, CD105 e CD146. Não expressaram os marcadores CD34, CD45 e CD133. Além disso, as células demonstraram potencial de diferenciação *in vitro* para linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica (Hoynowski et Al., 2007). Em 2008 Cremonesi e colaboradores consideraram a obtenção de CTMs do tecido do cordão de equinos um procedimento não invasivo em que as células são caracterizadas por alta taxa de proliferação, alta capacidade de diferenciação e expressão dos marcadores de pluripotência Oct-4 e Sox-2. Estas células também foram hábeis em formar esferas de aglomerado celular já reportados na literatura por Miki et Al. (2005).

Em 2011, Lovati et Al. relataram que as CTMs do tecido extra vascular do cordão umbilical de equinos expressaram os marcadores mesenquimais CD105, CD29, CD44; embrionários Oct-4, SSEA-4 e TRA I-60 e não expressaram o marcador hematopoiético CD34. Demonstraram ainda, que as células derivadas da medula óssea e do líquido amniótico apresentaram uma taxa de proliferação significativamente maior do que as células derivadas do tecido do cordão umbilical. Porém, uma pesquisa prévia evidenciou que a suplementação do meio de cultivo com EGF promoveu um aumento considerável na taxa de proliferação das CTMs da gelatina de Wharton equina (Passeri et Al., 2009) e uma pesquisa recente demonstrou que a suplementação do meio de cultivo com cálcio e calciomimético NPS R-476 também foi capaz de promover o mesmo efeito (Martino et Al., 2011).

O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e diferenciar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino colhido nos terços inicial, médio e final da gestação e no momento do parto, e ainda comparar as suas características, visando contribuir com a otimização do cultivo *in vitro* e do estudo das características das CTMs desta origem para sua futura utilização na medicina regenerativa equina.

Material e Métodos

Colheita

Um total de trinta e cinco de tecido extra vascular de cordão umbilical foi obtido. Vinte e três amostras provenientes das fases gestacionais foram colhidas de úteros gravídicos de éguas sem raça definida em abatedouros comerciais localizados nas cidades de Araguari-MG (18°39'4" S, 48°11'7" O) e São Gabriel-RS (30°46'42" S, 54°52'50" O). Após a abertura do útero e exposição da membrana amniótica foram colhidos fragmentos de aproximadamente 3cm² do tecido extra vascular do cordão umbilical. Outras doze amostras foram colhidas no momento do parto de 12 éguas da raça Puro Sangue Inglês no Haras Santa Maria de Araras localizado na cidade de Bagé-RS (29°47'01,63" S, 55°47'27,54" O).

Durante as colheitas em abatedouros comerciais realizou-se a mensuração da distância céfalococcígea (CC) de todos os fetos para realização da divisão das amostras de acordo com a idade gestacional (IG) segundo equação $IG = 22,623 + 4,2528 CR - 0,0124 CC^2$ sugerida por Naves et Al (10). Consideraram-se as amostras de terço inicial de gestação àquelas obtidas de gestações de até 112 dias; de terço médio de gestação, as amostras de 113 dias até 224 dias; e de terço final de gestação as amostras de 225 dias em diante.

Após a colheita, as amostras foram lavadas com PBS e transferidas para tubos de centrífuga estéreis contendo 10 mL do meio de cultivo composto por 40% de DMEM baixa glicose, 40% de F12, 20% de soro fetal bovino, anfotericina B, estreptomicina e penicilina (Gibco, USA). Os tubos foram armazenados e transportados a 5°C por até 72 horas no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botutainer (Botupharma, Botucatu, Brasil) até o laboratório localizado em Botucatu-SP (22°53'09"S, 48°26'42"O).

As amostras foram divididas em 4 grupos de acordo com o momento da colheita: Terço Inicial da gestação (7 amostras); Terço Médio (10 amostras); Terço Final (5 amostras) da gestação e Momento do Parto (12 amostras).

Isolamento e cultivo

Ao chegar ao laboratório as amostras foram lavadas em PBS, dissecadas para remoção total dos vasos sanguíneos e refragmentadas para facilitar a digestão enzimática em solução de collagenase 0,4% (Invitrogen, USA), a solução foi filtrada em filtros de 70nm (BD, USA), centrifugadas a 1750 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspensionado em 10 mL do meio de cultivo citado. Cada amostra foi dividida em duas alíquotas de 5mL e cultivadas em frascos de cultivo de 25cm³ (Sarstedt, Alemanha), em estufa com 90% de umidade e 5% de CO₂ a 37,5°C.

Após a adesão das células, os meios foram trocados a cada 48-72 horas e as passagens foram realizadas quando do alcance de 80% de confluência. Para isto, as monocamadas foram lavadas duas vezes com 2 mL de PBS, foram adicionados 2 mL de TrypLE™ Express (Invitrogen, USA) e os frascos de cultivo mantidos na estufa por 5 minutos. Após a confirmação de que a dissociação entre as células havia ocorrido, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes no meio citado para completa remoção da tripsina. Os “pellets” foram então ressuspensos em 10 mL de meio e divididos em duas alíquotas e recolocados em dois novos frascos de cultivo com 5mL cada.

Imunocitoquímica

As amostras foram cultivadas em placas 24 wells no meio citado por 48 horas, quando apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide. As células foram então fixadas (paraformaldeído 4%) e permeabilizadas (Saponina) com Fix & Perm fixation and permeabilization Kit (Invitrogen, USA), lavadas 3 vezes com PBS, incubadas com solução de leite desnatado a 3% por 1 hora para o bloqueio de proteínas inespecíficas, lavadas 3 vezes em PBS novamente e incubadas por 18 horas a 5°C com os anticorpos primários monoclonais *mouse anti horse* CD44, *mouse anti human* PCNA, vimentina e citoqueratina, e policlonal *goat anti Oct-4*. Os anticorpos primários foram detectados através da incubação com os anticorpos secundários ligados a peroxidase (Advance, Dako, USA), exceto para o Oct-4, para o qual foi utilizado o anticorpo secundário anti *goat* por 30 minutos e o complexo ABC Kit Vectastain (Vector Laboratories Inc., USA). As reações foram reveladas utilizando-se solução de substrato cromogênico - DAB por 5 minutos (Liquid DAB Cromogen® – DakoCytomation, USA).

Citometria de Fluxo

Para a citometria de fluxo as amostras foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS. As amostras foram divididas em alíquotas e incubadas com os anticorpos, anti-CD90 e anti-CD34 conjugados com a sonda FITC e com o anticorpo primário anti-CD44 por uma hora, seguida da incubação com o anticorpo secundário conjugado com a sonda FITC ou PE por mais uma hora. As amostras foram analisadas no citômetro FACS Calibur BD®. Duas amostras de cada grupo foram analisadas.

Diferenciação

Osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, as amostras foram cultivadas em placas 6 “well”. Quando as mesmas apresentaram cerca de 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Alizarin Red 2% e pH 4,2 (Sigma, USA) por 3 minutos. Após este período, foram lavadas

mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de depósitos de matriz de cálcio, corados em vermelho.

Adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as monocamadas foram cultivadas em placas 6 “well” e quando as mesmas apresentavam 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (StemPro Adipogenesis Kit, Gibco). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 10 a 14 dias. Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguida de duas vezes com água destilada e cobertas com a coloração Oil Red O (Sigma, USA) por 50 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação gotículas de lipídeo intracitoplasmático, corados em vermelho.

Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica, as monocamadas foram tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células. Os “pellets” foram mantidos por 24-48 horas no meio de cultivo quando o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco). Os meios foram trocados a cada 48-72 horas por 14 dias, e então foram fixados em formol tamponado e incluídos em parafina para realização dos cortes para formação de três lâminas por amostras, as quais foram coradas com HE, Alcian Blue e Azul de Toluidina. As lâminas foram então observadas por microscopia de luz para avaliação da morfologia e presença de matriz de glicosaminoglicanos.

Análise Estatística

Para análise estatística, a variável dependente binomial expressão das marcações (CD34, CD90 e CD44) na citometria fluxo dos diferentes grupos (terço inicial, médio e final da gestação, e momento do parto) foi analisada através do teste de Regressão Logística utilizando o PROC LOGISTIC do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Quando o efeito de tratamento foi significativo utilizou-se o LSD com o comando LSMEANS PDIF do PROC GLM do SAS. Fontes de variação no modelo incluindo os diferentes grupos experimentais foram considerados como efeito fixo. Como efeito aleatório adotou-se os animais (grupo). Os resultados estão apresentados como porcentagem. Foi adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Morfologia

Todas as amostras apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide. As amostras provenientes do terço inicial, médio, final e momento do parto apresentaram adesão e morfologia fibroblastóide em 24 horas e alcançaram confluência de 80% em 48-72 horas, quando as passagens foram realizadas (Fig.1).

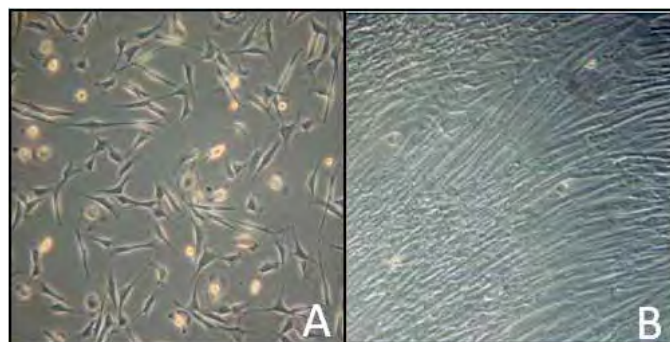


Fig.1: Adesão e morfologia fibroblastóide (A) e alcance de confluência (B) de células derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino. Aumentos de 10x.

Imunocitoquímica

Todas as amostras foram avaliadas e apresentaram imunomarcagem para os anticorpos anti CD44, PCNA e vimentina e ausência de marcação para os anticorpos anti citoqueratina e Oct-4. As amostras estavam em terceira passagem (P3) (Fig.2).

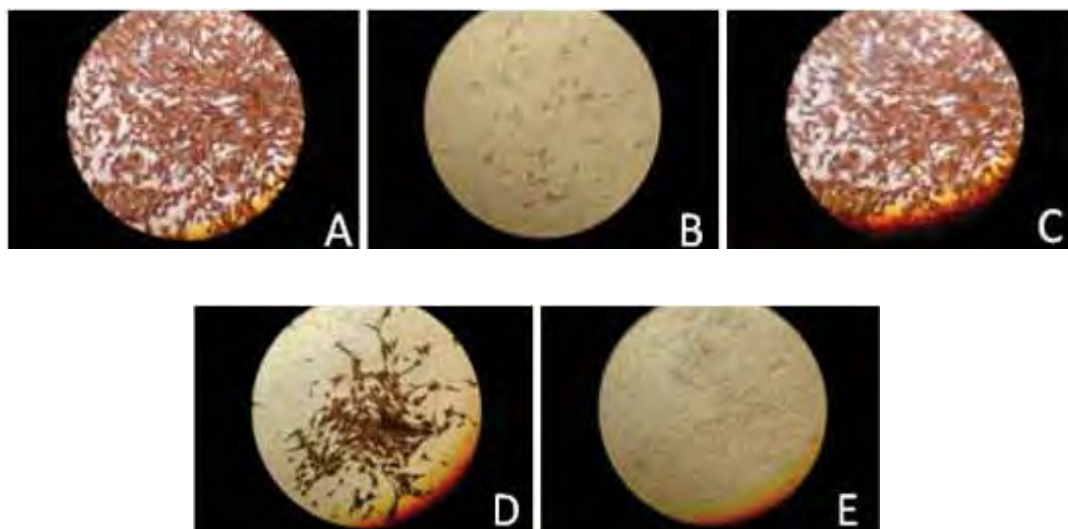


Fig.2: Células com morfologia fibroblastóide, derivadas amostras tecido extra vascular de cordão umbilical equino, imunocoradas para os anticorpos anti-CD44 (A), vimentina (C), PCNA (D) e com ausência de marcação para citoqueratina (B) e Oct-4 (E).

Citometria de Fluxo

Todas as amostras dos períodos gestacionais avaliadas e momento do parto apresentaram expressão de CD44, expressão de CD90 e ausência de expressão do CD34 conforme demonstrado na tabela 1.

TABELA 1: Valores em porcentagem de expressão dos marcadores CD34, CD90, CD44, bem como controle de autofluorescência e controle negativo do CD44 (%) de células fibroblastóides derivadas do tecido de cordão umbilical equino colhido no terço inicial, médio e final da gestação e no momento do parto.

Marcação	Grupo Terço Inicial	Grupo Terço Médio	Grupo Terço Final	Grupo Momento do Parto	Valor de P
CD34	1,6	2,0	1,4	0,7	0,8847
CD90	78,5 ^a	47,3 ^b	42,7 ^b	43,5 ^b	<0,0001
CD44	99,1 ^a	85,4 ^b	80,3 ^b	81,1 ^b	0,0172

^{a,b,c} Letras sobrescritas incomum na mesma linha diferem ($P < 0,05$). N = 20.000.

A expressão dos marcadores CD44, CD90, CD34 e os controles negativo do CD 44 e de autofluorescência das células fibroblastóides do tecido extra vascular do cordão umbilical equino estão representadas nos gráficos da figura 3 a seguir.

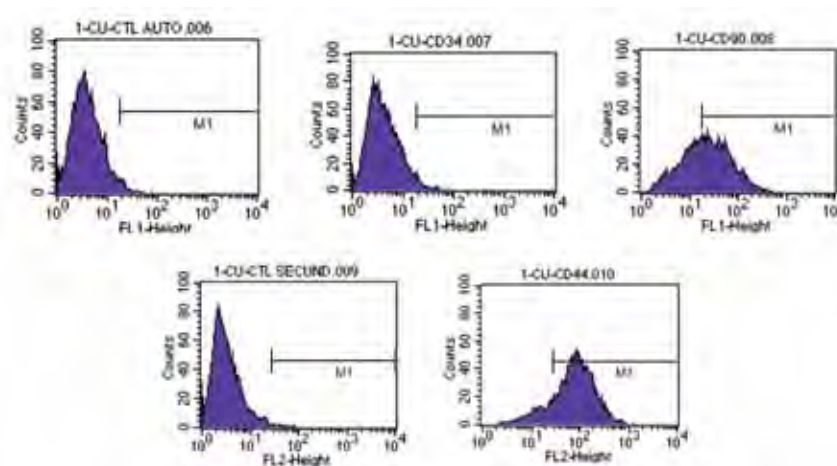


Fig.3: Gráficos da citometria de fluxo de amostra de células fibroblastóides derivadas do tecido extra vascular do cordão umbilical equino. Os gráficos demonstram a expressão CD44 e CD90, ausência de expressão do CD34, bem como o controle de autofluorescência das células e controle negativo do CD44.

Diferenciação

Todas as amostras dos períodos gestacionais e momento do parto apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. As amostras estavam em segunda passagem (P2). Não foram observadas diferenças na capacidade de diferenciação entre as amostras obtidas do terço inicial, médio e final da gestação. As diferenças quanto à quantidade de depósitos de cálcio, presença de gotículas de lipídeo e deposição de glicosaminoglicanos ocorreram entre as amostras independentemente dos grupos (TI, TM, TF e MP) das quais foram colhidas.

O cultivo das TCU-CTMs realizado em meio indutor de diferenciação osteogênica por 14 dias resultou na produção de cristais de cálcio extracelular identificados em vermelho pela coloração Alizarin Red (Fig.4A).

As TCU-CTMs cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênica por 14 dias apresentaram mudanças morfológicas tornando-se arredondadas e apresentaram o acúmulo de gotículas lipídicas em seu citoplasma coradas em vermelho pela coloração Oil Red O (Fig.4B).

A análise histológica do cultivo em 3D das TCU-CTMs sob meio indutor diferenciação de condrogênica por 14 dias apresentou células arredondadas cercadas de matriz de glicosaminoglicanos, coradas em vermelho pela coloração HE, em azul pela coloração Alcian Blue e pelo fenômeno de metacromasia observado pela coloração Azul de Toluidina (Fig.4C,D e E).

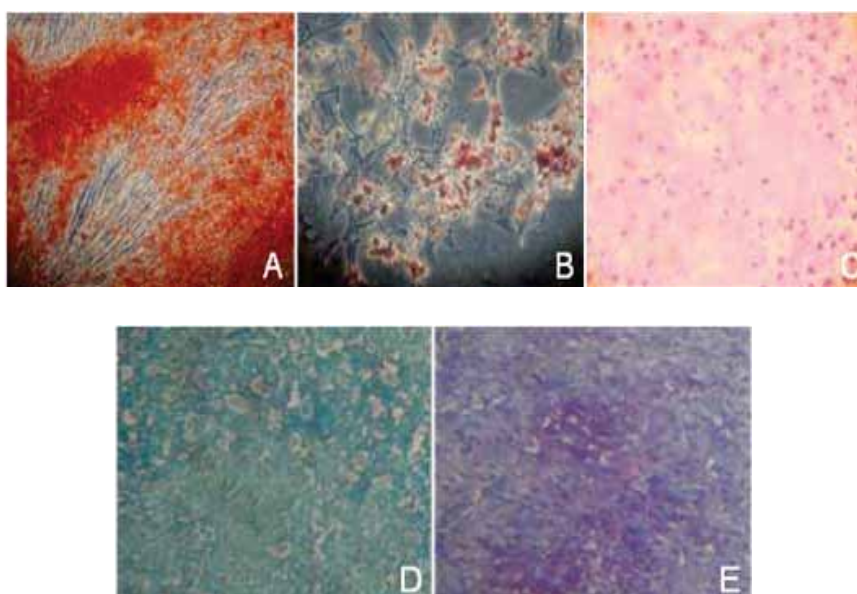


Fig.4: Diferenciação de células com morfologia fibroblastóide derivadas do tecido de cordão umbilical equino nas linhagens osteogênica observando-se depósitos de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (A); adipogênica observando-se gotículas de lipídeo intracitoplasmático corados em vermelho por Oil Red O (B e C) e condrogênica observando-se a presença de matriz de glicosaminoglicanos coradas e em vermelho pela coloração HE, em azul com Alcian Blue, metacromasia em Azul de Toluidina.

Discussão

Nos últimos anos inúmeras pesquisas em medicina humana (Zhan, Lie e Wei, 2009; Xu et Al., 2010; Caballero et Al., 2010; Zhang e Fan, 2010) e veterinária (Hoynowski et Al., 2007; Cremonesi et Al., 2008; Passeri et Al., 2009; Lovati et Al; 2011; Martino et Al., 2011) tem reportado a presença de CTMs não apenas no sangue do cordão umbilical, como no tecido extra vascular do mesmo. Muitas

são as vantagens relatadas por estes autores, como a colheita não invasiva, indolor, de tecidos que são considerados como descarte após o parto, a baixa imunogenicidade das células com estas origens e a grande possibilidade de formação de bancos de armazenamento de células derivadas de tecidos colhidos logo após o nascimento.

O estudo das células tronco obtidas da matriz extra vascular do cordão umbilical de potros já foi descrito na literatura (Hotnowski et Al., 2007; Cremonesi et Al., 2008; Passeri et Al., 2009). Entretanto, nosso estudo teve o objetivo de identificar, pela primeira vez, CTMs derivadas da membrana amniótica equino, colhidos durante diferentes fases gestacionais em comparação com as encontradas no momento do parto. A princípio, as amostras obtidas das fases gestacionais foi realizada como instrumento de pesquisa, já que sua colheita in vivo não é viável. No entanto a colheita de material em abatedouros comerciais foi perfeitamente viável e fácil de ser realizada, representado uma fonte interessante de obtenção de material para a formação de bancos de armazenamento de células.

Todas as amostras cultivadas apresentaram células aderentes ao plástico com morfologia fibroblastóide em 24 horas de cultivo e alcançaram confluência de 80% em 48/72 horas de cultivo corroborando com os achados relatados nos estudos com células humanas (Lie e Wei, 2009; Xu et Al., 2010; Caballero et Al., 2010; Zhang e Fan, 2010), caninas (Uranio et Al., 2011) e equinas (Hoynowski et Al., 2007; Lovatti et Al., 2011). Não foram observadas diferenças morfológicas entre as células obtidas nas diferentes fases gestacionais e no momento do parto.

Na análise imunocitoquímica realizada na placa do cultivo obervou-se a marcação positiva para CD44 e Vimentina e para o marcador de proliferação celular PCNA e ausência de marcação para Citoqueratina confirmando a origem mesenquimal e potencial de proliferação de todos os grupos colhidos no período gestacional e durante o parto. Estes achados estão de acordo com a literatura tanto em humanos (Lie e Wei, 2009; Xu et Al., 2010; Caballero et Al., 2010; Zhang e Fan, 2010) quanto em equinos para células obtidas no momento do parto (Hoynowski, 2007; Lovatti et Al., 2011). A ausência de marcação para Oct-4 discorda do observado na literatura sobre CTMs derivadas de anexos fetais humanos (Prusa et Al., 2004; Miki et Al., 2005 You et Al., 2009; Lie e Wei, 2009; Xu et Al.,

2010; Caballero et Al., 2010; Zhang e Fan, 2010), caninos (Uranio et Al., 2011) e equinos (Hoynowski et Al., 2007; Park et Al., 2011, Lovatti et Al, 2011, Lange-Consiglio et Al, 2011).

A expressão do *Oct-4* tem sido frequentemente utilizada como um marcador de pluripotência em células tronco embrionárias, no entanto, alguns estudos tem demonstrado sua expressão também em células adultas, com características multipotentes incluindo células tronco mesenquimais (Pochampally et Al., 2004). Entretanto, alguns autores alertam para o fato da detecção do sinal de *Oct-4* e até de proteínas semelhantes ao *Oct-4* serem resultado da transcrição de pseudogenes semelhantes a este fator e não do *Oct-4* propriamente dito (Liedtke et Al., 2007). O significado destes achados ainda não foi elucidado, nem tão pouco o comportamento da expressão destes fatores durante a evolução do cultivo celular. Assim, é possível, que por termos utilizado uma avaliação qualitativa, a visualização de uma subpopulação positiva para *Oct-4*, ou para seus *spliced*s pode ter sido prejudicada, sugerindo a necessidade de uma avaliação quantitativa como a avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo.

Na avaliação imunofenotípica por citometria de fluxo, todas as amostras avaliadas demonstraram alta expressão CD44 (TI:99,13^a; TM:85,49^b; TF:80,33^b e MO: 81,09^b) e de CD90 (TI: 78,50^a; TM: 47,25^b, TF:42,67^b e MO:43,53^b) e não expressaram CD34 (TI:1,59; TM:2,02; TF: 1,35 e MO: 0,70) corroborando com os resultados obtidos em humanos e com a caracterização imunofenotípica das CTMs equinas sugeridas por De Schauwer (2011) e apresentadas por Hoynowski et Al., 2007; Park e colaboradores, Lovatti e colaboradores e Lange-Consiglio e colaboradores, todos em 2011.

Entretanto, houve uma maior expressão de CD44 e CD90 no terço inicial da gestação em comparação com os demais grupos estudados. Este achado pode refletir as mudanças fisiológicas que acompanham o desenvolvimento da gestação e pode significar ainda, que as células progenitoras encontradas na fase inicial da gestação são mais indiferenciadas do que as encontradas nas fases posteriores. No entanto, este aspecto precisa ser melhor estudado, uma vez que de acordo com nosso

conhecimento este é o primeiro trabalho que compara as características das CTMs derivadas do tecido extra vascular de cordão umbilical em diferentes momentos do desenvolvimento do feto.

Todos os grupos estudados também apresentaram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica quando expostas aos respectivos meios indutores de diferenciação por 14 dias. Não foram observadas diferenças quanto a deposição de cálcio extra celular, formação de gotículas de lipídeos intracitoplasmáticos e formação de matriz de glicosaminoglicanos entre os períodos gestacionais estudados, já que a metodologia utilizada não permitiu a mensuração destes fatores. Pequenas diferenças quanto a estes fatores foram subjetivamente observadas entre as amostras, independentemente das fases gestacionais das quais eram provenientes. Estes resultados estão de acordo com os achados encontrados por Igura et Al., 2004, Yen et Al., 2005; Miki et Al., 2005; Díaz-Prado et Al., 2011 na pesquisa científica humana e por Hoynowski et Al. (2007); Park et Al. (2011), Lovatti et Al. (2011), Lange-Consiglio et Al. (2011), Martino et Al. (2011) Lange-Consiglio et Al. (2011) avaliando CTMs derivadas de anexos fetais de equinos.

Conclusões:

Concluimos que CTMs podem ser isoladas com facilidade de amostras de tecido extra vascular do cordão umbilical equino colhidos em abatedouros comerciais durante qualquer fase gestacional e no momento do parto. Estas células apresentaram as características morfológicas e imunofenotípicas de CTMs e ainda demonstraram capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Embora pequenas diferenças imunofenotípicas tenham sido observadas entre as células obtidas nos diferentes momentos gestacionais, seu potencial de diferenciação apresentou-se semelhante.

Além disto, o sucesso no isolamento de CTMs derivadas da membrana amniótica de amostras transportadas refrigeradas a 5°C por até 72 horas pode viabilizar a colheita a campo ao nascimento e envio do material para o processamento em centros especializados.

Estes resultados sugerem o tecido extra vascular do cordão umbilical como excelente fonte de CTMs para medicina regenerativa equina. No entanto, novos estudos quanto à expressão de

marcadores de pluripotência como Oct-4 e quanto à capacidade de diferenciação in vitro em linhagens extra-mesodermiais das TCU-CTMs, devem ser realizados.

Agradecimentos

Fapesp, Fundunesp e Capes pelo apoio financeiro e Frigoríficos Pomar (Araguari-MG) Frigorífico Floresta (São Gabriel-RS) e Haras Santa Maria de Araras (Bagé-RS) pela colaboração na execução desta pesquisa.

Referências

BOITANO, A.E.; WANG, J., ROMEO, R.; BOUCHEZ, L.C.; PARKER, A.E.; SUTTON, S.E.; WALKER, J.R.; FLAVENY, C.A.; PERDEW, G.H.; DENISON, M.S.; SCHULTZ, P.G.; COOKE, M.P. Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. **Science**, v. 329 (5997), p. 1345–8, 2010.

CABALLERO, M.; REED, C.R.; MADAN, G.; VAN AALST, J.A. Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells. **Ann. Plast. Sur.**, v.64, p.605–609, 2010.

CREMONESI, F.; VIOLINI, S.; CONSIGLIO-LANGE, A.; RAMELLI, P.; RANZENIGO, G.; MARIANI, P. Isolation in vitro culture and characterization of foal umbilical cord cells at birth. **Vet. Res. Commun.**, v.32, suppl. 1, p. S139-S142, 2008.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R.; SOON, A.V. Markers os stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v.75, p.1431-1443, 2011.

FORRAZ, N.; MCGUCKIN, C.P. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Prolif.**, v.44, suppl.1, p. 60-69, 2010.

HOYNOWSKI, S.M.; FRY, M.M.; GARDNER, B.M.; LEMING, M.T.; TUCKER, J.R.; BLACK, L. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.362, p.347–353, 2007.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; MAGATTI, M.; RESSEL, L.; TASSAN, S.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **J Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. DOI: 10.1002/term.465

LIEDTKE S., ENCZMANN J., WACLAWCZYK S., WERNET P., KOGLER G. *Oct-4* and its pseudogenes confuses stem cell research. **Cell Stem Cell**, v.1, p. 364-366. 2007.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; CONSIGLIO, A.L.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid- derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun.**, v.35, p.103-121, 2010.

MAJETI R, PARK, C.Y.; WEISSMAN, I.L. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. **Cell Stem Cell**, v. 1 (6), p. 635–4, 2007.

MARTINO, N.A.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F.; VALENTINI, L.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; AMBRUOSI, B.; SCIORSCI, R.L.; LACALANDRA, G.M.; RESHKIN, S.J.; DELL'AQUILA, M.E. Functional expression of extracellular calcium sensing receptor (CaSR) in equine umbilical cord matrix size-sieved stem cell. **PloS One**, v.6, n.3, p.1-9, 2011.

MESTAS, J.; HUGHES, C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J. Immunol**, v. 172 (5), p. 2731–8, 2004.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v.23, p.1549-1559, 2005.

NAVES, C.S.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; BELLETI, M.E.; OLIVEIRA, R. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. **Ciência Rural**. v.38, n.2, p.416-422. 2008.

PARK, S.B.; SEO, M.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. **Cytotherapy**, v.13, n.3, p.341-349, 2011.

PASSERI, S.; NOCCHI, F.; LAMANNA, R.; LAPI, S. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). **Cell. Biol. Int.**, v.33, p.100-105, 2009.

POCHAMPALLY R R., SMITH J R., YLOSTALO J, PROCKOP D J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of *OCT-4* and other embryonic genes. **Blood**, vol. 103 no. 5, p. 1647-1652, 2004.

URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study os amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, doi: 10.1002/mrd.21311, 2011.

XU, H.H.; ZHAO, L.; DETAMORE, M.S.; TAKAGI, S.; CHOW, L.C. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. **Tissue Eng. Part A**, v.16, p. 2743–2753, 2010.

ZHANG, H.T.; FAN, J. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. **Differentiation**, n.79, p.15–20, 2010.

ZHANG, Y.N.; LIE, P.C.; WEI, X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. **Cytotherapy**, v.11, p.548-558, 2009.

Capítulo 5

Discussão Geral

A princípio, este estudo seria realizado com apenas uma fonte inédita de células-tronco mesenquimais equinas: o líquido amniótico. No entanto, o crescente interesse da comunidade científica humana em outros anexos fetais e a dificuldade inicial no isolamento das CTMs derivadas do líquido amniótico motivaram a inclusão de duas outras fontes: a membrana amniótica (também inédita para espécie equina) e a matriz extra vascular de cordão umbilical.

A dificuldade inicial do isolamento de CTMs do líquido amniótico equino foi solucionada diminuindo-se o volume de meio em que as células foram ressuspensas e mantidas no cultivo primário, e aumentando-se o tempo de cultivo até a realização da primeira troca de meio evitando-se o descarte de células com características de CTMs que ainda pudessem estar em suspensão.

A colheita do material foi outra dificuldade encontrada. Após o fechamento do frigorífico da cidade de Apucarana/PR, com localização mais próxima ao laboratório onde as amostras foram processadas Botucatu/SP, as amostras das fases gestacionais tiveram de ser colhidas em abatedouros comerciais de carne equina que se localizam nas cidades de São Gabriel/RS e Araguari/MG. Já as amostras do momento do parto tiveram de ser colhidas em um haras da cidade de Bagé/RS onde havia um controle rígido quanto à estação de nascimento dos potros, com partos assistidos e de forma o mais anti-séptica possível, também distante do laboratório de cultivo em Botucatu.

A tentativa de colheita em um haras próximo ao laboratório, onde os nascimentos aconteceram a campo, resultou na contaminação bacteriana no segundo dia do cultivo primário de cinco amostras de líquido amniótico, membrana amniótica e tecido extra vascular de cordão umbilical, que tiveram de ser descartadas. Este problema foi resolvido graças à colaboração do Haras Santa Maria de Araras, localizado na cidade de Bagé/RS, cuja maternidade possuía 180 éguas em fase de parição. As éguas em fase gestacional avançada foram vigiadas 24 horas por dia, e ao primeiro sinal de parto eram levadas a uma baia de parição, com cama nova e assistência veterinária ao parto.

Ainda assim, doze amostras de líquido amniótico colhidas no momento do parto sofreram contaminação bacteriana, constatada aos 30 dias do cultivo primário e tiveram de ser descartadas. A contaminação bacteriana/fúngica de células derivadas de anexos fetais coletados durante o parto já foi relatada por Passeri et al (2009) e Lovati et al. (2011), sendo que este último grupo de pesquisa conseguiu superar este problema adicionando o dobro da concentração de antibióticos e antifúngicos do meio durante o cultivo primário e voltando as concentrações normais após a primeira passagem. No presente experimento, acreditamos que a apresentação tardia da adesão das células com morfologia fibroblastóide destas amostras, dificultando a frequência na troca do meio de cultivo, pode ter contribuído para a contaminação bacteriana que culminou com a perda das mesmas.

Visando superar o problema da manutenção da viabilidade das amostras durante o período de viagem de colheita e transporte de material até o laboratório, foram realizados estudos pilotos com amostras de líquido amniótico, membrana amniótica e tecido extra vascular de cordão umbilical canino (durante cesarianas a termo) e equino (após o abortamento de feto equino com aproximadamente 4 meses de gestação) colhidas no ambulatório do departamento de reprodução animal da FMVZ- Unesp/Botucatu.

As amostras de líquido amniótico foram diretamente armazenadas em tubos de centrífuga, os fragmentos de membrana amniótica e de tecido de cordão umbilical foram lavadas em PBS e acondicionados em tubos de centrífuga contendo 10mL do meio utilizado para o cultivo celular. Todas as amostras foram mantidas a 5°C durante uma semana. Após este período o processamento seguiu-se normalmente e as células apresentaram 80% de viabilidade por meio da coloração azul de triplan, aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, capacidade de proliferação, marcação imunofluorescente de CD44 e CD90 e ausência de marcação para CD34 e ainda imunomarcação para vimentina e ausência de imunomarcação para citoqueratina. Sendo assim, o procedimento de transporte refrigerado das amostras foi considerado viável para a execução do experimento (De Vita, 2010^a; De Vita, 2010^b).

O exito no isolamento de CTMs equinas derivadas do líquido amniótico, membrana amniótica e tecido extra vascular de cordão umbilical de amostras

refrigeradas a 5°C por até 72 horas pode viabilizar a colheita a campo ao nascimento e envio do material para o processamento em centros especializados, facilitando a formação de bancos de armazenamento de células.

No entanto, as amostras de sangue dos fetos e potros dos quais as amostras de anexos fetais foram colhidas não chegaram em condições para a realização da análise citogenética com a intenção de comparação do cariótipo das células sanguíneas com o cariótipo das células cultivadas em primeira e terceira passagem para a avaliação da manutenção do mesmo durante o procedimento de cultivo *in vitro*, sugerindo que estas avaliações devem ser realizadas no local de colheita das amostras.

A apresentação de maiores porcentagens de expressão dos marcadores CD90 e CD44 nas amostras líquido amniótico e gelatina de wharton colhidas nos momentos mais iniciais da gestação equina (podendo refletir uma maior indiferenciação das células progenitoras nestas fases) pode indicá-las como melhor momento de colheita para a obtenção de CTMs, no entanto não excluem a colheita nos momentos mais tardios.

No presente estudo, não foram realizadas comparações entre as fontes estudadas para obtenção de CTMs. Porém, as amostras de membrana amniótica apresentaram porcentagens de expressão dos marcadores de CTMs similares durante todas as fases da gestação e no momento do parto, e ainda apresentaram facilidade na colheita de amostras e no isolamento das CTMs.

A ausência de expressão do marcador de pluripotência Oct-4, divergiu dos resultados apresentados por muitos autores em relação às CTMs humanas (PRUSA et AL., 2004; YOU et AL., 2009; CABALLERO et AL., 2010) e animais (URANIO et AL., 2011; CREMONESI et AL.; 2011; LOVATI et AL., 2011; LANGE-CONSIGLIO et AL.; 2011), entretanto alguns autores alertam para o fato da detecção do sinal Oct-4 e até de proteínas semelhantes ao Oct-4 serem resultado da transcrição de pseudogenes deste fator e não do Oct-4 propriamente dito (LIEDTKE et al., 2011). O significado destes achados ainda não foram bem elucidados e sugerem que a visibilização de uma subpopulação de Oct-4 pode ser prejudicada em metodologias qualitativas e que novos estudos devem ser realizados para a padronização da caracterização imunofenotípica de CTMs equinas.

Conclusões gerais

Concluímos que o isolamento de células-tronco mesenquimais de todos os anexos fetais estudados (líquido amniótico, membrana amniótica e tecido de cordão umbilical) foi obtido com sucesso. As células derivadas destes tecidos apresentaram características de adesão e morfologia fibroblastóide, expressão de marcadores de CTMs como CD44, CD90 e ausência de expressão de CD34, imunomarcção para CD44, Vimentina e PCNA e ausência de marcação para citoqueratina. E ainda, que as células obtidas dos tecidos estudados apresentaram capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Sendo assim, podemos indicar as CTMs de anexos fetais equinos como fontes ricas, éticas, de fácil obtenção para a formação de bancos de armazenamento visando à terapia celular e medicina regenerativa também para a espécie equina.

Referências

ALMEIDA, F.Q.; SILVA,V.P. Progresso científico em equideocultura na 1^a década do século XXI. **Rev. Bras. Zootec.**, v.39, supl. esp., p.119-129, 2010.

ANTONUCCI, I.; IEZZI, I.; MORIZIO, E.; MASTRANGELO, F.; PANTALONE, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; GIGANTE, A.; SALINI, V.; CALABRESE, G.; TETÈ, S.; PALKA, G.; STUPPIA, L. Isolation Of osteogenicprogenitors from human amniotic fluid using a single step cultura protocol. **BMC Biotechnol.**, n.9, p. 1-9, 2009.

ARAÚJO, J.D. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 4, p.357-365, 2005.

BARRY. F.; MURPHY, M.; DWYER, R.; O'BRIEN, T.; KAVANAGH, C.; DUFFY, G. Stem cell therapy for tissue repair: the stem cell-host interaction. In: ESVOT CONGRESS, 15., 2010, Bolonha. **Proceedings...** Bolonha, Itália, 2010. Reprinted in IVIS. p.43.

BERG, L.; KOCH, T.; HEERKENS, T.; BESSONOV, K.; THOMSEN, P.; BETTS, D. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. **Vet. Comp. Orthop. Traumatol.**, v.22, p.363-370, 2009.

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

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

BORJESSON, D.L.; PERONI, J.F. **The regenerative medicine laboratory: facilitating stem cell therapy for equine disease.** Philadelphia: Elsevier, 2011.

BROXMEYER, H.E. Umbilical cord blood transplantation. In:____. **StemBook.** Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, 2010. Disponível em: <www.stembook.org 2010>. Acesso em: 28 abr. 2011.

BROXMEYER, H.E.; DOUGLAS, G.W. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.86, p.3828–3832, 1986.

BYDŁOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; DUARTE, S.A.; JANZ, F.L.; CAVAGLIERI, R.C.; MASELLI, L.M. Células-tronco do líquido amniótico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, p. 45-52, 2009.

CABALLERO, M.; REED, C.R.; MADAN, G.; VAN AALST, J.A. Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells. **Ann. Plast. Sur.**, v.64, p.605–609, 2010.

CABRAL A.C.V.; ÂNGELO, P.C.; LEITE, H.V.; PEREIRA, A.K.; LPOES, A.P.B.M.; OLIVEIRA, M.B.; BORGES, K.B.G.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células-tronco de líquido amniótico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.54, n. 6, p. 489-493, 2009.

CARVALHO, A.M.; ALVES, A.L.G.; GOLIM, M.A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C.A.; OLIVEIRA, P.G.G.; OLI-VEIRA, P.G.G.; DEFFUNE, E. The isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 131, p.303-306, 2009.

CHA, J.; FALANGA, V. Stem cells in cutaneous wound healing. **Clin. Dermatol.**, v.25, n.1, p. 73-78, 2007.

CREMONESI, F.; VIOLINI, S.; CONSIGLIO-LANGE, A.; RAMELLI, P.; RANZENIGO, G.; MARIANI, P. Isolation in vitro culture and characterization of foal umbilical cord cells at birth. **Vet. Res. Commun.**, v.32, suppl. 1, p. S139-S142, 2008.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE, C.A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology**, v.75, n.8, p.1400-1415, 2011.

DE BARI, C.; DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, F.P. Luyten, Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheum.**, v.44, p.1928-1942, 2001.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.JR.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERREM, A.; SNYDER, E.Y.; YOO, J.J.; FURTH, M.E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat. Biotechnol.**, v.25, p.100–106, 2007.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G.R.; SOON, A.V. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology**, v.75, p.1431-1443, 2011.

DE VITA, B.; MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; ALVARENGA, F.C.L.; AMORIM, R.L.; PRESTES, N.C. Isolation and Culture of Amniotic Membrane and Umbilical cord Mesenchymal Stem Cells of Canine Foetus. In: ANNUAL INTERNATIONAL MEETING OF THE PORTUGUESE SOCIETY FOR STEM CELLS AND CELLULAR THERAPIES, 5., 2010, Guimarães, Portugal. **Proceedings...** Guimarães, Portugal, 2010a.

DE VITA, B ; MAIA, L. ; FREITAS, N.P.P ; CAMPOS, L.L. ; ALVARENGA, F.C.L ; PRESTES, N.C . Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica e gelatina de wharton de equinos. In: V Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular, 2010, Gramado, RS. **Anais...** Gramado, 2010b.

DeUGARTE, D.A.; MORIZONO, K.; ELBARBARY, A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ZHU, M.; DRAGOO, J.L.; ASHJIAN, P.; THOMAS, B.; BENHAIM, P.; CHEN, I.; FRASER, J.; HEDRICK, M.A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. **Cells Tissue Organs**, v.174, n.3, p.101-109, 2003.

DÍAZ-PRADO, S.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; HERMIDA-GOMEZ, T.; CICIONE, C.; RENDAL-VÁZQUEZ, M.E.; FUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F.J.; BLANCO, F.J. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation**, v.81, n.3, p.162-171, 2011.

DOMINICI, M.; LeBLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, L; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PORKCOP, D.J.; HOWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stroma cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, n.8. p. 315-317, 2006.

EVANGELISTA M., SONCINI M., PAROLINI O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cryotechnology**, v.58, p. 33-42, 2008.

FAUZA, D. Amniotic fluid stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.**, v.18, n. 6, p. 877-891, 2004.

FORRAZ, N.; MCGUCKIN, C.P. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. **Cell Prolif.**, v.44, suppl.1, p. 60-69, 2010.

FREIEDENSTEIN, A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.I.; PETRAKOVA, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 8, n.33, p. 881-887, 1966.

FREITAS, F. **Doação de medula óssea: dúvidas e questões frequentes**. 2005 Disponível em: <<http://topazio1950.blogs.sapo.pt/49513.html>>. Acesso em: 27 abr. 2011.

GANDOLFI, F.; VANELLI, A.; PENNAROSSA, G.; RAHAMAN, M.; ACOCELLA, F.; BREVINI, T.A.L. Large animal models for cardiac stem cell therapies. **Theriogenology**, v.75, p.1416-1425, 2011.

GOSDEN, C.M. Amniotic fluid cell types and culture. **Br. Med. Bull.**, v.39, n.4, p.348-354, 1983.

GUCCIARDO, L.; LORIES, R.; OCHSENBEIRI-KÖLBLE, N.; DONE, E.; ZWIJSEN, A.; DEPREST, J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potencial

use in perinatology and regenerative medicine. **Int. J. Obstet. Gynaecol.**, v.16, p.166-172, 2008.

HOYNOWSKI, S.M.; FRY, M.M.; GARDNER, B.M.; LEMING, M.T.; TUCKER, J.R.; BLACK, L. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.362, p.347–353, 2007.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUSHI, S.; TAKASHI, T.A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from corionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, v.6, n.6, p. 543-553, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> .Acesso em: 20 abr. 2011.

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

KNUDTZON, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. **Blood**, v. 43, p.357-361, 1974.

KOCH, T.G.; HEERCKENS, T.; THOMSEN, P.D.; BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord. **BMC Biotechnol.**, v.7, n.26, p.1-9, 2007.

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

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; MAGATTI, M.; RESSEL, L.; TASSAN, S.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **J Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. DOI: 10.1002/term.465

LIEDTKE S., ENCZMANN J., WACLAWCZYK S., WERNET P., KOGLER G. Oct-4 and its pseudogenes confuses stem cell research. **Cell Stem Cell**, v.1, p. 364-366. 2007.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada, ESALQ/USP, 2006. 250p.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; CONSIGLIO, A.L.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid- derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun.**, v.35, p.103-121, 2010.

MAIA, L.; AMORIM, R.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; NETO, J.F.L.; ALVARENGA, M.L.; WODEWOTZKY, T.I. Considerações do uso de células-tronco mesenquimais em medicina equina. **Rev. Clin. Vet.**, n.25, p.10-15, 2009.

MAJETI, R., PARK, C.Y.; WEISSMAN, I.L. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. **Cell Stem Cell**, v. 1 (6), p. 635–4, 2007.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R.; CHAPARRO.; KERKIS, A. ZOPPA, A.L.V.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Eng. Part C Methods**, v.15, n.1, p. 87-94, 2009.

MARTINO, N.A.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F.; VALENTINI, L.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; AMBRUOSI, B.; SCIORSCI, R.L.; LACALANDRA, G.M.; RESHKIN, S.J.; DELL'AQUILA, M.E. Functional expression of extracellular calcium sensing receptor (CaSR) in equine umbilical cord matrix size-sieved stem cell. **PloS One**, v.6, n.3, p.1-9, 2011.

MAYHALL, E.A. PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.16, n.6, p.713-720, 2004.

McGUCKIN, C.; FORRAZ, N.; BARADEZ, M.O. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. **Acta Neurobiol. Exp.**, v.66, p. 321-329, 2006.

MEISNER, R. Preclinical studies of a somatic stem cell therapy: Pathway to clinical approval. In: ACVP/ASVCP ANNUAL MEETINGS, 2009, Monterey, Califórnia. **Proceedings...** Monterey, 2009. Reprinted in IVIS.

MESTAS, J.; HUGHES, C.C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J. Immunol**, v. 172 (5), p. 2731–8, 2004.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v.23, p.1549-1559, 2005.

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

MINGUELL, J.; ERICES, A.; CONGENT, P. Mesenchymal stem cells. **Exp. Biol. Med.**, n.226, p.507-520, 2001.

MONTEIRO, B.S.; NETO, N.M.A.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco Mesenquimais. **Ciênc. Rural**, v. 40, p. 238-245, 2010.

MULLER, S. Age-related decline in the osteogenic potencial of human bone marrow cells cultured in three dimentional collagen sponges. **J. Cell Biochem.**, v.86, p.583-590, 2001.

MULLER, R.; RAABE, O.; ADDICKS, K.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on proliferation, differentiation and migration in equine mesenchymal stem cell. **Cell Biol. Int.**, v.35, p. 235-248, 2010.

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genét. Esc.**, p.25-29, 2007.

PAGANELA, J.C.; DOS SANTOS, C.A.; PAZ, C.; AMARAL, L.A.;VELHO, J.; NOGUEIRA, C.E.W. Levantamento das principais enfermidades que acometem o sistema locomotor de equinos da raça crioula atendidos no hospital de clínicas veterinária– dados preliminares. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., ENCONTRO DA PÓS GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL, 10., 2008, Pelotas, RS. **Anais...** Pelotas, 2008.

PALMIERI, S.L.; PETER, W.; HESS, H.; SCHOLER, H.R. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. **Dev Biol**, 166, 259-267, 1994.

PARK, S.B.; SEO, M.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. **Cytotherapy**, v.13, n.3, p.341-349, 2011.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: An update. **Placenta**, v.32, supp.2, p.s186-195.

PASSERI, S.; NOCCHI, F.; LAMANNA, R.; LAPPI, S. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). **Cell. Biol. Int.**, v.33, p.100-105, 2009.

PEISTER, A.; DEUTSCH, E.R.; KOLAMBBKAR, Y. HUTMACHER, D.W.; GULDBERG R.E. Amniotic fluid stem cells produce robust mineral deposits on biodegradable Scaffolds. **Tissue Eng. Part A.**, v.15, p.3129-3138, 2008.

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciênc. Saúde Colet.**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.

PESCE, M.; SCHOLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells**, 19: 271-278, 2001.

PERMTHAI, T.; ODGLUN, Y.; JULAVIJITPHONG, S.; TITAPANT, V.; CHUENWATTANA, P.; VANTANASIRI, C.; PATTANAPANYASAT, K. A novel method to derive amniotic fluid stem cell for therapeutic purposes. **BMC Cell Biol.**, v.11, n.79, p.1-9, 2010.

POCHAMPALLY R R., SMITH J R., YLOSTALO J, PROCKOP D J. Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of OCT-4 and other embryonic genes. **Blood**, vol. 103 no. 5, p. 1647-1652, 2004.

PRATA, K.L. **Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas.** 2006. 202p.Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

PRESTES, N.C. e LANDIM ALVARENGA. Os líquidos fetais e sua constituição bioquímica. In: **Obstetrícia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1ed., p.41-51, 2006.

PRUSA, A.R.; HENGSTSCHLAGER, M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. **Med. Sci. Monit.**, v.8, p. RA253-RA257, 2002.

PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D. LUBEC, G. POLLACK, A.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Neurogenic cells in human amniotic fluid. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, n.191, p.309-314, 2004.

REED, S.A; JOHNSON, S.E. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. **J. Cell Physiol.**, v.215, p.329–336, 2008.

RESENDE, M.A. Miosites no cavalo atleta. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2., 2005, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, 2005. p. 56-75.

ROITT, I. **Imunologia**. 5.ed. São Paulo: Manole, 1999.

SAKURAGAWA, N.; KAKISHITA, K.; KIKUCHI, A.; OKANO, H.; UCHIDA, S.; KAMO, I.; KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. **J. Neurosc. Res.**, v.78, p.208-214, 2004.

SATOH, H.; KISHI, K.; TANAKA, T.; KUBOTA, Y.; NAKAJIMA, T.; AKASAKA, Y.; ISHII, T. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. **Cell Transplant.**, v.13, n.4, p.405-412, 2004.

SCHUH, E.M.; FRIEDMAN, M.S.; CARRADE, D.D.; LI, J.; HEEKE, D.; OYSERMAN, S.M.; GALUPPO, L.D.; LARA, D.J; WALKER, N.J.; FERRARO, G.L.; OWENS, S.D.; BORJESSON, D.L. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. **Am. J. Vet. Res.**, v.70, p.1526-1535, 2009.

SHUANG-ZHI, H.; PING, S.; XI-NING; P. Culture and indentification of human amniotic mesenchymal stem cells. **Chin. Med. Sci. J.**, v.25, n.4, p.211-214, 2010.

STEIGMAN, S.A.; ARMANT, M.; BAYER-ZWIRELLO, L.; KAO, G.S.; SILBERSTEIN, L.; RITZ, J.; FAUZA, D.O. Preclinical regulatory nvalidation of 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. **J. Pediat. Surg.**, v.43, p.1164-1169, 2008.

TAYLOR, S.E.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine Vet. J.**, v. 39, n.2, p.172-180, 2007.

TORRICELLI, F.; BRIZZI, L.B; BERNABEI, P.A. Indentification of hematopoietic progenitors cells in human amniotic fluid before 12th week of gestation. **Ital. J. Anat. Embryol.**, v.98, p.118-126, 1993.

TROEDSSON, M.H.T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v.52, p.461-471, 1999.

TSAI M.S.; HWANG, S.M.; TSAI, L.Y.; CHENG, F.J.; LEE, J.L. Clonal Amniotic Fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cell. **Biol. Reprod.**, v.74, p.545-551, 2006.

TSAI M.S.; LEE, J.L.; CHANG, Y.J.; HWANG, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. **Hum. Reprod.**, v. 19, n. 6, p. 1450- 1456, 2004.

URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study os amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, doi: 10.1002/mrd.21311, 2011.

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: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Vet. Surg.**, v.36, p. 613-622, 2007.

VIOLINI, S. RAMELLI, P. PISANI, L.F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells embryo stem cell markers and show the ability for fenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC Cell Biol.**, v. 10, n. 29, p. 172-180, 2009.

WAKITANI, S.; SAITO, T.; CAPLAN, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. **Muscle Nerve**, v.18, n.12, p. 1417-1426, 1995.

WANG, M.; YOSHIDA, A.; KAWASHIMA, H. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v.47, p.1522–1532, 2006.

XU, H.H.; ZHAO, L.; DETAMORE, M.S.; TAKAGI, S.; CHOW, L.C. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. **Tissue Eng. Part A**, v.16, p. 2743–2753, 2010.

YEN, B.L.; HUANG, H.I.; CHIEN, C.C.; JUI, H.Y.; KO, B.S.; YAO, M.; SHUN, C.T.; YEN, M.L.; LEE, M.C.; CHEN, Y.C. Isolation of multipotent cells from human placenta. **Stem Cells**, v.23, n.1, 2005.

YING, Q.L.; NICHOLS, J.; EVANS, E.P.; SMITH, A.G. Changing Potency by Spontaneous Fusion. **Nature**, v.416, p.545-548, 2002.

YEOM, Y.I.; HA, H.S.; BALLING, R.; SCHOLER, H.R.; ARTZT, K. Structure, expression, and chromosomal location of the Oct-4 gene. **Mech Dev**, 35: 171-179, 1991.

YOU, Q.; TONG, X.; GUAN, Y.; ZHANG, D.; HUANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, J. The biological characteristics of human third semester amniotic fluid stem cells. **J. Int. Méd. Res.**, v. 37, p. 105-112, 2009.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco**: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 2006. 245p.

ZHANG, H.T.; FAN, J. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. **Differentiation**, n.79, p.15–20, 2010.

ZHANG, Y.N.; LIE, P.C.; WEI, X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. **Cytotherapy**, v.11, p.548-558, 2009.