

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

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
ORIUNDAS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO
UMBILICAL DE BOVINOS (*Bos indicus*) NOS TRÊS
TRIMESTRES DE GESTAÇÃO**

Jamila Cristina Baptistella
Médica Veterinária

ARAÇATUBA-SP
2016

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

**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
ORIUNDAS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO
UMBILICAL DE BOVINOS (*Bos indicus*) NOS TRÊS
TRIMESTRES DE GESTAÇÃO**

Tese de Doutorado Apresentada junto ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, para a obtenção do título de Doutora.

Jamila Cristina Baptistella
Médica Veterinária

Prof. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva
Orientadora

ARAÇATUBA-SP
2016

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

Baptistella, Jamila Cristina

B222h Caracterização das células-tronco oriundas da geléia de Wharton do
cordão umbilical de bovinos (*Bos indicus*) nos três trimestres de gestação /
Jamila Cristina Baptistella.
Araçatuba: [s.n], 2016
81f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2016.

Orientadora: Prof. Adj. Tereza Cristina Cardoso Silva

1. Células tronco 2. Cordão umbilical 3. Imunomodulação 4. Bovino I. T.

CDD 615.8

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização das células-tronco oriundas da geleia de Wharton do cordão umbilical de bovinos
(*Bos indicus*) nos três trimestres de gestação

AUTORA: JAMILA CRISTINA BAPTISTELLA

ORIENTADORA: TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:



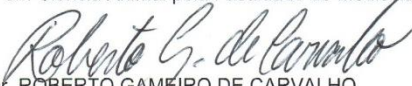
Profa. Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Dr. MARCOS ANTONIO MAIOLI

Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Prof. Dr. ROBERTO GAMEIRO DE CARVALHO

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP



Prof. Dr. MARCOS ROBERTO BONUTI

Curso de Medicina Veterinária / Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO



Prof. Dr. LUIZ EDUARDO CORRÊA FONSECA

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - UNESP

Araçatuba, 01 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jamila Cristina Baptistella

Nascimento	21/07/1985 – Guararapes/SP
Filiação	Vera Lúcia Dias Baptistella Fernando Marcos Baptistella
2004 – 2008	Curso de Graduação em Medicina Veterinária Universidade Camilo Castelo Branco – UNICASTELO Fernandópolis/SP
2011 – 2013	Curso de Pós-Graduação (<i>strictu sensu</i>) em Medicina Veterinária Área de concentração: Ciência Animal Fisiopatologia Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais Bolsista CAPES Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – <i>UNESP</i>
2012 – 2013	Curso de Pós-Graduação (<i>Latu sensu</i>) em Fisioterapia e Reabilitação Animal Teórico/Prático Nível: Especialização Instituto Bioethicus – Botucatu/SP
2014 – 2014	Vínculo: Servidor Público Enquadramento Funcional: Professora substituta de Anatomia Descritiva e Topográfica dos Animais Domésticos Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – <i>UNESP</i> Carga horária: 12hs semanais
2015 – 2015	Vínculo: Servidor Público Enquadramento Funcional: Professora substituta de Anatomia Descritiva e Topográfica dos Animais Domésticos Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – <i>UNESP</i> Carga horária: 12hs semanais
2016 – 2016	Professora do curso de Auxiliar Veterinário Guietti systems cursos e treinamentos Guararapes/SP

DEDICATÓRIA

Dedico essa prazerosa conquista a meus pais, Vera e Fernando, que carregaram consigo cada momento de dificuldade em que eu passava sempre me aconselhando e apoiando com suas palavras de conforto e carinho.

EPIGRAFE

"Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo.

Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta."

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a DEUS por mais essa conquista em minha vida. Agradecer por cada dia, cada momento; por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir em frente.

“Uns queriam um emprego melhor; outros, um emprego...

Uns queriam uma refeição mais farta; outros, apenas uma refeição...

Uns queriam uma vida mais amena; outros, apenas viver...

Uns queriam ter pais mais esclarecidos; outros, apenas ter pais...

Uns queriam ter olhos claros; outros, apenas enxergar...

Uns queriam ter voz bonita; outros apenas falar...

Uns queriam o silêncio; outros, ouvir...

Uns queriam um sapato novo; outros, ter pés...

Uns queriam um carro; outros, andar...

Uns queriam o supérfluo... Outros, apenas o necessário”

Chico Xavier

Aos meus pais, Vera e Fernando, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Muito obrigada.

As minhas irmãs, Jaqueline e Juliana, por todo companheirismo, amizade e o carinho de sempre, por todo apoio e incentivo, sempre torcendo pelas minhas conquistas.

Aos meus sobrinhos, Diego e Arthur, dois arteiros deliciosos, que não permitem um momento de tristeza em minha vida. Que chegam com seus abraços apertadinhos e me encham de beijos.

Ao meu namorado, Leandro, por estar presente no desenrolar desta etapa de minha vida profissional e pessoal, por sua amizade, seu carinho, sua paciência e por seu amor incondicional deixando muitas vezes seus objetivos para que eu pudesse alcançar os meus. Te amo!

Aos meus cunhados, Carlos Fernando e Lucas, por toda compreensão, apoio e carinho em mais essa etapa de minha vida.

Ao meu cachorro, Cowboy, que em muitos momentos tristes e que pareciam sem solução, ele estava ali com todo seu carinho aquecendo meu coração e me fazendo sorrir.

“Chega um momento em sua vida, que você sabe: Quem é imprescindível para você, quem nunca foi, quem não é mais, quem será sempre!”

Charles Chaplin

A minha orientadora, Tereza Cristina, que mesmo em nosso pouco convívio, pude aprender muitas coisas com sua pessoa, seu conhecimento e seu caráter incomparável. Tenho total admiração pelo ser humano e profissional que é, tendo em si o exemplo da simplicidade, competência, dedicação e amor ao seu trabalho, indo muito além do que o dever impõe. Tenho muito orgulho em poder citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pelas broncas, e paciência. Muito obrigada!

Ao Professor Roberto Gameiro, pelas palavras, ajuda, disponibilidade, por todos os ensinamentos transmitidos e pela contribuição no meu processo de aprendizagem. Tenho muito respeito e admiração pela sua ética e maneira simples e humilde de transmitir seus conhecimentos.

A Professora Cristina Monteiro, por toda atenção, carinho, palavras amigas e companheirismo nesta grande etapa.

A minha avó, minha tia Márcia, a minha sogra Márcia, meu sogro João Holgado, e toda a família pelo apoio e carinho.

São muitos os que participaram dessa etapa em minha vida.

Dona Nair e seu marido Professor Wilson, Professor Carvalhal, Professor Mário Jefferson, Professor Luiz Eduardo, Professora Kátia, Professora Cáris, Professor Marcelo. Alguns funcionários como Pedro, Adão e Vanessa. Meus sinceros agradecimentos a todos pelo convívio sempre prazeroso e enriquecedor.

Aos servidores da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP, pelo modo prestativo e eficiente com que sempre atenderam às minhas necessidades.

A Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” por sempre manter suas portas abertas.

A todos da rede UNESP Araçatuba, meus sinceros agradecimentos.

E a todos os que participaram dessa conquista indiretamente.

Que DEUS ilumine sempre o caminho de todos.

“A persistência é o melhor caminho do êxito”

Charles Chaplin

SÚMARIO

CAPITULO I	18
1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1.1 Introdução	18
1.2 Células-tronco	21
1.3 Células-tronco da geléia de Wharton do cordão umbilical	26
1.4 Diferenciação celular	28
2 OBJETOS	32
3 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
 CAPITULO II	
1 ARTIGO CIENTÍFICO	46
Abstract	47
Introduction	48
Materials and Methods	49
Isolation of WJMSC from bovine umbilical cord at different stages of pregnancy	49
Cell viability, T-cell proliferation, telomerase activity and cell expansion	50
In vitro multilineage differentiation assay	51
Flow cytometry	52
Microarray analysis	53
Statistical analysis	53
Results	54
Isolation and characterization of WJMSCs	54
Multilineage differentiation and phenotypic characterization	55
Gene expression profile	56
Discussion	56
References	61

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

FIGURA 1 – Ilustração do cordão umbilical 20

FIGURA 2 – Hierarquia da hematopoiese 22

FIGURA 3 – Clivagem do zigoto 23

FIGURA 4 – (A) Cordão umbilical bovino rodeados pelo epitélio amniótico (B) cordão umbilical de bovinos sem o epitélio amniótico destacando a geléia de Wharton entre as artérias e veia (C) corte transversal do cordão umbilical de bovinos (D) desenho esquemático de um corte longitudinal do cordão umbilical de bovinos 27

CAPITULO II

FIGURA 1 – FIGURA 1 - Bovine umbilical cords analyzed in this study. (a) 0 to 93 days corresponding to Group 1; (b) 94 to 187 days corresponding to Group 2; (c) 188-term of pregnancy corresponded to Group 3, bar 500- μ m. (d) ex vivo cultured cell obtained from Wharton's jelly zone corresponded to Group 1; (e) Group 2 and (f) Group 3. After P6 spindle-shaped fibroblast-like appearance can be observed under phase contrast microscopy. Bar 40- μ m 66

FIGURA 2 – FIGURA 2 - Cell viability, inhibition of T-cell proliferation and telomerase activity. (a) Viability of WJMSC cells measured by MTT based assay at 2, 6 and 10P. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d) of values obtained from four different experiments; (b) Ability of bovine WJMSCs cells to inhibit T-cell proliferation in response to mitogens at 6P, $p < 0.005$ obtained from four different experiments; (c) Telomerase repeat amplification results obtained from four different experiments. Bars

represent all groups at 2P, 6P and 10P

67

FIGURA 3 – FIGURA 3 - Doubling time over ten passages during cell culture from group 1 (d), 2 (e) and 3 (f). X-axis is represented by number of cell passage and Y-axis by days of culture. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d) of values obtained from four different experiments

* $p < 0.05$

69

FIGURA 4 – Photomicrographs representative of the morphological appearance. For each differentiation protocol, undifferentiated cells were kept as controls for group 1 (a), 2 (e) and 3 (i). Osteogenic differentiation was confirmed after Alizarin Red staining (Group 4-b, Group 4-f, Group 4-j; arrows), adipogenic differentiation after Oil red staining (Group 4-c, Group 4-g, Group 4-l; arrows) and chondrogenic differentiation after Toluidine blue staining (Group 4-d, Group 4-h, Group 4-m; arrows) differentiation of bovine-derived WJMSCs cells at P6

70

FIGURA 5 – Photomicrographs representative of the morphological appearance of neuro-like cells after neurogenic induction visible under immunofluorescence microscopy positive GFAP (Group 1-b; Group 2-e; Group 3-h) and Nestin (Group 1-c; Group 2-f, Group 3-i) cell markers (scale bar: 20 μ m). Undifferentiated cells were kept as controls for group 1 (a), 2 (d) and 3 (g)

71

FIGURA 6 – Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 1. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 1). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f

72

FIGURA 7 - Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 2. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 2). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f

73

FIGURA 8 - Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 3. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 3). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f

74

FIGURA 9 - Transcriptome analysis of WJMSCs surface markers, multipotency differentiation and immune related genes from group 1, 2 and 3. Relative gene expression are represented as mean + sd obtained from four different experiments. Unbroken line was positioned on the average negative known markers of MSCs. Genes with relative expression values above this line were considered up-regulated and were analyzed in comparison to control consisted of bovine T-lymphocyte population. a) Group 1; b) Group 2 and c) Group 3

75

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

TABELA 1 – Comparação entre células estaminais embrionárias e células estaminais adultas	24
--	----

TABELA 2 – Colorações utilizadas para definir potencial de diferenciação das células-tronco	29
---	----

CAPITULO II

Table 1 – Specifications of (<i>Bos taurus</i>) cattle gene name, description and location searched by microarray	77
---	----

LISTA DE ABREVIações

CAPITULO I

CTEs = Células-tronco embrionárias

CTAs = Células-tronco adultas

AGM = Aorta Gonadal Mesonéfrica

CITC = Comitê Internacional de Terapia Celular

CTMs = Células-tronco mesenquimais

CD34 = Grupo de diferenciação 34

CD44 = Grupo de diferenciação 44

CD45 = Grupo de diferenciação 45

CD73 = Grupo de diferenciação 73

CD105 = Grupo de diferenciação 105

CD90 = Grupo de diferenciação 90

CD14 = Grupo de diferenciação 14

ICPs = Indução de Células-tronco Pluripotentes

CAPITULO II

MSCs = Mesenchymal stromal cells

WJ = Wharton's jelly

WJMSCs = Wharton's jelly mesenchymal stromal cells

CD105 = Cluster of differentiation 105

CD29 = Cluster of differentiation 29

CD73 = Cluster of differentiation 73

CD90 = Cluster of differentiation 90

IL2 = Interleukin 2

IL6RR = Interleukin 6 receptor

INFAC = interferon alpha C

INFBI = Interferon, beta 1, fibroblast

IFNG = Interferon, gamma
TNF = Tumor necrosis factor
LTBR = Lymphotoxin beta receptor
IL1F10 = Interleukin 1
UC = Umbilical cord
ISCT = Mesenchymal and tissue stem cell committee
UCBMSCs = Umbilical cord blood mesenchymal stem cells
AFMSCs = Amniotic fluid mesenchymal stem cells
BMMSCs = Bone marrow mesenchymal stem cells
PBS = Phosphate buffered saline
RNA = Ribonucleic acid
DNase = Deoxyribonuclease
cDNA = Complementary Deoxyribonucleic acid
ConA = Concavaline A
PMA = Phytohemagglutinin
FC = Flow cytometry
THY1 (CD90) = Thy-1 cells surface antigen
NT5E (CD73) = 5' nucleotidase ecto
ITGB1 (CD29) = Integrin, beta 1
ENG (CD105) = Endoglin
PTPRC (CD45) = Protein tyrosine phosphatase, receptor type C
LEP = Leptin
FABP4 = Fatty acid binding protein 4, adipocyte
PPARD = Peroxisome proliferator-activated receptor delta
COL1A1 = Collagen type 1, alpha 1
SOX9 = Sex determining region Y
GFAP = Glial fibrillary acidic protein
NES = Nestin
JSP.1 = Major histocompatibility complex class I
DSB = Major histocompatibility complex class II
OMD = Osteomodulin

POST = Osteoblast specific factor

OSTF1 = Osteoblast stimulating factor 1

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO ORIUNDAS DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL DE BOVINOS (*Bos indicus*) NOS TRÊS TRIMESTRES DE GESTAÇÃO

RESUMO - A possibilidade para o isolamento de células mesenquimais multipotentes de anexo fetal bovino é uma perspectiva interessante devido potencial para utilização destas células em aplicações biotecnológicas. No entanto, ainda há pouco conhecimento disponível sobre as características destas células progenitoras na espécie bovina. Proliferando a morfologia das células, a partir de três fases da gestação, tipicamente apareceu forma de fuso do tipo fibroblastos, apresentando o mesmo número e viabilidade. Além disso, a capacidade proliferativa das células T em resposta a um estímulo mitogénico foi suprimida quando as células da geléia de Wharton foram incluídas na cultura. Multilinhagens foram confirmadas pela sua capacidade adipogênica, condrogénica e diferenciação neurogênica. O presente estudo demonstrou que células tronco mesenquimais colhidas a partir da geléia de Wharton do cordão umbilical de bovino em todas as fases da gestação mostraram capacidade proliferativa, potencial privilegiado e imunológico.

Palavras-chave: Células-tronco, cordão umbilical, imunomodulação, bovina

CHARACTERIZATION OF STEM CELLS DERIVED FROM WHARTON'S JELLY OF THE UMBILICAL CORD OF CATTLE (*Bos indicus*) IN THE THREE TRIMESTERS OF PREGNANCY

SUMMARY – The possibility for isolating bovine mesenchymal multipotent stromal cells from fetal adnexa is an interesting prospect because of the potential for these cells to be used for biotechnological applications. However, little knowledge is available about the characteristics of these progenitor cells in the bovine species. Proliferating cell morphology, from three stages of pregnancy, typically appeared fibroblast-like spindle shape, presenting the same viability and number. Moreover, the proliferative capacity of T cells in response to a mitogen stimulus was suppressed when Wharton's jelly mesenchymal stem cells were included in the culture. Multilineage properties were confirmed by their ability to undergo adipogenic, chondrogenic and neurogenic differentiation. The study demonstrated that Wharton's jelly mesenchymal stem cells harvested from bovine umbilical all pregnancy stages showed proliferative capacity, privileged and stemness potential.

Key words: Stem cells, umbilical cord, immunomodulation, bovine

CAPITULO I

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

Com o crescente estudo dentro da área científica, é possível notar a longevidade dos animais devido a melhoras na qualidade de vida dos mesmos. Pesquisadores e cientistas buscam a todo o momento encontrar respostas para doenças que ainda não possuem uma terapia específica levando a perda total ou parcial de funcionamento dos órgãos e tecidos devido ao próprio envelhecimento ou patologia.

Mezey (2016) afirma que a descoberta, a caracterização e utilização de células estaminais multipotentes têm permitido o tratamento de doenças que anteriormente eram fatais.

Concomitantemente, o interesse pelas células-tronco vem aumentando rapidamente na Medicina Veterinária, fato que pode ser notado devido ao grande número de publicações e pesquisas que vem sendo realizadas nos últimos anos.

Após Pinto Filho et al. (2013), Maia et al. (2013) destacarem que apesar das células-tronco ainda exigem muitos estudos, elas vem demonstrando resultados satisfatórios com a utilização do sangue presente nos cordões umbilicais devido à presença de células mesenquimais que são fontes para terapia celular, possuindo alta plasticidade, imunomoduladores e principalmente o poder de auto-renovação, podendo se tornar a medicina do futuro.

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com sua origem e também de acordo com sua capacidade de replicação. Segundo Vogel (2000)

quando elas são oriundas de massa celular interna do blastocisto embrionário, são células-tronco embrionárias (CTE); e quando são obtidas do sangue de cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico, são células-tronco adultas (CTA) podendo originar células de origem mesodérmica – adipócitos, condrócitos e osteoblastos. E quanto a sua capacidade de replicação, segundo Lagasse et al. (2000), Goodell et al. (2001) e Calloni et al. (2014) elas podem ser totipotentes – que são capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo; pluripotentes ou multipotentes – que são as que podem se diferenciar em quase todos os tecidos do corpo (embrionárias); oligopotentes – são as que conseguem se diferenciar em poucos tecidos e; unipotentes – são as que se diferenciam em apenas um único tecido.

De acordo com Cardoso et al. (2012) as fontes mais comuns de células multipotentes mesenquimais são medula óssea e tecido adiposo, porém ainda cita sobre possibilidades de isolamento através de anexos fetal bovino devido ao grande potencial para estas células serem utilizadas em aplicações biotecnológicas, como por exemplo, da geléia de Wharton de cordões umbilicais, sendo isolados de três regiões: zona perivascular, zona intravascular, e área sub-amniótica (WEISS; TROYER, 2006).

Segundo Corrao et al. (2013) “o cordão umbilical é uma parte essencial da placenta, contribuindo para o desenvolvimento fetal, assegurando o fluxo sanguíneo entre a mãe e o feto. O cordão umbilical é formado dentro das primeiras semanas de gestação por um invólucro dos vasos (uma veia e duas artérias) em uma massa de tecido conjuntivo mucoso, chamado geléia de Wharton e revestidas por epitélio umbilical”, podendo de acordo com Taghizadeh et al. (2011) ser adquirido sem métodos invasivos, logo após o nascimento.

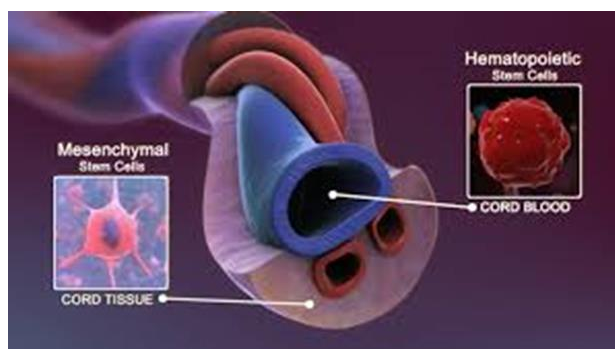


FIGURA 1 - Ilustração do cordão umbilical

Fonte: https://sigarra.up.pt/fcup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=611078

Consultado e modificado a: 01-04-2016

Observada primeiramente por Thomas Wharton em 1656, é formada por proteoglicanos e diversos tipos de colágeno. As células encontradas na geléia de Wharton são células-tronco mesenquimais primitivas que migraram da região AGM (Aorta Gonadal Mesonéfrica) para o cordão umbilical durante a organogênese (TAGHIZADEH et al., 2011)

A geléia de Wharton é uma substância gelatinosa que se localiza dentro do cordão umbilical, suas células possuem alto potencial de replicação (AZALONE et al., 2010; CARDOSO et al., 2012; TAGHIZADEH et al., 2011; WEISS et al., 2008), sendo descritas por Corrao et al. (2013) como fibroblastos incomuns ou miofibroblastos (células envolvidas na produção de fatores de crescimento e diferenciação celular), sendo encontradas em maior concentração ao redor dos vasos umbilicais, tendo como função o amortecimento dos vasos presentes na região. Tais células possuem características próprias de fibroblastos indicando processos de síntese como células produtoras de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, apresentando, ainda, numerosas mitocôndrias e aparelhos de Golgi (CORRAO et al., 2013; VASQUES et al., 2003).

De acordo com Dimitriou et al. (1998), e Weissman (2000) o cordão umbilical é uma fonte rica em células-tronco com alta capacidade proliferativa, sendo empregadas na cardiologia (HUTTMANN et al., 2006), ortopedia

(CANCEDDA et al., 2003), neurologia (CHERNYKH et al., 2007) e endocrinologia (VOLTARELLI; COURI, 2009).

1.2 CÉLULAS-TRONCO

Aproximadamente ao 19º dia de gestação ocorre a hematopoiese por meio do saco vitelino, após esse período os responsáveis em continuar produzindo os elementos do sangue são o fígado e o baço, até mesmo após o nascimento, podendo ocorrer até as duas primeiras semanas de vida do animal (CUMANO; GODIN, 2007; PAIK; ZON, 2010).

Durante o período da lactação toda a medula óssea é hematopoiética, porém no crescimento do animal, da sua infância até sua fase adulta ocorre à substituição progressiva da medula vermelha pela medula amarela, tendo esse nome, pois é substituída por gordura nos ossos longos, podendo ocorrer à reversão para hematopoiese; sendo assim, a medula hematopoiética no adulto é confinada ao esqueleto central e às extremidades proximais do fêmur e do úmero (PAIK; ZON, 2010).

Porém, segundo estudos realizados por Mezey (2016), o fígado, o cordão umbilical e o baço podem retomar seu papel hematopoiético fetal.

Durante um estudo realizado por Notta et al. (2016), foi observado um modelo diferente do prevalecente que pode explicar a origem de diversas células encontradas no sangue, envolvendo a hematopoiese, relatando sobre a existência de uma mudança na hierarquia dos elementos celulares do sangue humano durante o desenvolvimento onde, a célula-tronco hematopoiética totipotente dá origem ao megacariócito, que mais tarde dá origem a três novas linhagens como: eritrócitos, mielócitos e células linfóides.

Fato importante, pois com linhagens mais específicas de células sanguíneas isoladas pelos cientistas, podem ser “fabricados” glóbulos vermelhos e plaquetas para serem utilizadas na medicina regenerativa

através da técnica de ICP, em pacientes deficientes nesses elementos do sangue (MEZEY, 2016).

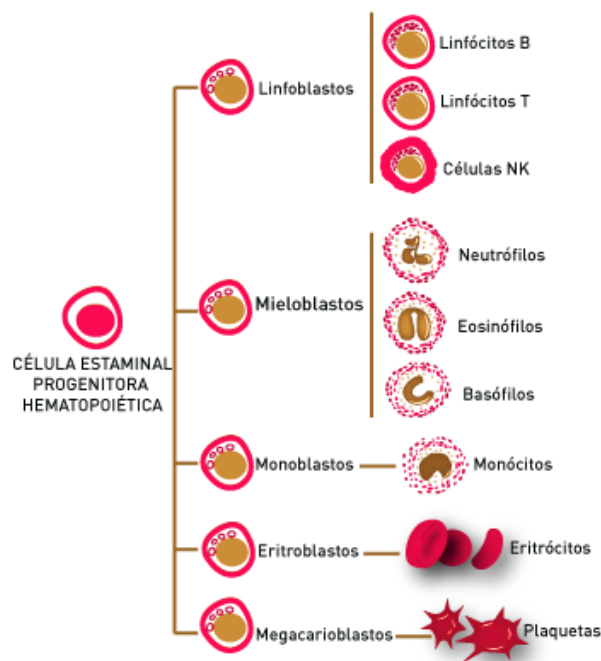


FIGURA 2 - Hierarquia da hematopoiese

Fonte: www.criovida.pt/células-estaminais/

Consultado e modificado em: 01-04-2016

A hematopoiese é o processo que forma, desenvolve, e realiza a maturação dos elementos presentes no sangue - eritrócitos, leucócitos e plaquetas - a partir de uma célula totipotente/pluripotente conhecida como célula-tronco (JAGANNATHAN-BOGDAN; ZON, 2013).

O termo célula-tronco foi descrito como sendo a continuidade do plasma germinativo e a origem do sistema hematopoiético, duas questões embriológicas, tendo poder de proliferação quase que indefinidamente podendo dar origem a células especializadas como, sistema nervoso, intestino, pele, entre outros (RAMALHO-SANTOS; WILLENBRING, 2007).

De acordo com Iacono et al. (2015) existem três diferentes tipos de células-tronco, células-tronco embrionárias, provenientes a partir da massa celular interna do blastocisto; células-tronco fetais e células-tronco adultas

que são obtidas do sangue de cordão umbilical, da medula óssea e do sangue periférico (VOGEL, 2000).

Células que de acordo com Weiss (2006) possui três critérios básicos: auto-renovação, alto poder de diferenciação e capacidade de repovoar tecidos que elas habitam.

Células-tronco perinatais representam uma ponte entre células embrionárias e células adultas. Essa população de células atende alguns critérios que podem se auto-renovar e induzir a diferenciação de vários tipos celulares, fato também encontrado nas células da geléia de Wharton, onde as mesmas partilham várias propriedades únicas das células-tronco mesenquimais de derivação fetal para as células-tronco adultas (ANZALONE et al., 2010; CARDOSO et al., 2012).

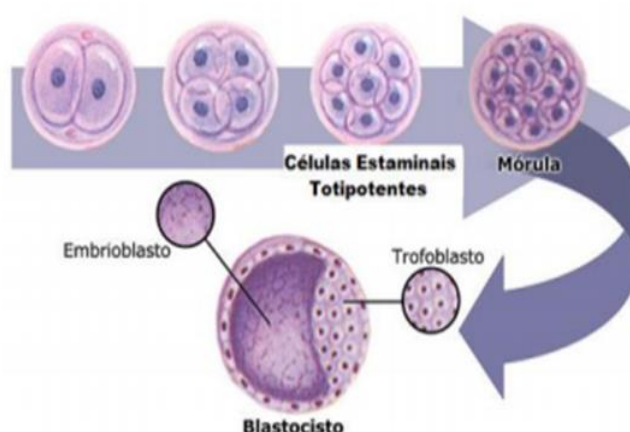


FIGURA 3 - Clivagem do zigoto

Fonte: https://sigarra.up.pt/fcup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=611078

Consultado e modificado em: 01-04-2016

Tabela 1 - Comparação entre células estaminais embrionárias e células estaminais adultas

	Células Estaminais Embrionárias	Células Estaminais Adultas
Auto-renovação	Capacidade de Auto-renovação	Capacidade de Auto-renovação
Potencial de Diferenciação	Totipotentes ou Pluripotentes	Pluripotentes ou Multipotentes
Fonte de Isolamento	Massa interna do blastocisto	Tecidos adultos e fetais
Proliferação em Cultura	Ilimitada	Limitada
Vantagens para Terapia	Fonte ilimitada de células indiferenciadas; grande capacidade de diferenciação	Fonte autóloga de células; não apresentam considerações éticas

E quanto a sua capacidade de replicação, segundo Lagasse et al. (2000), Goodell et al. (2001) e Calloni et al. (2014) elas podem ser totipotentes, pluripotentes ou multipotentes, oligopotentes e unipotentes.

- Totipotentes: Células capaz de se diferenciar em todos os tecidos do corpo (CALLONI et al., 2014; GOODELL et al., 2001; LAGASSE et al., 2000).

- Pluripotentes/Multipotentes: Células capaz de se diferenciar em quase todos os tecidos do corpo (CALLONI et al., 2014; GOODELL et al., 2001; LAGASSE et al., 2000).

- Oligopotentes: Células capaz de se diferenciar em poucos tecidos do corpo (CALLONI et al., 2014; GOODELL et al., 2001; LAGASSE et al., 2000).

- Unipotentes: Células capaz de se diferenciar em um único tecido do corpo (CALLONI et al., 2014; GOODELL et al., 2001; LAGASSE et al., 2000).

No corpo, as células vivem em “nichos” especializados, microambientes que regulam o crescimento e a diferenciação. Entender o

microambiente das células-tronco é um importante tópico, sendo que o isolamento de células oriundas da geléia de Wharton tem um grande potencial de armazenamento, pois a seleção celular é facilitada (ÇELEBI-SALTIK; UÇKAN-ÇETINKAYA, 2015).

Em 2006 a comissão de células mesenquimais e da SITC propôs critérios mínimos para a definição de CTMs, iniciando em designa-las como células estromais mesenquimais multipotentes, como a adesão aos utensílios de plástico para cultura, a expressão do antígeno de superfície específica e o potencial de diferenciação multipotente (TAGHIZADEH et al., 2011; TROYER; WEISS, 2008).

Em 2012, Cardoso et al. realizaram estudos com geléia de Wharton do cordão umbilical de bovinos e Zeddou et al. (2014) realizaram estudos com o cordão umbilical e o isolaram de acordo com a capacidade de aderência ao plástico corroborando com Taghizadeh et al. (2011), onde os segmentos foram plaqueados, e colônias de células foram observadas, comprovando a capacidade de proliferação celular.

Recentemente, foi realizado estudo *in vitro* com extrato proteico de tendão bovino tendo como finalidade adquirir o fenótipo de tenócitos (elementos celulares do tendão) maduros para o tratamento de tendinopatias, comprovando que no tendão também há fatores de crescimento que estimulam células multipotentes (AUGUSTO et al., 2016).

Entretanto, para que essas células sejam empregadas em patologias, é necessária sua avaliação. Uma técnica vem sendo utilizada, é a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Técnica de alto custo, porém rápida, objetiva e quantitativa, que permite a identificação e quantificação das células por meio de marcadores característicos de células hematopoiéticas.

Marcadores como CD34 e CD44 que são marcadores de células-tronco (NAKAGE et al., 2005), utilizados para o uso em terapias regenerativas futuras além dos CD45, CD73, CD105, CD90 e CD14.

Na análise de citometria de fluxo das CTMs deve demonstrar a máxima expressão para CD105, CD73 e CD90 e expressão mínima para CD45,

CD34, CD14, CD19 e proteínas de classe II, demonstrando capacidade de se diferenciar em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas *in vitro* (DOMINICI et al., 2006; NAKAGE et al., 2005).

1.3 CÉLULAS-TRONCO DA GELÉIA DE WHARTON DO CORDÃO UMBILICAL

A escolha por cordão umbilical vem chamando bastante atenção por ser um método não invasivo e livre de considerações éticas, podendo ser coletado a partir de material fetal descartado logo após o nascimento sem riscos a doadora (TAGHIZADEH et al., 2011), apresentando consequentemente baixo custo e fonte abundante em células (IACONO et al., 2015), sendo o responsável pelo fluxo sanguíneo entre mãe e feto (CORRAO et al., 2013).

Formado nas primeiras semanas de gestação, o cordão umbilical é revestido por epitélio umbilical, em seu interior existe um invólucro de vasos (uma veia e duas artérias) e também um tecido conjuntivo fibroso chamado geléia de Wharton (AZALONE et al., 2010; CARDOSO et al., 2012; CORRAO et al., 2013; TAGHIZADEH et al., 2011; WEISS et al., 2008).

A geléia de Wharton foi observada primeiramente por Thomas Wharton em 1656. Suas células são células-tronco mesenquimais primitivas que migraram da região AGM para o cordão umbilical durante a organogênese dos tecidos extra-embrião para o fígado, baço e medula do feto e ali permaneceram durante toda a gestação (SOUZA, 2012; TAGHIZADEH et al., 2011) possuindo alto potencial de replicação, sendo formada por 95% de proteoglicanos e ácido hialurônico, matriz extra-celular contendo colágeno tipo IV e glicoproteínas, apresentando, ainda, numerosas mitocôndrias e aparelhos de Golgi (ÇELEBI-SALTIK; UÇKAN-ÇETINKAYA, 2015; CORRAO et al., 2013; VASQUES et al., 2003).

Suas células contém características fibroblásticas (células envolvidas na produção de fatores de crescimento e diferenciação celular) (CORRAO et al., 2013) podendo ser encontradas em maior concentração ao redor dos vasos umbilicais, tendo como função o amortecimento dos vasos presentes na região (CORRAO et al., 2013; VASQUES et al., 2003).

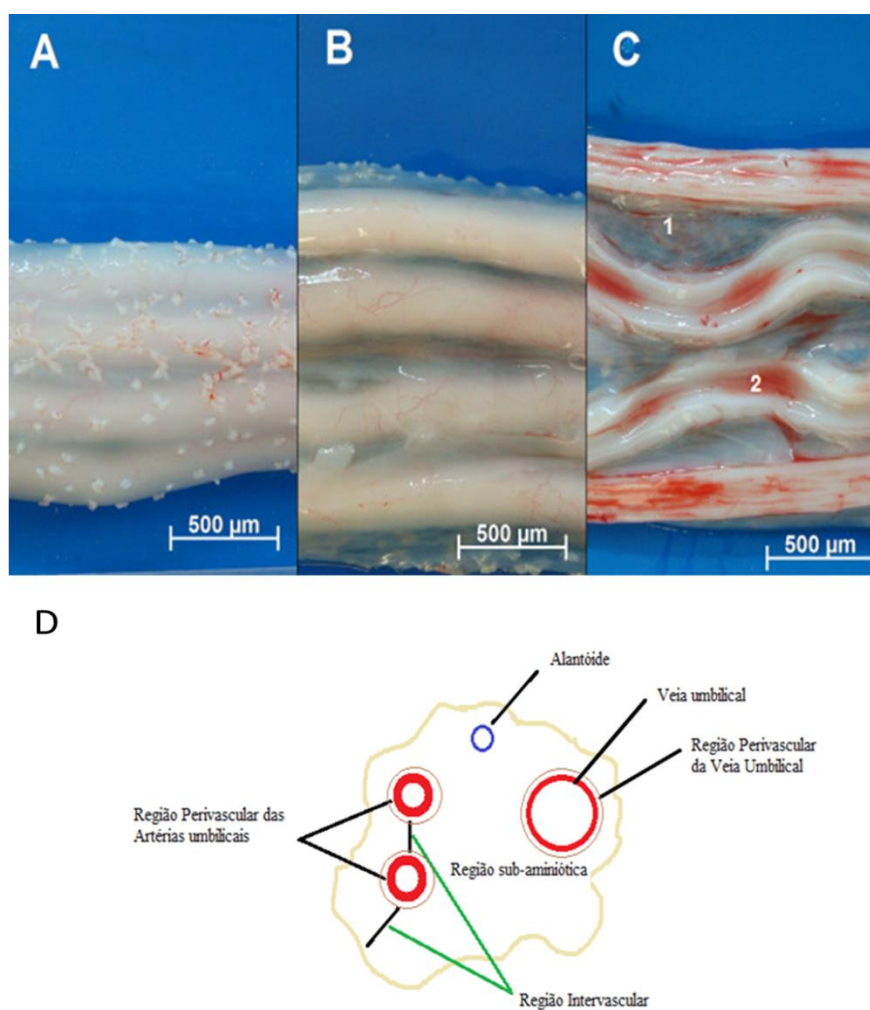


FIGURA 4 – (A) cordão umbilical de bovinos rodeado pelo epitélio amniótico (B) cordão umbilical de bovinos sem o epitélio amniótico destacando a geléia de Wharton entre as artérias e as veias (C) corte transversal do cordão umbilical de bovinos (D) desenho esquemático de um corte longitudinal do cordão umbilical de bovinos.

Fonte: Cardoso et al, (2012)

Atualmente este tecido é uma valiosa fonte de células-tronco. Células-tronco perinatais representam uma ponte entre células embrionárias e células adultas. Essa população de células atende alguns critérios de acordo com Anzalone et al. (2010), onde podem se auto-renovar e induzir a diferenciação de vários tipos celulares, além de ser expandida, geneticamente manipulado e diferenciada *in vitro*, tornando-os de muito interesse (ANZALONE et al., 2010; CARDOSO et al., 2012; TROYER; WEISS, 2008; WEISS et al., 2008).

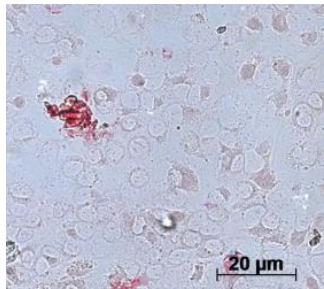
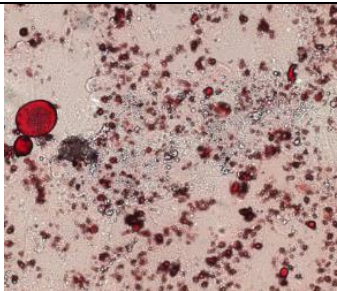
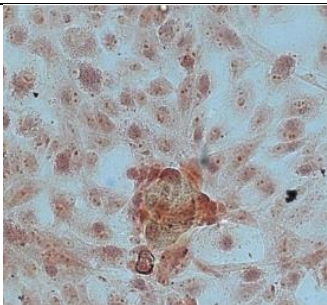
Pinto Filho et al. (2013), e Maia et al. (2013) corroboram com Taghizadeh et al. (2011) sobre a necessidade de maiores estudos sobre as células-tronco oriundas da geléia de Wharton para garantir sua segurança e eficácia, porém já garantem sobre sua ação imunoprivilegiada, imunossupressora, capacidade de diferenciação multipotente/pluripotente e por estar prontamente disponíveis como uma fonte de células, podendo ser uma importante fonte de terapia celular em um futuro próximo para tratar várias doenças e melhorar a qualidade de vida de muitos pacientes.

1.4 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Zeddou et al. (2014) analisou a capacidade de diferenciação celular do cordão umbilical *in vitro* utilizando colorações específicas como óleo vermelho, fosfatase alcalina, Von Kassa, para análise adipogênica, osteogênica, condrogênica e obtiveram resultados positivos corroborando com Cardoso et al. (2012) onde também obtiveram os resultados positivos ao analisar a geléia de Wharton do cordão umbilical de bovinos utilizando colorações como vermelho de alizarina para análise osteogênica, safranina O para análise condrogênicas e óleo vermelho para análise adipogênicas, fato também demonstrado no estudo realizado por Corrao et al. (2013), onde mais uma vez se comprova o alto poder de diferenciação celular.

Iacono et al. (2015) realizaram estudos *in vitro* com sangue do cordão umbilical e da geléia de Wharton do cordão umbilical para ajudar a definir o potencial de diferenciação e segurança das células-tronco para utilização terapêuticas.

Tabela 2 - Colorações utilizadas para definir potencial de diferenciação das células-tronco

Potencial de diferenciação	de Colorações	Células diferenciadas
Osteogênica	Alizarin Red	
Adipogênica	Oil Red	
Condrogênica	Safranin O	

Fonte: Cardoso et al, (2012)

Quando estudado as células tronco mesenquimais do sangue do cordão umbilical de ovelhas pode ser observado seu alto poder de

diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica (FADEL et al., 2011; FUCHS et al., 2005; JAGER et al., 2006).

Quando comparado o poder de diferenciação das células em relação aos equinos, o sangue do cordão umbilical se diferenciou em células adipogênicas, condrogênicas, osteogênicas, hepatogênicas, miogênicas (BURK et al., 2013; CARRADE et al., 2012; DE SCHAUWER et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2012; DE SCHAUWER et al., 2013; DE SCHAUWER et al., 2014; KANG et al., 2013; TOUPADAKIS et al., 2010) e tenogênica (MOHANTY et al., 2014), já as células da geléia de Wharton também apresentaram grande poder de diferenciação, se transformando por seu alto poder em se diferenciar em células neurogênicas além das encontradas anteriormente como adipogênica, condrogênica e osteogênica (BARBERINI et al., 2014; BURK et al., 2013; CARRADE et al., 2012; DE SCHAUWER et al., 2014; LANGE-CONSIGLIO et al., 2011; LOVATI et al., 2011; MARTINO et al., 2011; PAEBST et al., 2014; TOUPADAKIS et al., 2010).

Quanto aos carnívoros, as células da geléia de Wharton em cães apresentam alto potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica (FILIOLI URANIO et al., 2014; KANG et al., 2012; LEE et al., 2013; RYU et al., 2012; SEO et al., 2012;), enquanto que as células do sangue do cordão umbilical apresentaram potencial osteogênico, condrogênico e neurogênico (JANG et al., 2008; SEO et al., 2009). Já em gatos, foram estudadas somente as células do sangue do cordão umbilical, apresentando alto poder de diferenciação neurogênico (JIN et al., 2008).

Os bovinos apresentaram alto poder de diferenciação muito parecidos tanto para as células do sangue do cordão umbilical quanto para as células da geléia de Wharton, se diferenciando em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas (CARDOSO et al., 2012; RAOUFI et al., 2011; SINGH et al., 2013), e também foi encontrado alto poder de diferenciação neurogênica quando estudada as células da geléia de Wharton (CARDOSO et al., 2012).

Nos caprinos e nos búfalos foram estudadas somente as células da geléia de Wharton e ambos apresentaram alto poder de diferenciação

osteogênica, condrogênica e adipogênica (AZARI et al., 2011; BABAEI et al., 2008; CO et al., 2014; PRATHEESH et al., 2014; SREEKUMAR et al., 2014).

E finalizando, em suínos, onde foram estudadas as células do sangue do cordão umbilical e geléia de Wharton, mostrando também alto poder de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (KANG et al., 2012; KUMAR et al., 2007) e neurogênica (CARLIN, et al., 2006; MITCHELL, et al., 2003).

Tendo a comparação ou não das células do sangue do cordão umbilical e das células da geléia de Wharton, pode-se observar a alta capacidade de diferenciação celular que os mesmos apresentam, podendo ser utilizados em tratamentos futuros e métodos preventivos. E embora sendo muito utilizada na medicina humana a implantação em animais ainda é bastante limitada, e por este motivo, os estudos são realizados com cordão umbilical de bovinos – por sua semelhança gestacional aos humanos – a fim de encontrar as respostas necessárias para seu uso frequente dentro das clínicas proporcionando melhor qualidade de vida aos mesmos.

2 OBJETIVO

✓ Geral: Possibilidade de obtenção de células-tronco mesenquimais oriundas do cordão umbilical de bovinos nos três trimestres de gestação para fins biotecnológicos e terapêuticos em animais de produção.

✓ Específico: Geléia de Wharton como fonte potencial de célula-tronco mesenquimais.

3 CONCLUSÃO

➤ As células-tronco mesenquimais obtidas da geléia de Wharton do cordão umbilical de bovinos nos diferentes trimestres de gestação são células indiferenciadas capaz de se diferenciar em vários tecidos do corpo, abrindo uma série de possibilidades no campo terapêutico, científico, reprodutivo e demais áreas de conhecimento produzindo melhor qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

ANZALONE, R.; LO IACONO, M.; CORRAO, S.; MAGNO, F.; LORIA, T.; CAPPELLO, F.; ZUMMO, G.; FARINA, F.; LA ROCCA, G. New emerging potentials for human Wharthon's jelly mesenchymal stem cells: Immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. **Stem Cells Dev.**, v. 19, n. 4, p. 423-438, 2010.

AUGUSTO, L.M.M.; AGUIAR, D.P.; BONFIM, D.C.B.; CAVALCANTI, A.S.; CASADO, P.L.; DUARTE, M.E.L. Células mesenquimais do estroma da medula óssea tratadas com extrato de tendão bovino adquirem o fenótipo de tenócitos maduros. **Rev. Bras. Ortop.**, v. 51, n. 1, p. 70-74, 2016.

AZARI, O.; BABAEI, H.; DERAKHSHANFAR, A.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S.N.; POURSAHEBI, R.; MOSHREFI, M. Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. **Vet. Res. Commun.**, v. 35, n. 4, p. 211-222, 2011.

BABAEI, H.; MOSHREFI, M.; GOLCHIN, M.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S.N. Assess the pluripotency of caprine umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal cells by RT-PCR analysis of early transcription factor nanong. **Iran J. Vet. Surg.**, v. 3, n. 8, p. 57-65, 2008.

BARBERINI, D.J.; FREITAS, N.P.; MAGNONI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUDANO, M.J.; GOLIM, M.A.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from boné marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophetypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 5, n. 1, p. 25, 2014.

BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; JUELKE, H.; KASPER, C.; STASZYK, C.; BREHM, W. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **Vet. J.**, v. 195, n. 1, p. 98-106, 2013.

CALLONI, R.; VIEGAS, G.S.; TURCK, P.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J.A.P. Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. **Cytotherapy**, v. 16, n. 1, p. 3-16, 2014.

CANCEDDA, R.; BIANCHI, G.; DERUBEIS, A.; QUARTO, R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. **Stem cells**, v. 21, n. 5, p. 610-619, 2003.

CARRADE, D.D.; LAME, M.W.; KENT, M.S.; CLARK, K.C.; WALKER, N.J.; BORJESSON, D.L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. **Cell Med.**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2012.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; NOVAIS, J.B.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; ANDRADE, A.L.; GAMEIRO, R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. **BMC Biotechnol.**, v. 12, n. 18, p. 1-11, 2012.

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

ÇELEBI-SALTIK, B.; UÇKAN-ÇETINKAYA, D. Human umbilical cord-derived stem cells. **Stem Cells Fundamen. Pract.**, v. 1, n. 1, p. 19-22, 2015.

CHERNYKH, E.R.; STUPAK, V.V.; MURADOV, G.M.; SIZIKOV, M.Y.; SHEVELA, E.Y.; LEPLINA, O.Y.; TIKHONOVA, M.A.; KULAGIN, A.D.; LISUKOV, I.A.; OSTANIN, A.A.; KOZLOV, V.A. Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. **Bull. Exp. Biol. Med.**, v. 143, n. 4, p. 543-547, 2007.

CO, C.; VICKARYOUS, M.K.; KOCH, T.C. Membrane culture and reduce oxygen tension enhances cartilage matrix formation from equine cord blood mesenchymal stromal cells *in vitro*. **Osteoarthr. Cartil.**, v. 22, n. 3, p. 472-480, 2014.

CORRAO, S.; LA ROCCA, G.; LO IACONO, M.; CORSELLO, T.; FARINA, F.; ANZALONE, R. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. **Histol. Histopathol.**, v. 28, n. 10, p. 1235- 1244, 2013.

Células estaminais. Criovida, preserve a vida. Acesso em: 01/04/2016. Disponível em: www.criovida.pt/celulas-estaminais/

CUMANO, A.; GODIN, I. Ontogeny of the hematopoietic system. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 25, p. 745-785, 2007.

DE SCHAUWER, C.; VAN DE WALLE, G.R.; PIEPERS, S.; HOOGEWIJS, M.K.; GOVAERE, J.L.; MEYER, E.; VAN SOOM, A. Successful isolation of equine mesenchymal stromal cells from cryopreserved umbilical cord blood-derived mononuclear cell fractions. **Equine Vet.**, v. 45, p. 518-522, 2013.

DE SCHAUWER, C.; GOOSSENS, K.; PIEPERS, S.; HOOGEWIJS, M.K.; GOVAERE, J.L.; SMITS, K.; MEYER, E.; VAN SOOM, A. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. **Stem Cell Res. Ther.**, v. 5, p. 6, 2014.

DE SCHAUWER, C.; PIEPERS, S.; VAN DE WALLE, G.R.; DEMEYERE, K.; HOOGEWIJS, M.K.; GOVAERE, J.L.; BRAECKMANS, K.; VAN SOOM, A.; MEYER, E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry A.**, v. 81, p. 312-323, 2012.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; CORNILIE, P.; DE VliegHER, S.; VAN DE WALLE, G.R.; HOOGEWIJS, M.; DECLERCQ, H.; GOVAERE, J.; DEMEYERE, K.; CORNELISSEN, M.; VAN SOOM, A. Optimization of the isolation, culture, and characterization of equine umbilical cord blood mesenchymal stromal cells. **Tissue Eng. Part. C. Methods**, v. 17, p. 1061-1070, 2011.

DIMITRIOU, H.; MATSOUKA, C.; PERDIKOYANNI, C.; STIAKAKI, E.; BOLONAKI, I.; LYDAKI, E.; KOUMANTAKIS, E.; KALMANTI, M. Phenotypic characteristics of cord blood hemopoietic cells. **Leuk. Res.**, v. 22, n. 8, p. 755-758, 1998.

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

FADEL, L.; VIANA, B.R.; FEITOSA, M.L.; ERCOLIN, A.C.; ROBALLO, K.C.; CASALS, J.B.; PIERI, N.C.; MEIRELLES, F.V.; MARTINS Ddos, S.; MIGLINO, M.A.; AMBRÓSIO, C.E. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cells sources in sheep. **Acta. Cir. Bras.**, v. 26, n. 4, p. 267-273, 2011.

FUCHS, J.R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, S.; ZAND, S.; VACANTI, J.P.; FAUZA, D.O. Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 7, p. 958-964, 2005.

GOODELL, M.A.; JACKSON, K.A.; MAJKA, S.M.; MI, T.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C.J.; MAJESKY, M.W.; ENTMAN, M.L.; MICHAEL, L.H.; HIRSCHI, K.K. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 938, p. 208-218, 2001.

HÜTTMANN, A.; GUTERSOHN, A.; NOPPENY, R.; NEUMANN, T.; ERBEL, R.; DÜHRSEN, U. Rapid succession of peripheral blood progenitor cell mobilization cycles in patients with chronic heart failure: effects on the hematopoietic system. **Transfusion**, v. 46, n. 8, p. 1424-1431, 2006.

IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: an update on their features and clinical application. **Reprod. Dom. anim.**, v. 50, n. 3, p. 353-364, 2015.

FIRMINO, D. A.J. Importância médica legal, requisitos legais e serviços associados à criopreservação das células estaminais do sangue do cordão umbilical em Portugal. **Dissertação de candidatura de mestre – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto**. Acesso em: 01/04/2016. Disponível em:

https://sigarra.up.pt/fcup/pt/pub_geral.show_file?pi_gdoc_id=611078

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; ZON, L.I. Hematopoiesis. **Development**, v. 140, n. 12, p. 2463-2467, 2013.

JAGER, M.; BACHMANN, R.; SCHARFSTADT, A.; KRAUSPE, R. Ovine cord blood accommodates multipotent mesenchymal progenitor cells. **In vivo**, v. 20, n. 2, p. 205-214, 2006.

JANG, B.J.; BYEON, Y.E.; LIM, J.H.; RYU, H.H.; KIM, W.H.; KOYAMA, Y.; KIKUCHI, M.; KANG, K.S.; KWEON, O.K. Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenic in bone defect model dogs. **J. Vet. Sci.**, v. 9, n. 4, p. 387-393, 2008.

JIN, G.Z.; YIN, X.J.; YU, X.F.; CHO, S.J.; CHOI, E.G.; LEE, Y.S.; JEON, J.T.; YEE, S.T.; KONG, I.K. Generation of neuronal-like, cells from umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells of a RFP-transgenic cloned cat. **J. Med. Vet. Sci.**, v. 70, n. 7, p. 723-726, 2008.

KANG, J.G.; PARK, S.B.; SEO, M.S.; KIM, H.S.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **J. Vet. Sci.**, v. 14, n. 3, p. 367-371, 2013.

KANG, B.J.; RYU, H.H.; PARK, S.S.; KOYAMA, Y.; KIKUCHI, M.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. **J. Vet. Sci.**, v. 13, n. 3, p. 299-310, 2012.

KUMAR, B.M.; YOO, J.G.; OCK, S.A.; KIM, J.G.; SONG, H.J.; KANG, E.J.; CHO, S.K.; LEE, S.L.; CHO, J.H.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. *In vitro* differentiation of mesenchymal progenitor cells derived from porcine umbilical cord blood. **Mol. Cells**, v. 24, n. 3, p. 343-350, 2007.

LAGASSE, E.; CONNORS, H.; AL-DHALIMY, M.; REITSMA, M.; DOHSE, M.; OSBORNE, L.; WANG, X.; FINEGOLD, M.; WEISSMAN, I.L.; GROMPO, M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nat. Med.**, v. 6, n. 11, p. 1229-1234, 2000.

LANGE- CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; RUTIGLIANO, L.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. *In vitro* studies of horse umbilical cord matrix-derived cells: from characterization to labeling for magnetic resonance imaging. **Open Tissue Eng. Regen. Med. J.**, v. 6, n.4, p. 120-133, 2011.

LEE, K.S.; CHA, S.H.; KANG, H.W.; SONG, J.Y.; LEE, K.W.; KO, K.B.; LEE, H.T. Effects of serial passage on the characteristics and chondrogenic differentiation of canine umbilical cord matrix derived mesenchymal stem cells. **Asian-Australas J. Anim. Sci.**, v. 26, n.4, p. 588-595, 2013.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Vet. Res. Commun.**, v. 35, p. 103-121, 2011.

MAIA, L.; DE VITA, B.; MORAES, C.N.; DESTRO, F.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.; AMORIM, R.M. Considerações sobre a obtenção, processamento, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco mesenquimais em medicina equina. **Vet. Zootec.**, v. 20, n. 3, p. 359-379, 2013.

MARTINO, N.A.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F.; VALENTINI, L.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; AMBRUOSI, B.; SCIIORSCI, R.L.; LACALANDRA, G.M.; RESHKIN, S.J.; DELL'AQUILA, M.E. Functional expression of the extracellular calcium sensing receptor (CaSR) in equine umbilical cord matrix size-sieved stem cells. **PLoS One**, v. 6, n, 3, p. e17714, 2011.

MEZEY, É. On the origin of blood cells: hematopoiesis revisited. **Oral Dis.**, v. 22, n. 4, p. 247-248, 2016.

MITCHELL, K.E.; WEISS, M.L.; MITCHELL, B.M.; MARTIN, P.; DAVIS, D.; MORALES, L.; HELWING, B.; BEERENSTRAUCH, M.; ABOU-EASA, K.; HILDRETH, T.; TROYER, D.; MEDICETTY, S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. **Stem Cells**, v. 21, n. 1, p. 50-60, 2003.

MOHANTY, N.; GULATI, B.R.; KUMAR, R.; GERA, S.; KUMAR, P.; SOMASUNDARAM, R.K.; KUMAR, S. Immunophenotypic characterization and tenogenic differentiation os mesenchymal stromal cells isolated from equine umbilical cord blood. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 50, n. 6, p. 538-548, 2014.

NAKAGE, A.P.M.; SANTANA, A.E.; CÁPUA, M.L.B.; COELHO, P.S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciênc. Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NOTTA, F.; ZANDI, S.; TAKAYAMA, N.; DOBSON, S.; GAN, O.I.; WILSON, G.; KAUFMANN, K.B.; McLEOD, J.; LAURENTI, E.; DUNANT, C.F.; McPHERSON, J.D.; STEIN, L.D.; DROR, Y.; DICK, J.E. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. **Science**, v. 351, n. 6269, p. aab2116, 2016.

PAEBST, F.; PIEHLER, D.; BREHM, W.; HELLER, S.; SCHROECK, C.; TARNOK, A.; BURK, J. Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition. **Cytometry A**, v. 85, n. 8, p. 678-687, 2014.

PAIK, E.J.; ZON, L.I. Hematopoietic development in the zebrafish. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 54, n. 6-7, p. 1127-1137, 2010.

PINTO FILHO, S.T.L.; TREICHEL, T.L.E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J.S.; ROSA, M.B.; DALMOLIN, F.; BRUN, M.V.; KRAUSE, A.; PIPPI, N.L. Células-tronco

mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Vet. zootec.**, v. 20, p. 49-59, 2013.

PRATHEESH, M.D.; GADE, N.E.; DUBEY, P.K.; NATH, A.; SIVANARAYANAN, T.B.; MADHU, N.D.; SHARMA, B.; AMARPAL, SAIKUMAR, G.; SHARMA, G.T. Molecular characterization and xenogenic application of Wharton's jelly derived caprine mesenchymal stem cells. **Vet. Res. Commun.**, v. 38, n. 2, p. 139-148, 2014.

RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. On the Origin of the Term "Stem Cell". **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 35-38, 2007.

RAOUI, M.F.; TAJIK, P.; DEHGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 46, n. 1, p. 95-99, 2011.

RYU, H.H.; KANG, B.J.; PARK, S.S.; KIM, Y.; SUNG, G.J.; WOO, H.M.; KIM, W.H.; KWEON, O.K. Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. **J. Med. Vet. Sci.**, v. 74, n. 12, p. 1617-1630, 2012.

SEO, M.S.; PARK, S.B.; KANG, K.S. Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. **Cell Transplant.**, v. 21, n. 7, p. 1493-1502, 2012.

SEO, M.S.; JEONG, Y.H.; PARK, J.R.; PARK, S.B.; RHO, K.H.; KIM, H.S.; YU, K.R.; LEE, S.H.; JUNG, J.W.; LEE, Y.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **J. Vet. Sci.**, v. 10, n. 3, p. 181-187, 2009.

SINGH, J.; MANN, A.; KUMAR, D.; DUHAN, J.S.; YADAV, P.S. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent

mesenchymal stem cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 49, n. 6, p. 408-416, 2013.

SOUZA, M. K. Células-tronco de geléia de Wharton: Futuras aplicações clínicas. **Stem Cell Rev.**, n. 10, 2012. Disponível em: <http://www.cordvida.com.br/new/files/stemcellreviewedicao10edit.pdf>. Acesso em: 20 maio 2015.

SREEKUMAR, T.R.; ANSARI, M.M.; CHANDRA, V.; SHARMA, G.T. Isolation and characterization of buffalo Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells. **J. Stem Cell Res. Ther.**, v. 4, 2014.

TAGHIZADEH, R.R.; CETRULO, K.J.; CETRULO, C.L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. **Placenta**, v. 32, n. 4, p. 5311-5315, 2011.

TOUPADAKIS, C.A.; WONG, A.; GENETOS, D.C.; CHEUNG, W.K.; BORJESSON, D.L.; FERRARO, G.L.; GALUPPO, L.D.; LEACH, J.K.; OWENS, S.D.; YELLOWLEY, C.E. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. **Am. J. Vet. Res.**, v. 71, n. 10, p. 1237-1245, 2010.

TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591-599, 2008.

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

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACCHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 78, n. 5, p. 361-373, 2011.

VASQUES, F.A.P.; MORON, A.F.; MURTA, C.G.V.; GONÇALVES, T.R.; CARVALHO, F.H.C. Correlação da área do cordão umbilical com parâmetros antropométricos em gestação normais. **Radiol. Bras.**, v. 36, n. 5, p. 299-303, 2003.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1418-1419, 2000.

VOLTARELLI, J.C.; COURI, C.E.B. Stem cells transplantation of type 1 diabetes mellitus. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 1, n. 1, p. 4, 2009.

WEISS, M.L.; TROYER, D.L. Stem cells in the umbilical cord. **Stem Cells Rev.**, v. 2, n. 2, p. 155-162, 2006.

WEISS, M.L.; ANDERSON, C.; MEDICETTY, S.; SESHAREDDY, K.B.; WEISS, R.J.; VANDERWERFF, I.; TROYER, D.; MCINTOSH, K.R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. **Stem cells**, v. 26, n. 11, p. 2865-2875, 2008.

WEISSMAN, I.L. Stem Cells: Units of development, review units of regeneration, and units in evolution. Stanford University School of Medicine. Department of Pathology. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2000.

ZEDDOU, M.; RELIC, B.; MALAISE, M.G. Umbilical cord fibroblastos: could they be considered as mesenchymal stem cells?. **World J. Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 367-370, 2014.

CAPITULO II

Cell tissue research

Regular article R6

Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy

Tereza C Cardoso^{1*}, Lucas H Okamura¹, Jamila C Baptistella^{1,2}, Roberto Gameiro^{1,3}, Helena L Ferreira⁴, Márcia Marinho¹, Eduardo F Flores⁵

1UNESP- Sao Paulo State University, Laboratory of Animal Virology and Cell Culture College of Veterinary Medicine, Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brazil,

2UNESP- Sao Paulo State University, Domestic Animals Anatomy section, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brazil,

3UNESP- Sao Paulo State University, Domestic Animals Embryology section, College of Veterinary Medicine, Araçatuba, São Paulo, 16050-680, Brazil,

4 Department of Veterinary Medicine, FZEA- USP- University of Sao Paulo, Av. Duque de Caxias Norte, 225, Pirassununga – SP, 13635-900, Brazil;

5Departament of Preventive Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria, UFSM, College of Veterinary Medicine, Santa Maria, RS 97115-900, Brazil

*Corresponding author: Tereza C Cardoso

E-mail address: tcardoso@fmva.unesp.br

Tel:+55(18)36363200

ABSTRACT - The possibility for isolating bovine mesenchymal multipotent stromal cells (MSCs) from fetal adnexa is an interesting prospect due to the potential use of these cells in biotechnological applications. However, little is known about the properties of these progenitor cells in the bovine species. Wharton's jelly (WJ) MSC cells were obtained from the umbilical cord of bovine fetuses at three different stages of pregnancy and divided into groups 1, 2 and 3 according to gestational trimester. Cell morphology, from three stages of pregnancy, typically appeared fibroblast-like spindle shape, presenting the same viability and number. Moreover, the proliferative ability of T cells in response to a mitogenic stimulus was suppressed when WJMSC cells were added to the culture. Multilineage properties were confirmed by their ability to undergo adipogenic, osteogenic/chondrogenic and neurogenic differentiation. Mesenchymal phenotyping, CD105+, CD29+, CD73+, CD90+ cell markers were detected in all three cell groups, yet these markers were considered more expressed in MSCs of Group 2 ($p < 0.005$). Expression of cytokines IL2, IL6RR, INFAC, INFB1, IFNG, TNF and LTBR were downregulated; whereas IL1F10 expression was upregulated in all tested WJMSCs. The present study demonstrated that WJMSCs harvested from bovine umbilical cord at different gestational stages showed proliferative capacity, immune privileged and stemness potential.

Key words: Stem cells, umbilical cord, immunomodulation, bovine

INTRODUCTION

Wharton's jelly (WJ) is the primitive mucous, connective tissue of the umbilical cord, lying between the amniotic epithelium and umbilical vessels (TAGHIZADEH et al., 2011; TROYER; WEISS, 2008). First described by Thomas Wharton in 1656, this structure is composed mainly by proteoglycans and collagen (CORRAO et al. 2013; CREMONESI et al., 2011). In 2006, in order to pursue standardization, the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee (ISCT) proposed: mesenchymal cells must be designed as multipotent mesenchymal stromal cells (MSC); be adherent to plastic culture ware; specific surface antigen expression; multipotent differentiation potential (CALLONI et al., 2014; DOMINICI et al., 2006; IACONO; MERLO, 2015).

The MSC population in WJ of umbilical cord (UC) present properties that make it of interest (PHAM et al., 2015). For example, these cells are easy to harvest by non-invasive procedures, provide large number of cells without risk to the donor, can be expanded, genetically manipulated and differentiated in vitro (CALLONI et al., 2014; CORRAO et al., 2013; CREMONESI et al., 2011; TROYER; WEISS, 2008). The immunogenicity of WJMSC was firstly proposed but was not clear at present, although immunosuppressive effects of bone marrow MSC have been extensively studied and tested in several animal species (DE MIGUEL et al., 2012; MUKONOWESHURO et al., 2014; WEISS et al., 2008). Several studies have described WJMSC properties harvested from pregnant women at birth (PRASANNA et al., 2010). Nonetheless, WJMSC from bovine (CARDOSO et al., 2012) and from buffaloes have been reported only recently (SINGH et al., 2013). However, bovine MSCs derived from umbilical cord blood (UCBMSCs), amniotic fluid (AFMSCs) and bone marrow (BMMSCs) have been described (CORREDETTI et al., 2013; CORTES et al., 2013; LU et al., 2011; RAOUFI et al., 2011). Despite of the importance of bovine species as a model for in vitro studies and bovine pregnancy lasts 280 days, like in human beings, there is a lack of information about WJMSCs

isolated during cow pregnancy. In contrast with MSCs from different sources, the characterization of bovine MSCs is far from being completely understood and contradictory information do emerge from the literature.

The aim of this study was to isolate and propagate bovine WJMCS cells collected from umbilical cords at three trimesters of pregnancy. Additionally, comparisons were made regarding to cell viability, T-cell inhibition, telomerase activity, cell proliferation, phenotype, multipotency and immunomodulatory gene expression. This study highlights the possibility potential source of multipotent MSCs and may support their therapeutic and biotechnological use in large animals.

MATERIALS AND METHODS

ISOLATION OF WJMSC FROM BOVINE UMBILICAL CORD AT DIFFERENT STAGES OF PREGNANCY

Bovine umbilical cords (UC) were harvested at a slaughterhouse from pregnant Nelore cows (n=18). The bovine pregnancy was divided into three trimesters, as done in humans and gestational periods were estimated by measuring crown rump length of the fetuses. The first trimester corresponded from 0 to 93 days (n=6 UC; Group 1; Figura 1a); second trimester from 94 to 187 days of pregnancy (n=6 UC; Group 2; Figura 1b), and more six umbilical cords were from third trimester, 188-term of pregnancy corresponded to Group 3 (Figura 1c). UCs were collected according to the Animal Care Committee at University of São Paulo State, Brazil, and were conserved at room temperature in sterile phosphate buffered saline (PBS) supplemented with a penicillin/streptomycin solution containing penicillin 100µg/ml, streptomycin 10µg/ml and amphotericin B 250µg/ml (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

until use (within 3 h). Bovine umbilical segments were sectioned longitudinally to expose the WJ after 3 h. Some incisions were made on the matrix and UC fragments transferred to 25 cm² tissue culture flasks (TPP®, Zollstr, SW). The initial culture and cell expansion were performed as described previously (CARDOSO et al., 2012). The pictures were taken to observe cell morphology for each group at passage 6 (P6) (Figura 1d, e, f), harvested and expanded until they reached subconfluence and analyzed for their capacity for colony forming, viability, T-cell proliferation, telomerase activity, phenotype, and differentiation as well as for immunomodulatory transcripts.

CELL VIABILITY, T-CELL PROLIFERATION, TELOMERASE ACTIVITY AND CELL EXPANSION

Assays for cell viability, T-cell proliferation and telomerase activity were performed according to previous study (CARDOSO et al., 2012). Briefly, cell viability analysis were performed using the In Vitro Toxicology Assay® Kit, MTT-based assay (TOXI-1 Kit; Sigma-Aldrich®) following the manufacturer's instructions. In order to evaluate T-cell proliferation, culture and stimulation were performed according to previous study (CARDOSO et al., 2012). Lymphoproliferation was evaluated as counts per minute by a Matrix9600 beta counter (Packard Instrument Co., Meridien, CT). The ConA was used at 5 µg/ml, PMA and ionomycin at concentration of 50 ng/ml and 1 µg/ml, respectively (Sigma-Aldrich®). A TRAPeze® Telomerase Detection Kit (Millipore™, CA, USA) was used to assess the telomerase activity in all groups (Cardoso et al. 2012). The samples were considered positive when the optical density (OD) was ≥ 0.2 and were negative when OD was ≤ 0.2 . All reported values are means of triplicate samples.

Doubling time for passages (1-10) was performed following the procedure described previously (CORRADETTI et al., 2013). Data representative of three independent experiments was recorded.

***IN VITRO* MULTILINEAGE DIFFERENTIATION ASSAY**

The differentiation potential of bovine-derived WJMSC cells was examined using cells at passage number 6 (P6) in all cell groups according to a previous study (CARDOSO et al., 2012; SILVA et al., 2016). For all procedures 2×10^5 cells/ml were submitted to osteogenic, chondrogenic, adipogenic and neurogenic differentiation according to the manufacturer's instructions (STEMPRO® differentiation medium, Invitrogen®). The neurogenic differentiation was adapted from previous studies (Oda et al. 2013). For osteogenic/chondrogenic differentiation, 2 ml of STEMPRO® osteogenic/chondrogenic differentiation medium was added to undifferentiated cultures added of osteogenic and chondrogenic commercial inducers (STEMPRO®). After 15 days of differentiation, cells were fixed with 4% of paraformaldehyde (Sigma-Aldrich®). For osteogenic differentiation, the Alizarin Red staining (Sigma-Aldrich®) was performed (YANG et al., 2015); and for chondrogenic differentiation 0.5% of toluidine blue solution was added (CARDOSO et al., 2012).

The adipogenic differentiation followed the described protocol (CARDOSO et al., 2012; SILVA et al., 2016). In order to verify adipocytes, the Oil Red staining was performed (CARDOSO et al., 2012). The differentiation of bovine-derived WJMSC cells into neural-like cells followed the procedure described previously, with some modifications (CARDOSO et al., 2012; ODA et al., 2013; SILVA et al., 2016). The neuronal differentiation was confirmed by immunofluorescence for GFAP and nestin cell markers as described previously (CARDOSO et al., 2012). From each experiment, samples from cell

differentiation and undifferentiated cells were harvested for multilineage gene transcription among three studied groups as described below.

FLOW CYTOMETRY

Briefly, 2×10^5 cells at P6 were harvested, washed in PBS and incubated for 18 h at 4 °C with monoclonal antibodies: CD34 (hematopoietic precursor cells and MSCs); CD45 (anti-bone marrow lymphoid cells); CD90 (anti-THy1 antigen); CD105 (anti-endoglin); CD29 (anti-integrin $\beta 1$) all diluted at 1:50; CD73 (anti-nucleotidase) diluted at 1:25 (Sigma-Aldrich®). After, cells were washed three times with PBS plus 0.1% Triton X-100 and 1:50 dilution of the secondary antibody, represented by goat anti-mouse labeled to FITC (Sigma-Aldrich®), was added to 100 μ l of cell suspension, and incubated at 37 °C for 30 min. The cell suspension was washed as previously described, and after the final wash, cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Data were captured with the Attune™ acoustic focusing cytometer system (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). The equipment setting were defined as an initial threshold: 2.500 events/seconds, BL1A filter (488 nm emission) 300 voltage, SSC (scatter complexity) 250 V and FSC (forward scatter) 220 V. After first acquisition, a dot plot graph was obtained and the global compensation was performed to exclude unspecific signals and cell debris (> 103 cells were excluded). Only one fluorophore was used in this analysis, so these parameters could be applied in all analyses. The data were expressed in histogram graph.

MICROARRAY ANALYSIS

Total RNA was isolated from all groups, corresponding to WJMSCs (5 x 10⁵ cells) in triplicate after trypsinization, according to Qiagen RNeasy System™ (Qiagen, Hilden, Germany) manufacture's guide. The total RNA was treated with DNase and reverse transcribed into cDNA using a reverse transcriptase (Superscript III, Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). The Axiom® Genome-Wide BOS 1 Array was used to transcriptome analysis (Affymetrix, Santa Clara, CA). This commercial array was designed to maximize genetic coverage of commercially important cattle breeds, including *Bos taurus*, *Bos indicus*, dairy and beef cattle breeds as well as. The array covers more than 640,000 validated transcript markers representing the genetic diversity of approximately 3 million from Affymetrix Bovine Genomic Database. After hybridization, gene chips were washed and stained with SA-PE and read using an Affymetrix Gene Chip fluidic station and scanner. Analyzed genes, corresponding to positive markers of MSCs, immune related genes and MSCs multipotency, are detailed on Table 1. The average expression was calculated, and Log2 transformed for each gene by Affymetrix Microarray Suite 5.0.

STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using SAS 9.1.2 software package (SAS Institute, Inc.). Data are presented as mean $\pm$ SD. Three replicates for each experiment were performed and the results represent these replicates. One-way analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons or two tailed student t-test, whenever applicable by GraphPad Prism 6.05. A level of $p < 0.005$ was accepted as significant.

RESULTS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF WJMSCS

WJMSCs were cultured individually only during the first passage. After P1, all WJMSCs from each group were transferred to a unique culture flask and proceeded as lineages. The formation of fibroblast-like cells was observed around the second day and in vitro cell expansion was performed until 10 consecutive passages for all groups (Figura 1d, e, f).

The culture conditions were able to promote good cell viability, > 80% after 10 P for all groups; induced inhibition of T-cell proliferation; telomerase activity at satisfactory levels (Figura 2a, b, c, respectively). The percentage of living cells was maintained approximately constant when the passage number remained at a constant level of 10 (Figura 2a). The addition of WJMSC cells to blood monocytes stimulated with ConA or PMA/ionomycin inhibited their proliferation less than 20% in comparison to no addition of WJMSC cells, whereas 80% of proliferation for all groups was observed ($p < 0.005$). In addition, the activity of telomerase was verified and in all groups after 6P same activity could be observed (Figura 2c). The doubling time was measured, calculated, and drawn as a graph whereas consistently increasing rate of growth at P6, observed for each group, respectively (Figura 3a, b, c).

MULTILINEAGE DIFFERENTIATION AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION

Pluripotency was confirmed by the ability of WJMSCs cells to differentiate into osteocytes, adipocytes, chondrocytes, and neuron-like cells. Undifferentiated cells were included in all analysis (Figura 3a, e, i, corresponded to Group 1, Group 2, 3, respectively). Osteogenic differentiation was detected by the matrix calcification shown by Alizarin red staining (Figura 3 b, f, j, corresponded to group 1, 2, 3, respectively). After induction, adipogenic differentiation high number of very small lipid vacuoles that stained positively using Oil Red solution was visualized in group 1, 2 and 3 (Figura 3c, g, l, respectively). Chondrogenic differentiation was confirmed by blue deposits representing glycosaminoglycans (Figura 3d, h, m, corresponded to group 1, 2, 3, respectively). The neurogenic induction was confirmed by positive staining for GFAP and nestin neuro markers in Group 1 (Figura 5b, c), Group 2 (Figura 5e, f) and Group 3 (Figura 5h, i). Undifferentiated cells were also included in group 1, 2 and 3 as control (Figura 5a, d, g, respectively).

The phenotype of WJMSCs obtained from three groups was characterized using flow cytometry (FC) analysis (Figura 6, 7, 8 corresponding to group 1, 2, 3, respectively). All WJMSCs revealed negative results for CD45 and CD34 surface markers at FC analysis in group 1, 2 and 3 (Figura 6a-b, 7a-b, 8a-b, respectively). However, positive results for CD105, CD29, CD73 and CD90 surface markers were recorded at the same rate of 104 cells for all groups (Figura 6, 7, 8). In-Group 1 (Figura 6c), CD105 positive cells were considered at lower rate (45%) when compared to Group 2 (81%; Figura 7c), in groups 2 and 3 (Figura 7e, f; Figura 8e, f, respectively), CD73 (92% and 78%; $p < 0.005$) and CD90 (96% and 79%) were higher expressed, respectively ($p < 0.005$). In comparison, group 2 revealed superior expression of positive markers of MSCs in this study (Figura 7a-f).

GENE EXPRESSION PROFILE

Genes described as being involved in MSCs characterization revealed consistent results with flow cytometric analysis. High transcription levels for MSCs markers THY1 (CD90), NT5E (CD73), ITGB1 (CD29), ENG (CD105) and low levels for CD34 and PTPRC (CD45) were found among WJMSCs (Figura 9a, b, c). When stimulated to differentiate towards adipogenic, chondrogenic and neurogenic lineages, WJMSCs showed substantial transcriptional expression of LEP, FABP4, PPARG, COL1A1, SOX9, GFAP and NES for all WJMSCs (Figura 9a, b, c). The WJMSCs potential to undergo chondrogenesis showed higher pattern of COL1A1 gene expression at Group 2 in comparison to group 1 and 3 (Figura 9b). From the factors measured in this study, IL2, IL6R, INFAC, INFB1, INFG, TNF and LTB, considered pro-inflammatory cytokines, were genetically down regulated in all WJMSCs tested (Figura 9a, b, c; $p < 0.005$). However, IL1F10 was noticeably upregulated, in microarray analysis (Figura 9a). The lack of JSP.1 and DSB (MHC I and II) expression could be observed in this study, amongst WJMSCs from all groups (Figura 9a-c).

DISCUSSION

Extra-gestational tissues have been widely suggested as ideal sources of mesenchymal cells due to their no-invasive harvest, being most of the time all biological material discarded (IACONO; MERLO, 2015; TROYER; WEISS, 2008). Up to the present, limited reports are available regarding to the isolation and characterization of Wharton's jelly derived MSC in farm animal species (CARDOSO et al., 2012; CARLIN et al., 2006; CORRADETTI et al., 2008; SINGH et al., 2013). As previously reported, herein WJMSCs demonstrated at

all gestational periods, satisfactory telomerase activity, viability and MSCs surface markers according to previous studies (CARDOSO et al., 2012). In spite of the fact that non-bovine monoclonal antibodies were used here, several reports have described cross-reaction between animals and human MSCs epitopes (GODOY et al., 2014). Moreover, THY1 (CD90), NT5E (CD73), ITGB1 (CD29) and ENG (CD105) transcripts were confirmed by flow cytometric analysis, confirming the stem cell potential of WJMSCs in this study.

Studies on the isolation and characterization of MSCs from fetal adnexa in humans are rapidly advancing (CORRAO et al., 2013; GOTTIPAMULA et al., 2013; TROYER; WEISS, 2008; WEISS et al., 2008). Some authors reported that MSCs isolated from human umbilical cord matrix, precisely from Wharton's jelly, could be used for therapy of some diseases such amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease, even in cancer treatment (CORRAO et al. 2013; TROYER; WEISS, 2008). However, studies in animal models are still in their infancy. MSCs have been isolated from umbilical cord matrix of cattle, pigs, goats, horses and dogs (CARDOSO et al., 2012; CREMONESI et al., 2008; URANIO et al., 2011). The bovine model could have a critical role in studying fetal adnexa MSC sources, mainly by the similarity to human gestational time. Our study aimed specifically to isolate, expand *in vitro*, and characterize WJMSCs harvested at different gestational stages. Previous studies reported the isolation of WJMSCs from bovine umbilical cord at birth, successfully growing them in culture without fetal calf serum showing pluripotency capacity (CARDOSO et al., 2012; SILVA et al., 2016). Moreover, a recent study has demonstrated that bovine MSCs isolated from amniotic fluid and adipose tissue could be an alternative for nuclear transfer (SILVA et al., 2016). In both studies, the size of bovine MSC derived-Wharton's Jelly cells was found to be smaller when compared to human studies (GOTTIPAMULA et al., 2013; PHAM et al., 2015; TAGHIZADEH et al., 2011) and ruminants MSC-derived from different fetal adnexa sources (CARDOSO

et al., 2012; CORRADETTI et al., 2013; CORTES et al., 2013; RAOUFI et al., 2011; SOMAL et al., 2016). This finding must be investigated in future studies.

The *in vitro* differentiation results support the findings already reported for bovine MSC (CORREDETTI et al., 2013; CORTES et al., 2013; LU et al., 2011; RAOUFI et al., 2011). All WJMSC show high plasticity, being able to differentiate into multiple germ layers, mesoderm and ectoderm. These achieves are in agreement to all studies regarding to bovine MSC and among other species (CREMONESI et al., 2008; ODA et al., 2013; URANIO et al., 2011). WJMSCs, when stimulated to differentiate toward adipogenic lineage, expressed high level of LEP gene that is regarded as intermediate and late marker of adipocyte differentiation, which may be lead to a distinct differentiation characteristic of stem cell, in all gestational periods. The WJMSCs potential to undergo osteogenesis/chondrogenesis showed higher pattern of expression of OMD, POST, OSTF1, and COL1A1, respectively in all groups. As demonstrated previously, WJMSCs proved the ability to undergo astrocyte differentiation, confirmed by GFAP expression already demonstrated for other species (ODA et al., 2013). Taken these results together, it seems that all gestational periods have provide WJMSCs with stemness attributed to MSCs according to International Society for Cellular Therapy (DOMINICI et al., 2006).

Since MSCs are trapped within the Wharton's jelly between day 4 and 12 of embryonic development, and reside there for the whole gestation, they can be harvested after birth of newborn and during pregnancy (TAGHIZADEH et al., 2011). Therefore, WJMSCs that formed during earliest ontogenic period result in significant expansion potential compared to bone marrow mesenchymal cells (TROYER; WEISS, 2008).

There is a considerable controversy regarding the immunogenicity of human MSCs in the literature (DE MIGUEL et al., 2012; MUKONOWESHURO et al., 2014; WEISS et al., 2008), and a lack of information about bovine MSCs. However, porcine umbilical cord-derived stem cells did not induce a considerable immune response *in vivo* but stimulation with interferon gamma

or injection in an inflamed region resulted in immunogenicity (PONCELET et al., 2007). Inflammatory situation prevails during any injury and MSCs could be exposed to such stimuli in many clinical conditions. Not only neighboring cells but also environmental factors like systemic or local inflammation can influence the immune behavior of MSCs (PONCELET et al., 2008). Recent report in fact indicate the role of inflammatory cytokines in effecting functions of mouse MSCs (MUKONOWESHURO et al., 2014).

From the factors measured in this study, IL2, IL6R, INFAC, INFB1, INFG, TNF and LTBR, considered pro-inflammatory cytokines, were genetically down regulated in all bMSCs tested. IL10 cytokine is produced by both myeloid and lymphoid cells. However, it is a good immune suppressor, although some stimulatory effects have been described. Therefore, IL10 cytokine is recognized by its effect on T-cells, macrophages and monocytes for suppress inflammation processes (MUKONOWESHURO et al., 2014; PRASANNA et al., 2010). However, when IL1F10 is express it will down regulate JSP.1 (MHC I) as revealed in WJMSCs cultures. These findings are in accordance to what have been described in human MSCs (WEISS et al., 2008). Results described previously revealed that MSC possess immunosuppressive properties, however they might not be immunoprivileged (DE MIGUEL et al., 2012). The lack of DSB and low JSP.1 expression, observed in this study, is thought to be, in part, responsible for their WJMSC immunoprivileged status, which would mean allogeneic bovine MSC could be used without the risk of immune rejection, a scenario that is attractive for tissue comparative studies.

These findings demonstrated the complexity of studying immunological properties of WJMSCs in vitro, as well as, the difficulty of distinguishing between optimal gestational stages in order to collect Wharton's jelly cells with optimal stemness properties. Finally, WJMSCs collected from bovine umbilical cord at all gestational period showed similar stemness properties.

Acknowledgments The authors thanks the cattle owners for the cooperation in the specimen collection at slaughterhouse. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2012/16715-4). T.C. Cardoso and E.F. Flores are recipients of CNPq (Brazilian Council for Research) funding.

Author's contributions TCC participated in the design of the study, performed the cell culture in all steps, flow cytometric analysis. LHO and JCB participated the preparation of respective umbilical cords. RG and HLF participated also in the design of the study, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. MM and EFF drafted the final version of the manuscript.

Conflict of interest The authors indicate no conflicts of interest

REFERENCES

CALLONI, R.; VIEGAS, G.S.; TURCK, P.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J.A.P. Mesenchymal stromal cells from unconventional model organisms. **Cytotherapy**, v. 16, n. 1, p. 3-16, 2014.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; NOVAIS, J.B.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; ANDRADE, A.L.; GAMEIRO, R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. **BMC Biotechnol.**, v. 12, n. 18, p. 1-11, 2012.

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

CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. Isolation, *in vitro* culture and characterization of foetal umbilical cord stem cells at birth. **Vet. Res. Comm.**, v. 32, p. 139-142, 2008.

CORRADETTI, B.; MEUCI, A.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. **Reproduction**, v. 145, n. 4, p. 391-400, 2013.

CORRAO, S.; LA ROCCA, G.; LO IACONO, M.; CORSELLO, T.; FARINA, F.; ANZALONE, R. Umbilical cord revisited: from Wharton's jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. **Histol. Histopathol.**, v. 28, n. 10, p. 1235- 1244, 2013.

CORTES, Y.; OJEDA, M.; ARAYA, D.; DUEÑAS, F.; FERNÁNDEZ, M.S.; PERALTA, O.A. Isolation and multilineage differentiation of bone marrow

mesenchymal stem cells from abattoir-derived bovine fetuses. **BMC Vet. Res.**, v. 9, p. 133, 2013.

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

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

DE MIGUEL, M.P.; FUENTES-JULIÁN, S.; BLÁZQUEZ-MARTINEZ, A.; PASCUAL, C.Y.; ALLER, M.A.; ARIAS, J.; ARNALICH-MONTIEL, F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Curr. Mol. Med.**, v. 12, n. 5, p. 574-591, 2012.

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

GODOY, R.F.; ALVES, A.L.G.; GIBSON, A.J.; LIMA, E.M.M.; GOODSHIP, A.E. Do progenitor cells from different tissue have the same phenotype? **Res. Vet. Sci.**, v. 96, n. 3, p. 454-459, 2014.

GOTTIPAMULA, S.; MUTTIGI, M.S.; KOLKUNDKAR, U.; SEETHARAM, R.N. Serum free media for the production of human mesenchymal stromal cells: a review. **Cell Prolif.**, v. 46, n. 8, p. 608-627, 2013.

IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: an update on their features and clinical application. **Reprod. Dom. anim.**, v. 50, n. 3, p. 353-364, 2015.

LU, T.; HUANG, Y.; WANG, H.; MA, Y.; GUAN, W. Multi-lineage potential research of bone marrow-derived stromal cells (BMSCs) from cattle. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 172, n. 1, p. 21-35, 2011.

MUKONOWESHURO, B.; BROWN, C.J.F.; FISHER, J.; INGHAM, E. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogenic mouse mesenchymal stem cells. **J. Tissue Eng.**, v. 5, p. 1-15, 2014.

ODA, Y.; TANI, K.; KANEI, T.; HARAGUCHI, T.; ITAMOTO, K.; NAKAZAWA, H.; TAURA, Y. Characterization of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells. **Vet. Res. Commun.**, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2013.

PHAM, P. V.; TRUONG, N. C.; LE, P. T-B.; TRAN, T. D-X.; VU, N. B.; BUI, K. H-T.; PHAN, N. K. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. **Cell Tissue Bank.**, v. 17, n. 2, p. 289-302, 2015.

PONCELET, A. J.; VERCROYSSSE, J.; SALIEZ, A.; GIANDLO, P. Although pig allogenic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vivo, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. **Transplantation**, v. 83, n. 6, p. 783-790, 2007.

PRASANNA, S. J.; GOPALAKRISHNAN, D.; SHANKAR, R. S.; VASANDAN, A. B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p.e9016, 2010.

RAOUFI, M. F.; TAJIK, P.; DEHGHAN, M. M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 46, n. 1, p. 95-99, 2011.

SILVA, C. G.; MARTINS, C. F.; CARDOSO, T. C.; CUNHA, E. R.; BESSLER, H. C.; MARTINS, G. H. L.; PIVATO, I.; BÁO, S. N. Production of bovine embryos and calves cloned by nuclear transfer using mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adipose tissue. **Cell. Reprogram.**, v. 18, n. 2, p. 127-136, 2016.

SINGH, J.; MANN, A.; KUMAR, D.; DUHAN, J.S.; YADAV, P.S. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 49, n. 6, p. 408-416, 2013.

SOMAL, A.; BHAT I. A.; PUDEY, S.; PAUDA, Bs.; THAKUR, N.; SARKAR, M.; CHAUDRA, V.; SAIKUMAR, G.; SHARMA, G. T. A comparative study of growth kinetics, in vitro differentiation potential and molecular characterization of fetal adnexa derived caprine mesenchymal stem cells. **PloS One**, v.11, n. 6, p. e0156821.

TAGHIZADEH, R.R.; CETRULO, K.J.; CETRULO, C.L. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. **Placenta**, v. 32, n. 4, p. 311-315, 2011.

TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591-599, 2008.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A.; CATACCHIO, C.R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and

molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 78, n. 5, p. 361-373, 2011.

WEISS, M. L.; ANDERSON, C.; MEDICETTY, S.; SESHAREDDY, K. B.; WEISS, R. J.; VANDERWERFF, I.; TROYER, D.; MCINTOSH, K. R. Immune Properties of human umbilical cord Wharton's Jelly-derived cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 11, p. 2865-2874, 2008.

YANG, C.; MADHU, V.; THOMAS, C.; YANG, X.; DU, X.; DIGHE, A.; CUI, Q. Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). **Cell Tissue Res.**, v. 362, n. 3, p. 577-585, 2015.

FIGURES CAPTIONS

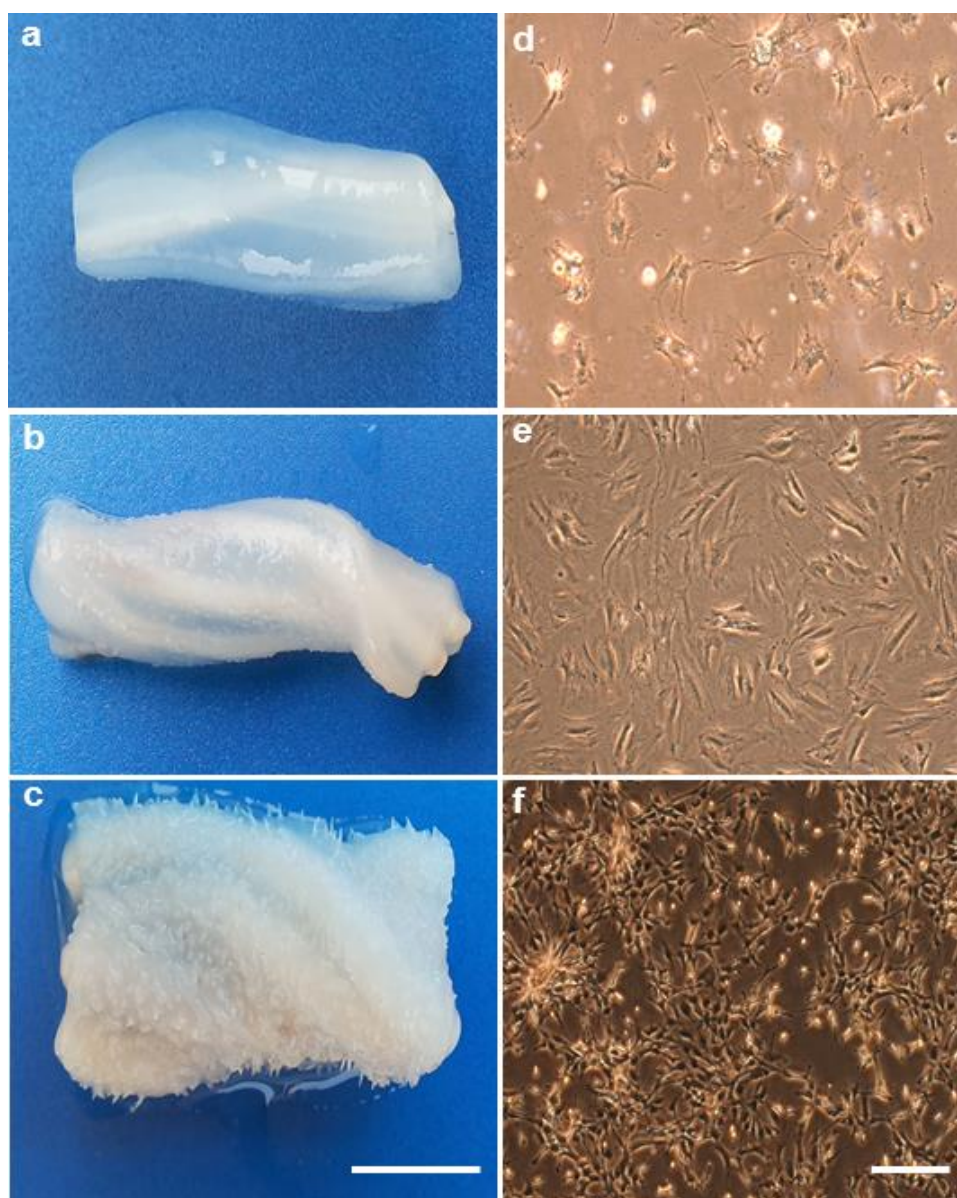


FIGURA 1 - Bovine umbilical cords analyzed in this study. (a) 0 to 93 days corresponding to Group 1; (b) 94 to 187 days corresponding to Group 2; (c) 188-term of pregnancy corresponded to Group 3, bar 500- μ m. (d) ex vivo cultured cell obtained from Wharton's jelly zone corresponded to Group 1; (e) Group 2 and (f) Group 3. After P6 spindle-shaped fibroblast-like appearance can be observed under phase contrast microscopy. Bar 40- μ m.

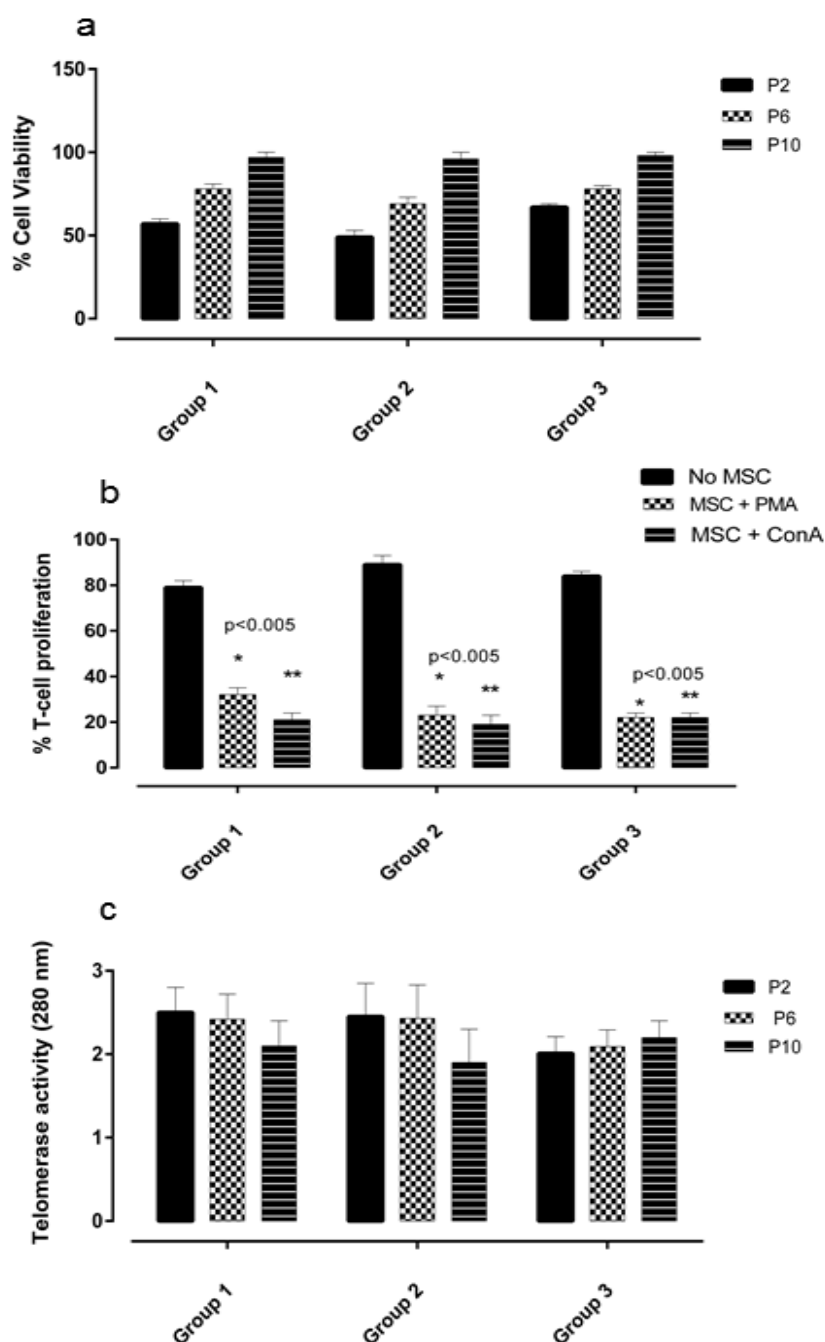


FIGURA 2 - Cell viability, inhibition of T-cell proliferation and telomerase activity. (a) Viability of WJMSC cells measured by MTT based assay at 2, 6 and 10P. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d) of values obtained from four different experiments; (b) Ability of bovine WJMSCs cells to inhibit T-cell proliferation in response to mitogens at 6P, $p < 0.005$ obtained from four different experiments; (c) Telomerase repeat amplification results

obtained from four different experiments. Bars represent all groups at 2P, 6P and 10P.

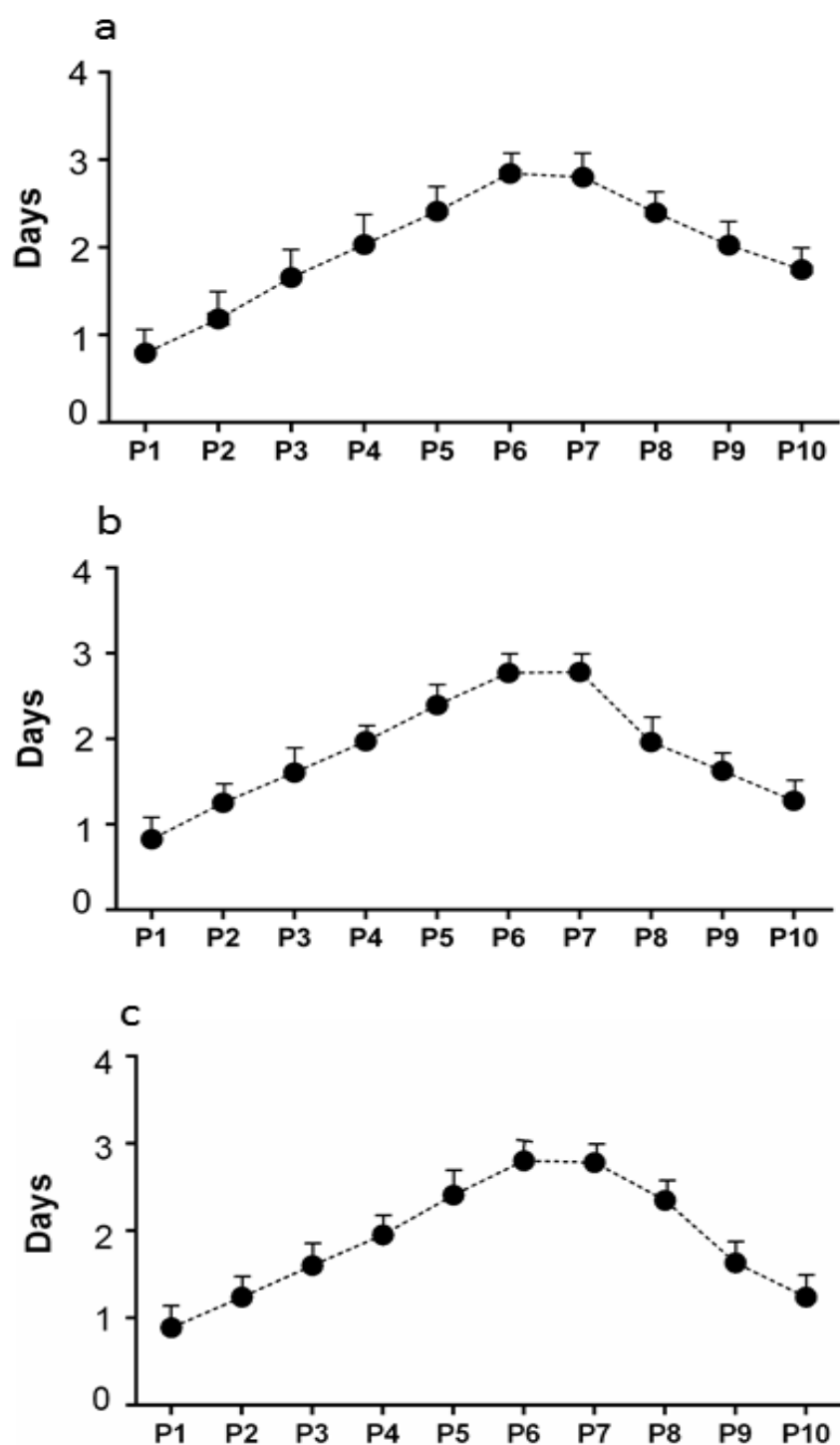


FIGURA 3 - Doubling time over ten passages during cell culture from group 1 (d), 2 (e) and 3 (f). X-axis is represented by number of cell passage and Y-axis by days of culture. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (s.d) of values obtained from four different experiments * $p < 0.05$.

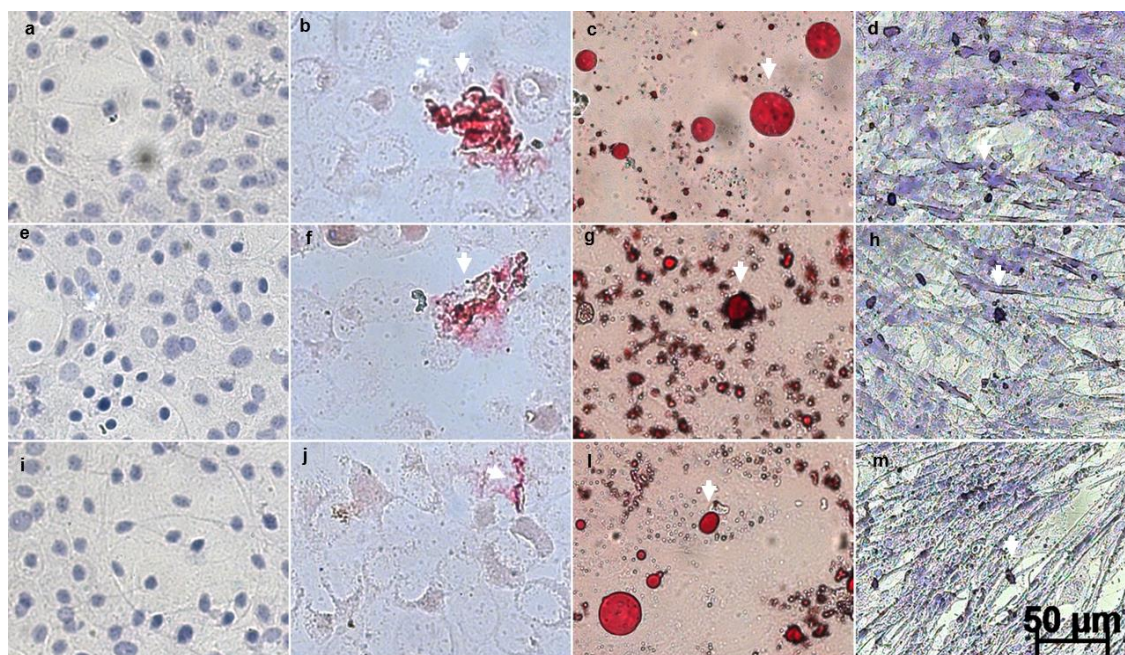


FIGURA 4 - Photomicrographs representative of the morphological appearance. For each differentiation protocol, undifferentiated cells were kept as controls for group 1 (a), 2 (e) and 3 (i). Osteogenic differentiation was confirmed after Alizarin Red staining (Group 4-b, Group 4-f, Group 4-j; arrows), adipogenic differentiation after Oil red staining (Group 4-c, Group 4-g, Group 4-l; arrows) and chondrogenic differentiation after Toluidine blue staining (Group 4-d, Group 4-h, Group 4-m; arrows) differentiation of bovine-derived WJMSCs cells at P6.

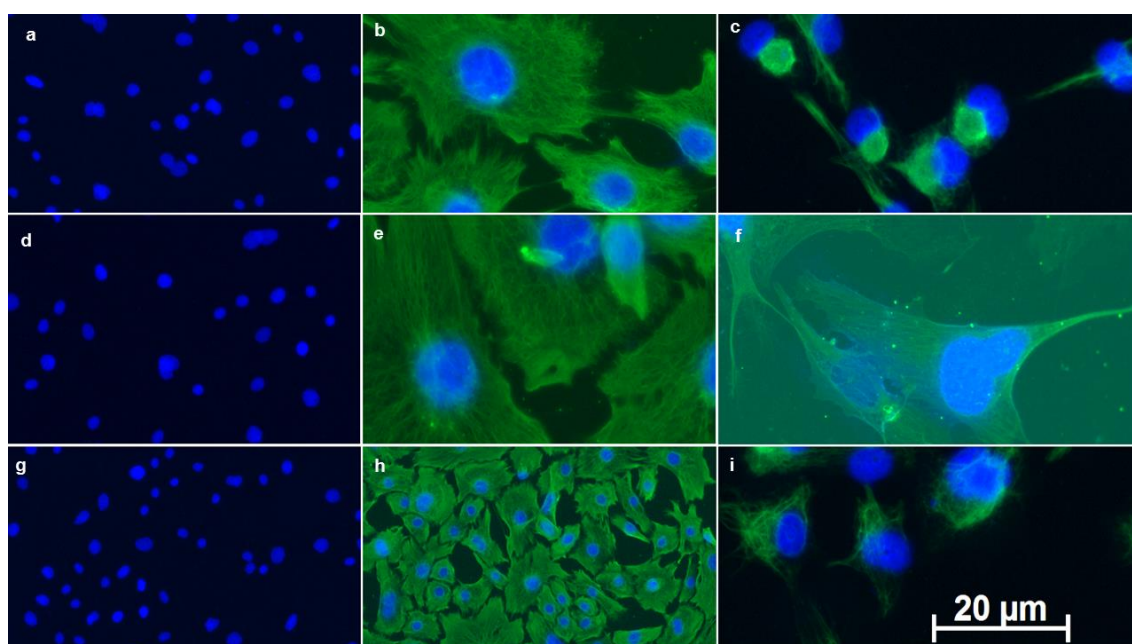


FIGURA 5 - Photomicrographs representative of the morphological appearance of neuro-like cells after neurogenic induction visible under immunofluorescence microscopy positive GFAP (Group 1-b; Group 2-e; Group 3-h) and Nestin (Group 1-c; Group 2-f, Group 3-i) cell markers (scale bar: 20 μ m). Undifferentiated cells were kept as controls for group 1 (a), 2 (d) and 3 (g).

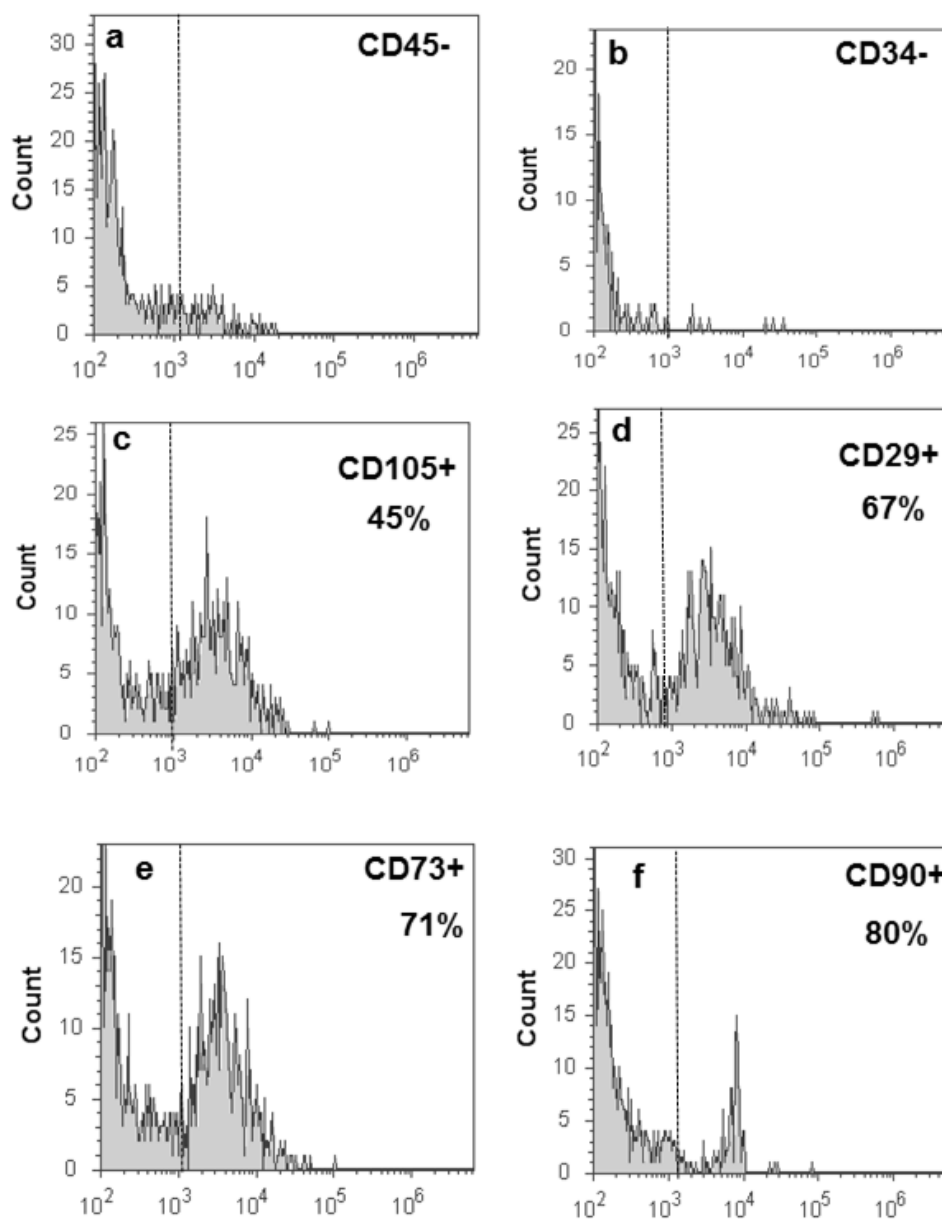


FIGURA 6 - Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 1. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 1). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f.

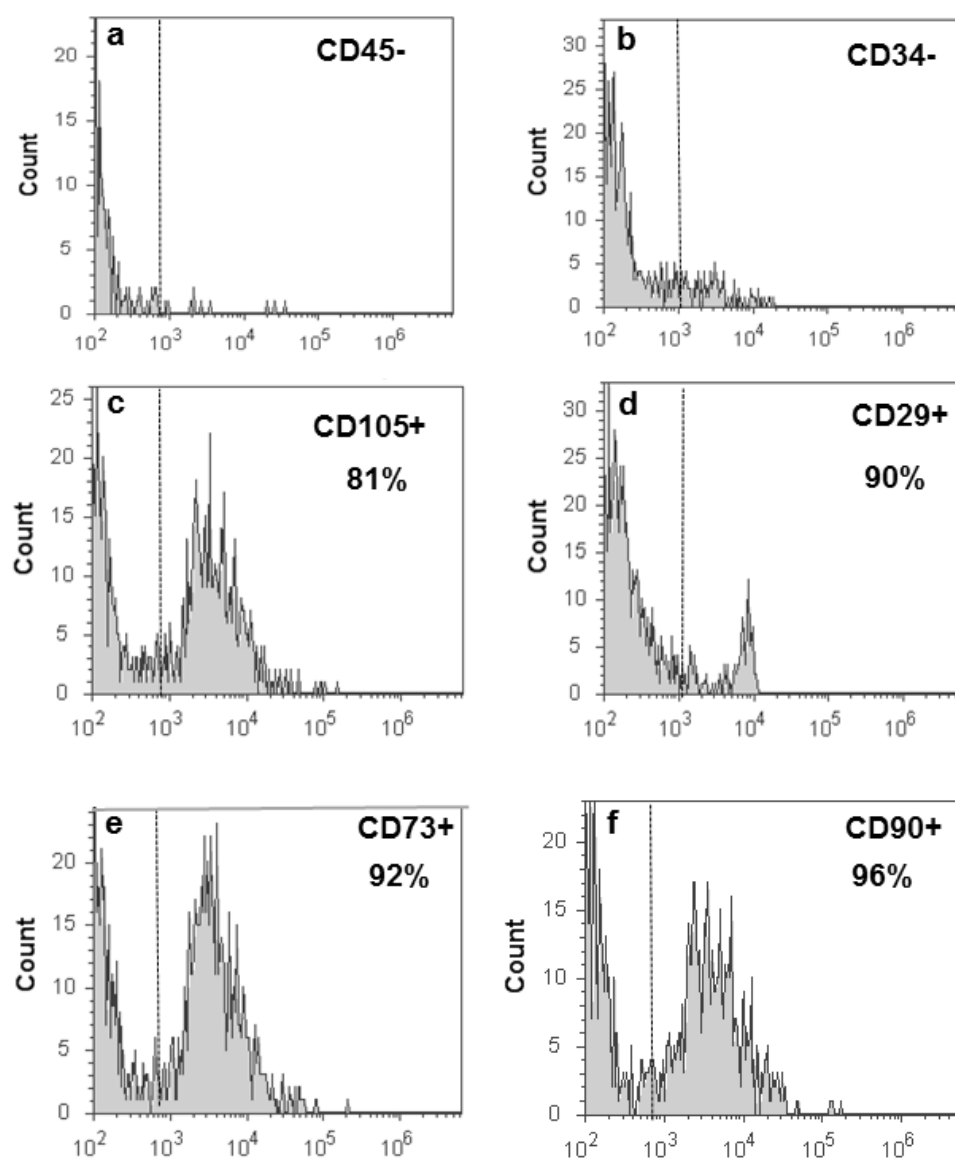


FIGURA 7 - Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 2. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 2). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f.

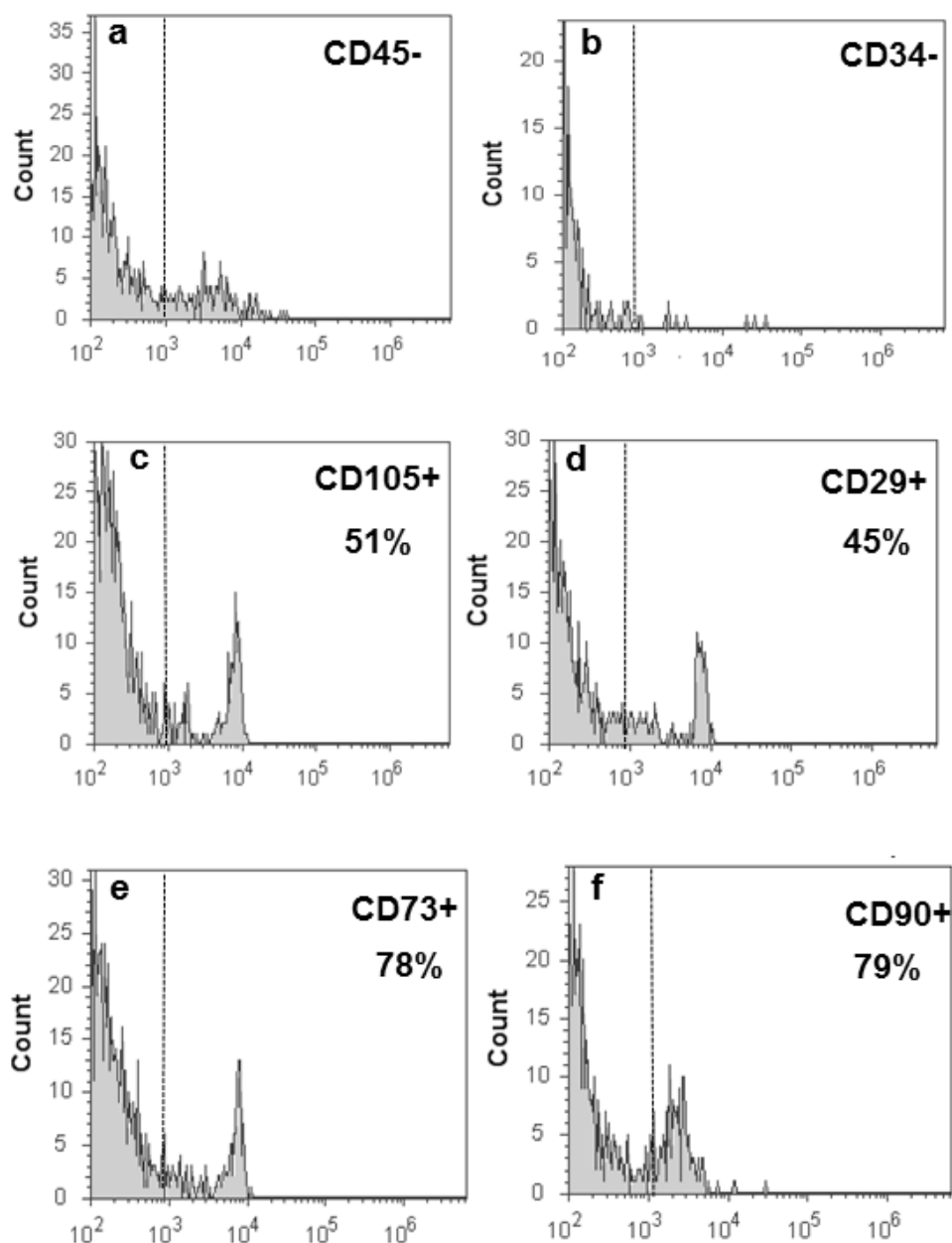


FIGURA 8 - Flow cytometry analysis of WJMSCs surface markers corresponded to group 3. X-axis corresponds to the number of positive labeled cells detected by BL1A filter (488 nm). Y-axis is cell count (log scale). The data obtained from four different experiments were processed using Attune™ acoustic focusing cytometer. For CD45 and CD34 data are illustrated in a-b (Group 3). For CD105, CD29, CD73 and CD90 the results are illustrated in c-f.

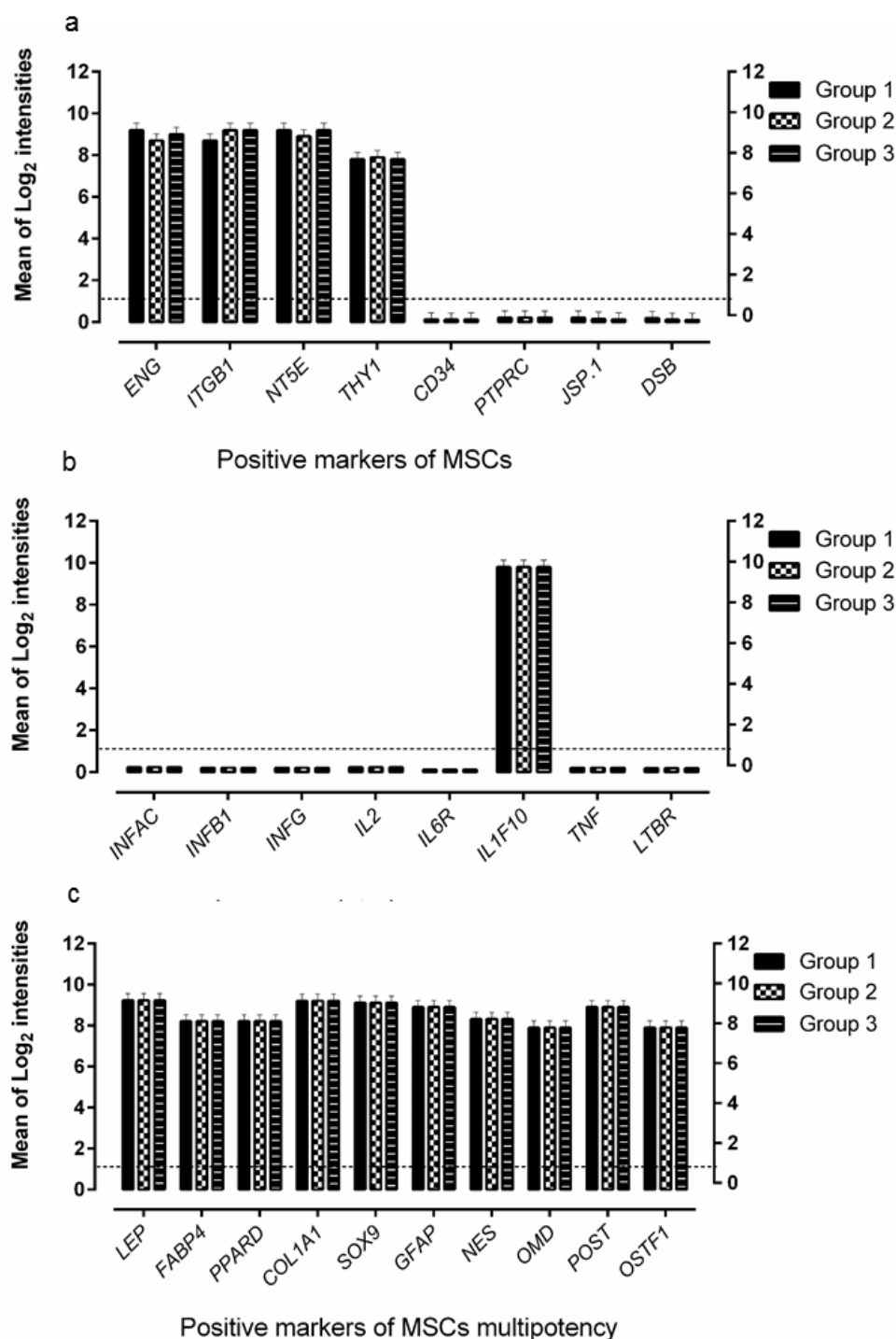


FIGURA 9 - Transcriptome analysis of WJMSCs surface markers, multipotency differentiation and immune related genes from group 1, 2 and 3. Relative gene expression are represented as mean + sd obtained from four different experiments. Unbroken line was positioned on the average negative

known markers of MSCs. Genes with relative expression values above this line were considered up-regulated and were analyzed in comparison to control consisted of bovine T-lymphocyte population. a) Group 1; b) Group 2 and c) Group 3.

TABLE 1 - Specifications of (Bos taurus) cattle gene name, description and location searched by microarray

Gene symbol/ID	Description	Location
Positive markers of MSCs		
ENG	Endoglin (CD105)	Chromosome 11, AC_000.168.1
ITGB1	Integrin, beta 1 (CD29)	Chromosome 13 AC_000.170.1
NT5E	5' nucleosidase ecto (CD73)	Chromosome 9, AC_000.166.1
THY1	Thy-1 cells surface antigen (CD90)	Chromosome 15, AC_000.171.1
CD34	Hematopoietic progenitor cell antigen (CD34)	Chromosome 16, AC_000.954.1
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type C (CD45)	Chromosome 16, AC_000.173.1
JSP.1	Major histocompatibility complex class I (MHC I)	Chromosome 23, AC_000.180.1
DSB	Major histocompatibility complex class II, antigen DS beta (MHC II)	Chromosome 23, AC_000.180.1
Immune related genes		
IFNAC	Interferon alpha C (INF-alpha C)	Chromosome 8, AC_000.165.1
INFB1	Interferon, beta 1, fibroblast	Chromosome 8, AC_000.165.1
IFNG	Interferon, gamma	Chromosome 5, AC_000.162.1
IL2	Interleukin 2	Chromosome 17, AC_000.174.1
IL6R	Interleukin 6 receptor	Chromosome 5, AC_000.162.1
IL1F10	Interleukin 1, family member 10	Chromosome 11, AC_000.168.1
TNF	Tumor necrosis factor (TNF alpha)	Chromosome 23, AC_000.180.1
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNF superfamily member 3)	Chromosome 5, AC_000.162.1
Positive markers of MSCs multipotency		
LEP	Leptin	Chromosome 4, AC_000.161.1
FABP4	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	Chromosome 14, AC_000.171.1
PPARD	Perixome proliferator-activated receptor delta	Chromosome 23, AC_000.180.1
COL1A1	Collagen type 1, alpha 1	Chromosome 19, AC_000.176.1
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 10	Chromosome 5, AC_000.162.1
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	Chromosome 19, AC_000.176.1
NES	Nestin	Chromosome 3, AC_000.160.1
OMD	Osteomodulin	Chromosome 8, AC_000.0149.1
POST	Osteoblast specific factor	Chromosome 12, AC_000.034.1
OSTF1	Osteoclast stimulating factor 1	Chromosome 8, AC_000.0610.1