

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO, CULTIVO, CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA
AMNIÓTICA, GELÉIA DE WHARTON E SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL
DE FETOS BOVINOS**

Loreta Lemes Campos

Botucatu-SP
Novembro 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO, CULTIVO, CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA
AMNIÓTICA, GELÉIA DE WHARTON E SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL
DE FETOS BOVINOS**

Loreta Lemes Campos

Dissertação apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profº Dra. Fernanda da Cruz Landim

Co-orientador: Dra. Bruna De Vita

Botucatu-SP
Novembro 2014

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

Campos, Loreta Lemes.

Isolamento, cultivo, caracterização e criopreservação de células tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica, geléia de Wharton e sangue do cordão umbilical de fetos bovinos / Loreta Lemes Campos. - Botucatu, 2014

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landin

Coorientador: Bruna De Vita

Capes: 50504002

1. Bovino. 2. Células-Tronco - Criopreservação. 3. Âmnio. 4. Citometria de fluxo. 5. Geléia de Wharton.

Palavras-chave: Anexos fetais; Bovino; Células tronco mesenquimais; Citometria de fluxo; Imunocitoquímica.

Nome do autor: Loreta Lemes Campos

Título: ISOLAMENTO, CULTIVO, CARACTERIZAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA, GELÉIA DE WHARTON E SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL DE FETOS BOVINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº Dra. Fernanda da Cruz Landim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dr. Leandro Maia
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profº Dra. Cláudia Barbosa Fernandes
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Data da defesa: 10 de novembro de 2014.

DEDICATÓRIA

*Dedico essa dissertação aos meus pais,
Geni e Jorge e irmãos Andres e Fernanda,
pois essa conquista só foi alcançada
com o apoio de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi realizado com o apoio de todos vocês, pois cada um teve um papel muito importante nessa trajetória, sou muito agradecida a todos!!!!

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por ter colocado lugares, situações e pessoas na hora certa e no lugar certo.

Aos meus pais Geni e Jorge, pelo exemplo de garra e determinação, pelo amor paciência que dedicaram em mim, pois se cheguei até aqui foi graças a vocês, muito obrigada por tudo!

À minha querida e maravilhosa irmã, Fernanda, amiga e companheira, foi muito importante em todas as minhas decisões, mesmo não morando na mesma cidade, sempre estará em meu coração, obrigada Fê, você é muito especial pra mim, te amo!!!!

Ao meu irmão Andres, que desde a primeira vez que sai da casa dos nossos pais, sempre me orientou que melhor caminho seguir, me dando o exemplo e me apoiando em todas as minhas escolhas, obrigada irmão.

Aos animais que passaram por mim, em especial ao meu rottweiler Sócrates, que me ensinou muito, sempre foi muito companheiro, mesmo falecido, sempre irá morar em minhas memórias e a minha pequena e arteira Larica, pura vira lata, me faz sempre ter um sorriso no rosto.

À minha família querda, avós, tios e primos, sempre presentes me dando iniciativas de nunca desistir.

Às minhas amizades que foram construídas em Botucatu e me acolheram com muito carinho, em especial a Bruna, que devo tudo o que sei a ela, obrigada por todos os ensinamentos, momentos compartilhados, noite e noite em claro, horas e horas de laboratório e que até hoje me mostra o melhor caminho a seguir, sempre tão longe e ao mesmo tempo tão perto, meu amoleto, te adoro demais brubru.

À minha amiga Bianca, amiga e parceira todas, todas as horas, me ensinou muitas coisas, esteve do meu lado em toda essa trajetória, foram muita noite de risadas, choros e muito papo, muito obrigada bibi.

À minha queridíssima amiga Milena, muuuuito companheira que me acompanha desde a graduação, muito muito parceira, extensão da minha família, obrigada por existir as meninas que moram com você, Aurora Boreal, Marcela e Sarrafo, obrigada pelas vezes de uso de internet roubada....adoro vocês meninas.

À minha amiga Stephane que me ensinou a colocar a mão na massa, dar a cara pra bater com os pequenos animais, sou muito grata a você jovem.

À professora Fernanda Landim, pela paciência, acolhimento, pela confiança depositada em mim, mesmo sem me conhecer me deu a oportunidade de realizar um sonho, muito obrigada por todos os conselhos, pelo exemplo de seriedade, compromisso profissional e por compartilhar sua experiência, muitíssimo obrigada por tudo!!!

Ao professor Nereu, que sempre teve paciência para tirar as minhas dúvidas, me orientando o melhor.

Às minhas amigas tão tão distante Sabrina, Natália, Isabele, vocês são muito queridas e fazem muita falta.

Aos meus colegas de laboratório, Dani, Midyan, Isadora, Ian, Marta, Denis, Amanda, Mari, Celina, Michelle, Tatícia, Carol, pelas ideias e conhecimentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

v

Agradeço ao Leandro, pela amizade, apoio no projeto, obrigada pela paciência e por dividir um pouco suas experiências.

Agradeço também aos estagiários que passaram pelo laboratório durante esse período, não me lembro o nome de todos, mas fica aqui os meus agradecimentos.

À Camila do CERAN, pela paciência e força de vontade para realização das minhas análises, ahhhh e por muitos encaixes.

Aos funcionários do departamento de reprodução animal, em especial ao Edilson a queridíssima dona Raquel que sempre foram muito atenciosos comigo.

À instituição onde recebi o título de médica veterinária, Anhanguera, que me deu suporte para chegar até aqui.

À equipe da fazenda Colorado, que confiou no meu profissional e abriram as portas para a realização das minhas colheitas.

Ao Marcos do abatedouro Mondelli, que sempre foi muito atencioso para agendar as colheitas.

À turminha muito animada do Botequim do seu Varte, por noites e noite de balcão, jantas, pastéis e uma cervejinha para acompanhar muitas conversas, agradecida Alê.

Agradeço à fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio concedido, sem o qual não seria possível o desenvolvimento do projeto.

Agradeço a CAPES, pela bolsa concedida.

Obrigada a todos que me apoiaram nessa jornada, tem um pouco de cada um nessa conquista!!!!

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Figura ilustrativa da colheita do material (membrana amniótica, matriz extravascular cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas13
- FIGURA 2: Figura ilustrativa da colheita do material (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) obtidas de útero gravídico na fase inicial de gestação, colhidas em abatedouro.....14
- FIGURA 3: Processamento das amostras de membrana amniótica e matriz extravascular do cordão umbilical de fetos bovinos colhidos no momento de parto como em abatedouro.....15
- FIGURA 4: Cultivo primário de células de membrana amniótica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando adesão a superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide20
- FIGURA 5: Cultivo primário de células da matriz extravascular do cordão umbilical, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando adesão a superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide21
- FIGURA 6: Cultivo primário de células do sangue do cordão umbilical de bovino, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro, apresentando adesão a superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide22
- FIGURA 7: Cultivo primário de células de membrana amniótica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia poligonal22

FIGURA 8: Imunocitoquímica das células derivadas de membrana amniótica de bovino, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas. Apresentando morfologia fibroblastóide, demonstrando imunomarcção para Oct-4, NANOG e CD44 e ausência de marcação para MHCII	23
FIGURA 9: Imunocitoquímica das células derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical, obtidas de útero gravídico no terço inicial de gestação de fetos bovinos em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas. Apresentando morfologia fibroblastóide, demonstrando imunomarcção para Oct-4, NANOG e CD44 e ausência de marcação para MHCII	24
FIGURA 10: Imunocitoquímica das células derivadas do sangue do cordão umbilical de bovino, obtidas de útero gravídico no terço médio de gestação de fetos bovinos em abatedouro. Apresentando morfologia fibroblastóide, demonstrando imunomarcção para Oct-4, NANOG e CD44 e ausência de marcação para MHCII	24
FIGURA 11: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de membrana amniótica analisadas para diferenciação osteogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.....	26
FIGURA 12: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de membrana amniótica analisadas para diferenciação adipogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.....	26
FIGURA 13: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas do membrana amniótica analisadas para diferenciação condrogênica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação de em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.....	27
FIGURA 14: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação osteogênica, obtidas de útero gravídico	

de fetos bovinos no terço inicial de gestação de em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.	28
---	----

viii

FIGURA 15: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação adipogênica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação de em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.	28
--	----

FIGURA 16: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação condrogênica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação de em abatedouro e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas	29
---	----

FIGURA 17: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical de bovino analisadas para diferenciação osteogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro.....	30
--	----

FIGURA 18: Ensaio da diferenciação das CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical de bovino analisadas para diferenciação adipogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro.....	30
--	----

FIGURA 19: Ensaio das diferenciações das CTMs derivadas do sangue do cordão umbilical de bovino analisadas para diferenciação condrogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro.....	31
---	----

FIGURA 20: Amostras derivadas de membrana amniótica colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando viabilidade de 80% após serem criopreservadas.	35
--	----

FIGURA 21: Amostras derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando viabilidade de 80% após serem criopreservadas.....	35
---	----

FIGURA 22: Amostras derivadas do sangue do cordão umbilical colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro, apresentando viabilidade de 90% % após serem criopreservadas.	35
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de média da expressão em porcentagem dos marcadores CD44, CD34 e MHC de classe II de células derivadas de membrana amniótica de bovinos, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas	32
TABELA 2:Valores de média da expressão em porcentagem dos marcadores CD44, CD34 e MHC de classe II de células derivadas de matriz extra vascular do cordão umbilical de bovinos, colhidas de útero gravídico no terço inicial de gestação de fetos bovinos em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas	32
TABELA 3:Valores de média da expressão em porcentagem dos marcadores CD44, CD34 e MHC de classe II de células derivadas do sangue do cordão umbilical de bovinos, colhidas de útero gravídico no terço médio de gestação de fetos bovinos em abatedouro.....	33
TABELA 4: Valores da expressão em porcentagem dos marcadores CD44, CD34 e MHC classe II comparando fontes e grupos de células derivadas de membrana amniótica e matriz extravascular do cordão umbilical de bovinos, colhidas no terço inicial de gestação em abatedouro e de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CTs: Células tronco
- CTM: Células tronco mesenquimal
- CTE: Células tronco embrionária
- MCI: Massa celular interna
- UFC-F: Unidades formadoras de colônia fibroblásticas
- SICT: Sociedade Internacional de Terapia Celular
- CD11b: Marcador de superfície celular expresso em granulócitos, monócitos/macrófagos, células NK
- CD13: Marcador de superfície celular expresso em monócitos, granulócitos, células endoteliais
- CD14: Marcador de superfície celular expresso em monócitos, macrófagos, granulócitos, forma solúvel no soro
- CD19: Marcador de superfície celular expresso em linfócitos B
- CD29: Marcador de superfície celular expresso em leucócitos
- CD44: Marcador de superfície celular expresso em leucócitos, hemácias
- CD90: Marcador de superfície celular expresso em timócitos, linfócitos T periférico (camundongo), neurônio (todas as espécies)
- CD34: Marcador de superfície celular expresso em células hematopoiéticas, células endoteliais
- CD45: Marcador de superfície celular expresso em células hematopoiéticas
- CD49e: Marcador de superfície celular expresso em linfócitos T, poucos linfócitos B e monócitos
- CD54: Marcador de superfície celular expresso em células endoteliais, linfócitos T, linfócitos B, monócitos
- CD73: Marcador de superfície celular expresso em linfócitos T e B, células dendríticas foliculares do centro germinativo
- CD79: Marcador de superfície celular expresso em linfócitos T maduros

- CD105: Marcador de superfície celular expresso em células endoteliais, macrófagos ativos

xi

- CD146: Marcador de superfície celular expresso em endotélio, músculo liso, subpopulação de linfócitos T ativados

- CD133: Marcador de superfície celular expresso em células tronco variadas

- CD166: Marcador de superfície celular expresso em linfócitos T ativados, monócitos ativados, epitélio, neurônio, fibroblastos

- CD184: Marcador de superfície celular expresso em células do sangue e em células teciduais

- RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

- HLA-DR: Antígenos leucocitário humano

- VEGF: Fator de crescimento vascular endotelial

- HGF: Fator de crescimento hepático

- IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina

- TGF- α : Fator de crescimento transformante alfa

- OCT-4: Proteína de ligação ao octâmero 4

- SSEA-1: Antígeno embrionário estágio específico 1

- SSEA-4: Antígeno embrionário estágio específico 4

- TRA-1 60: Antígeno de rejeição tumoral 1-60

- TRA-1 81: Antígeno de rejeição tumoral 1-81

- DMSO: Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
2.1 Geral.....	03
2.2 Específicos	03
3.REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Célula tronco.....	04
3.2 Células tronco mesenquimais	05
3.2.1 Diferenciação de células tronco mesenquimais	06
3.3 Células tronco derivadas de anexos fetais	07
3.3.1 Células tronco derivadas de membrana amniótica	08
3.3.2 Células tronco derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical.....	08
3.3.3 Células tronco derivadas do sangue do cordão umbilical.....	10
3.4 Criopreservação	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES FINAIS	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

RESUMO

CAMPOS.L.L. Isolamento, cultivo, caracterização e criopreservação de células tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica, geléia de Wharton e sangue do cordão umbilical de fetos bovinos. **Botucatu, 2014. 54p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.**

As células tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes na maioria dos tecidos adultos e possuem grande capacidade de multiplicação, o que as tornam muito atrativas para a terapia celular, tanto na medicina humana como na medicina veterinária. Quando cultivadas *in vitro* são capazes de se auto renovar e dar origem a novos tipos celulares. Atualmente há uma grande tendência para a utilização de CTMs obtidas de tecidos fetais, como a membrana amniótica (MA), matriz extravascular do cordão umbilical (CU) e sangue do cordão umbilical (SCU), podendo ser obtidas no momento do parto por uma técnica não invasiva. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar, diferenciar e criopreservar CTMs obtidas de MA, CU e SCU de fetos bovinos colhidos no momento do parto e em abatedouro. As células foram recuperadas por meio de digestão enzimática tecidual, realizada com solução de colagenase 0,1%. Foram colhidas amostras de MA e CU no momento do parto (n=6) e de MA e CU no terço inicial de gestação (n=6), bem como de SCU no terço médio de gestação em abatedouro (n=6), as quais foram submetidas às análises morfológica, imunocitoquímica, imunofenotípica por citometria de fluxo e diferenciações *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e criopreservação. Além disso, foram criopreservadas e analisadas por citometria de fluxo para observação da viabilidade celular. Todas as amostras dos diferentes períodos gestacionais demonstraram adesão ao plástico e morfologia fibroblástóide. No ensaio imunocitoquímico todas as amostras foram imunomarcadas para CD44, NANOG e Oct-4, com ausência de marcação para MHC II. Na análise imunofenotípica por citometria de fluxo, todas as amostras apresentaram marcação para CD44, ausência de marcação para CD34 e baixa expressão de MHC II. Apresentaram também capacidade de diferenciação *in vitro* nas três linhagens mesodermas e quando analisadas pós criopreservação por citometria de fluxo, todas as amostras apresentaram viabilidade de 80-90%. Na análise estatística não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as amostras e nem diferença entre os períodos analisados. Estes resultados indicam que MA, CU e SCU, obtidos tanto no momento de parto como em abatedouro de fetos bovinos podem ser utilizados como fonte não invasiva e indolor de CTMs e possibilitam a formação de bancos de armazenamento de células.

Palavras-chaves: Bovinos, células tronco mesenquimais, anexos fetais, imunocitoquímica, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells with a high proliferation potential. These cells can be characterized by their *in vivo* ability to self-renew and to differentiate into specialized cell lines. The most used stem cell type, in both human and veterinary field, is the mesenchymal stem cells (MSC). Nowadays, there is a great tendency to use stem cells derived from fetal tissues, such as amniotic membrane (AM), extracellular matrix of umbilical cord (EMUC) and umbilical cord blood (UCB), which can be obtained non-invasively at delivery time. Thus, the aim of this study was to isolate, characterize and differentiate MSC derived from bovine fetal annexes cow dairy neonates after assisted delivery and of fetus obtained in slaughterhouse. Cells were isolated by enzymatic digestion of the tissue fragments with 0,1% collagenase solution. Six samples of AM and EMUC at delivery time, six samples of AM and EMUC at first third of pregnancy and six samples of UCB at secondary third of pregnancy were subjected to morphology evaluation, immunocytochemistry, flow cytometry and *in vitro* osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. Moreover, sample were cryopreserved and evaluated for viability by flow cytometry. All samples showed adherence to plastic and fibroblast-like morphology. Immunocytochemistry revealed expression of CD 44, NANOG and OCT-4 and lack of expression of MHC II in MSC from all samples. Flow cytometry demonstrated that cells from all samples expressed CD 44, lacked CD 34 expression and showed low expression of MHC II. They were also capable of trilineage mesenchymal differentiation and showed 80-90% viability after cryopreservation. According to the results, AM, EMUC and UCB, either obtained at delivery time or from slaughterhouse, are a painless and non-invasive source of MSC and can be used for stem cell bank creation.

Keyword: Bovine, Mesenchymal stem cells, Fetal membranes, Immunocytochemistry, Flow cytometry

1.INTRODUÇÃO

As células tronco (CT) desempenham um papel importante na medicina e na medicina veterinária de várias maneiras, sendo uma ferramenta promissora para a medicina regenerativa, engenharia de tecidos e terapia celular, buscando restaurar o funcionamento de tecidos ou órgãos lesionados, através da proteção da integridade celular, repondo células lesionadas por células saudáveis, promovendo assim regeneração e reparação adequada dos tecidos lesionados. Atualmente, as terapias celulares para animais estão sendo desenvolvidas com células tronco mesenquimais, conhecida também como células estromais multipotentes, conhecidas pelo termo em inglês *MSCs* (*Mesenchymal Stem Cells* e *Multipotent Stromal Cells*) e em português como células tronco mesenquimais (CTMs) (BYDLOWSKI et al., 2009; RIBITSCH et al, 2010).

CT são células indiferenciadas com capacidade ilimitada de proliferação e auto-renovação, além da capacidade de responder a estímulos externos e dar origem a diferentes tipos celulares. As CT estão presentes em diversos tecidos, entre eles a medula óssea, a qual tem sido a mais estudada nos últimos anos, tanto como fonte de células tronco hematopoéticas e como fonte de CTMs (BYDLOWSKI, et al., 2009).

Estas células se destacam ainda por apresentarem características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam sua utilização terapêutica. As CTMs secretam uma variedade de citocinas antiinflamatórias e fatores de crescimento por meio de moléculas bioativas, que proporcionam a modulação da resposta inflamatória e a reparação adequada do tecido (MONTEIRO et al., 2010).

Tanto em humanos, como na medicina veterinária, as CTMs têm sido isoladas com sucesso em vários tipos de tecidos. As fontes celulares mais utilizadas são as células da medula óssea e do tecido adiposo, entretanto, os procedimentos utilizados para isolar esses tipos de tecido ainda são invasivos e as células são normalmente obtidas com baixa eficiência (CORRADETTI et al. 2013).

Além disso, seus potenciais de diferenciação e proliferação podem diminuir com a idade do doador. A possibilidade de se obter uma maior quantidade de células, de forma não invasiva com baixo custo e sem causar risco para o doador, torna as células derivadas de anexos fetais muito atrativas para a medicina regenerativa e terapia celular (CORRADETTI et al. 2013).

As CT obtidas de anexos fetais, tais como o líquido amniótico e a membrana amniótica têm sido recentemente caracterizadas como fontes promissoras de células tronco e células progenitoras. Células tanto derivadas da membrana amniótica como do líquido amniótico, além de apresentarem características semelhantes a das células tronco adultas, apresentam também propriedades de células tronco embrionárias. Assim, apresentam características como expressão de marcadores de pluripotência, grande capacidade proliferativa sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade e, ainda capacidade de diferenciação em diversos tecidos, inclusive extra mesenquimais (ROUBELAKIS et al. 2012).

O recente progresso no estudo de CT permitiu o desenvolvimento de novas perspectivas para o uso da terapia celular. Atualmente, as células tronco adultas (CTA) e as células tronco embrionárias (CTE) são mais utilizadas. No entanto, as CTE ainda apresentam problemas éticos e técnicos. Já as células CTA derivadas de anexos fetais apresentam grandes vantagens por serem colhidas de materiais que serão descartados, além de serem facilmente acessíveis, estão disponíveis em maior quantidade nos tecidos (MIHU ET al. 2009).

Os estudos mais recentes em relação as CTMs de anexos fetais tem como objetivo o isolamento e a caracterização destas células. No entanto, variações no seu fenótipo, heterogeneidade e a ausência de um único marcador que seja expresso somente neste tipo celular, dificulta o isolamento de uma população homogênea de CT, podendo impedir sua utilização terapêutica (ROUBELAKIS et al. 2012).

Na terapia regenerativa e engenharia tecidual, o cultivo celular é realizado com o objetivo de expandir o número de células isoladas. Entretanto, para otimização da utilização de CTs em terapia celular, a formação de bancos de linhagens celulares é fundamental. Desta forma, técnicas eficientes de criopreservação são importantes, pois permitem o transporte das células até o local de uso clínico, a mistura de células para a obtenção do melhor potencial terapêutico e a coordenação da administração da terapia celular com outros procedimentos terapêuticos (KOCH et al. 2007).

2. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e criopreservar células tronco mesenquimais derivadas de anexos fetais de bovinos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical), obtidas de fetos a termo, durante o parto natural assistido de vacas holandesas e de fetos bovinos na fase inicial de gestação obtidas em abatedouro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar CTMs obtidas da membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical de fetos bovinos, colhidos no momento do parto normal, bem como durante o terço inicial de gestação, em abatedouro;
- Induzir a diferenciação *in vitro* das CTMs obtida dos diferentes tecidos fetais em células da linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica utilizando-se células em terceira passagem;
- Avaliar, por meio de citometria de fluxo, a expressão dos marcadores de superfície CD44, CD34, bem como do MHC classe II, das células cultivadas em terceira passagem;
- Avaliar, através da imunocitoquímica, a expressão dos marcadores CD44 e MHC de classe II e ainda, marcadores de pluripotência, NANOG e Oct-4, das células cultivadas em terceira passagem;
- Estudar a viabilidade e potencial de crescimento celular após procedimento padrão de criopreservação para formação de um banco de células tronco.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Células tronco

Desde o início do século XX, já sabia-se da existência das células tronco em organismos adultos (LARGEAULT, 2004). Nos anos 70 foram descritos os primeiros estudos com estas células, realizadas em camundongos, até que, em 1998, estas células foram isoladas de humanos pelos pesquisadores James Thomson e John Gearhart, nos Estados Unidos.

CT possuem a capacidade *in vivo* de se auto-renovar e se diferenciar em um ou mais tipos celulares (KOCH et al., 2007). São células indiferenciadas com capacidade prolongada ou ilimitada de multiplicação. Podendo assim originar células diferenciadas e funcionais, o que as tornam promissoras para o tratamento de tecidos e órgãos lesionados.

As CT podem ser classificadas quanto sua origem (embrionária e adulta) e plasticidade (totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes).

O embrião em seu estágio inicial dá origem a blastômeros totipotentes, os quais podem dar origem a todos os tipos de células do indivíduo, incluindo a placenta e os anexos fetais. Já as células pluripotentes são obtidas de embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento (massa celular interna - MCI) do embrião, as quais são capazes de se diferenciar em todos os tecidos, exceto nos anexos embrionários (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006).

Apesar da sua maior plasticidade, ainda não há muito relatos sobre a utilização clínica das CTE para fins terapêuticos, devido a sua capacidade mutagênica, podendo levar a formação de teratomas (SOLTER, 2006).

As células tronco adultas (CTA), também chamadas de células tronco somáticas, possuem a função de repor as células mortas e/ou danificadas do organismo, reparando e mantendo a integridade dos órgãos e tecidos (WALSH, 2003). São células indiferenciadas no meio de tecidos diferenciados, até sua especialização nos processos de crescimento, renovação celular, reparação e diferenciação tecidual. Dentre as CTA se destacam as células tronco hematopoiéticas e as células tronco mesenquimais.

Dentre as CTA são encontradas células multipotentes, que podem dar origem a diversos tipos de celulares e serem obtidas de diversas fontes como de tecidos fetais e medula óssea. Entre elas estão classificadas as CTMs as quais dão origem a células da mesoderme como osso, cartilagem e gordura. Entre as células obtidas de indivíduo adulto também se encontram as células unipotentes, as quais possuem sua capacidade de diferenciação limitada à uma só linhagem celular como, por exemplo, as espermatogônias (MINGRONI-NETTO & DESSEN, 2006).

3.2 Células tronco mesenquimais

Pesquisas nas últimas décadas permitiram a descoberta de diversas fontes de CTA, dentre elas se destacaram as CTMs por apresentarem capacidade de diferenciar-se em diversas linhagens celulares (NARDI, 2007; ROUBELAKIS, et al., 2012).

Friedenstein e colaboradores (1966) identificaram pela primeira vez, células que correspondiam a uma população de células progenitoras multipotentes. Estas células foram inicialmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos, as quais apresentaram capacidade de adesão ao plástico e quando cultivadas *in vitro* em placas de cultivo, apresentaram morfologia semelhantes à espículas e cultura em monocamada. Estas células foram então definidas como unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-Fs).

Por apresentarem estas semelhanças, foram adotados 3 critérios mínimos pelo comitê da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), os quais definem que as células devem apresentar aderência ao plástico quando mantidas em cultura, expressarem marcadores de superfície específicos como CD 105, CD73 e CD90 e não expressarem os marcadores CD34, CD 45, CD14, CD11b, CD79, CD19 e HLA-DR e ainda apresentarem capacidade de diferenciar-se nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Esses critérios, como a expressão dos marcadores de superfície refletem características biológicas e funcionais das células. Permitindo assim um avanço progressivo no uso dessas células em estudos pré-clínicos e, consequentemente sua utilização terapêutica (DE BARI et al., 2001; DOMINICI, 2006).

As CTMs compreendem uma população de células multipotentes capazes de desenvolver a hematopoiese (PITTENGER et al., 1999; DEANS & MOSELY, 2000),

além de apresentar a capacidade de se diferenciar em vários tecidos (HERZOG et al., 2003), incluindo tecido ósseo, cartilaginoso (BERNARDO et al., 2007), muscular (YOON et al., 2005), adiposo e, além disso, produzem fatores de crescimento e citocinas que promovem a expansão e diferenciação celular (POTAPOVA et al., 2007).

Esta liberação de citocinas e fatores de crescimento têm sido relatada como intimamente relacionada ao potencial terapêutico das células tronco, principalmente pela ação de imunomodulação da inflamação, prevenção da formação de feridas, além da regeneração de tecidos (ENGELA et al., 2012; TACGHEE & SONG, 2012; EGGHOFER & HOOGDUIJN, 2012).

Estudos confirmam que CTMs liberam diversos fatores de crescimento quando implantadas em um local específico. Alguns desses fatores são: VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), HGF (fator de crescimento hepático) e IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) tendo uma importante ação parácrina no local onde são transplantadas, promovendo, assim, a ação antiinflamatória e imunomoduladora (WANG et al., 2006; NAUTA & FIBE, 2007; MAIA, et al., 2009; ENGELA et al., 2012). número e a capacidade de diferenciação destas células

As fontes mais utilizadas para obtenção de CTMs são tecido adiposo e medula óssea, no entanto as células obtidas de medula óssea diminuem com a idade e seu potencial terapêutico declina com o tempo (MULLER, 2001; SCREVEN, et al., 2014). Devido a estas limitações outras fontes de CTMs foram identificadas, como as células derivadas dos anexos fetais por apresentar-se como uma fonte não invasiva de obtenção, por serem tecidos normalmente descartados e com possibilidade de colheita ao nascimento e formação de bancos de células (TSAI et al., 2004; CREMONESI et al., 2011).

3.2.1 Diferenciação das células tronco mesenquimais

A característica fundamental das CMTs em cultura é sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura. Sendo assim, a diferenciação osteogênica requer a presença de indutores que incluem o betaglicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Na presença destas substâncias, as células

mesenquimais adquirem a morfologia de osteoblastos e passam a expressar fosfatase alcalina e depositar matriz extra-celular rica em cálcio (ZAGO & COVAS, 2006).

A diferenciação condrogênica ocorre quando as CTMs são cultivadas com baixa concentração de soro fetal bovino e na presença de TGF- α . Nestas condições, as CTMs rapidamente mudam sua morfologia e passam a secretar glicosaminoglicanos, agreganos, fibromodulina, proteína oligométrica da matriz cartilaginosa, decorina, colágeno tipo II e condroaderina (ZAGO & COVAS, 2006).

Já a diferenciação adipogênica das CTMs ocorre quando a monocamada celular é cultivada em presença de isobutilmetilxantina, assim as células cultivadas rapidamente acumulam gotículas de lipídeos do citoplasma (ZAGO & COVAS, 2006).

3.3 Células tronco derivadas de anexos fetais

Os anexos fetais são fontes de células tronco extra-embrionárias. As membranas placentárias e o líquido amniótico são as únicas fontes que apresentam subpopulações mesenquimais, hematopoiéticas, trofoblásticas e, possivelmente células tronco de origem ainda mais primitivas e indiferenciadas (FAUZA, 2008).

As CT derivadas dos anexos fetais preservam características dos tecidos embrionários de onde se originam e, muitos estudos estão indicando que as mesmas exibem características de CTE, como a expressão de alguns marcadores de pluripotência como o Oct-4 e além de grande capacidade proliferativa, sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade, ou seja, não demonstram a formação de teratomas quando inoculadas (CREMONESI et al., 2011).

Corradetti e colaboradores (2013) isolaram e caracterizaram células obtidas da porção epitelial do âmnion e líquido amniótico de bovinos, as quais apresentaram morfologia fibroblastóide e expressão de marcadores de superfície específicos de CTMs CD29, CD44, CD166, CD105 e CD73, bem como marcadores de pluripotência o Oct-4 e c-Myc e não expressaram marcadores hematopoiéticos. Quando induzidas, ambas as fontes foram capazes de se diferenciar em linhagens do ectoderma e mesoderma.

3.3.1 Células tronco derivadas de membrana amniótica

A membrana amniótica (MA) constitui a maior parte da camada interna da membrana fetal, é formada por três camadas: uma camada de epitélio simples, uma espessa membrana basal e um mesênquima avascular (BENIRSCHKE et al., 2000). As células obtidas da membrana amniótica, incluem dois tipos: as células epiteliais amnióticas e as células mesenquimais amnióticas, ambos os tipos são originadas durante o desenvolvimento do embrião (ROUBELASKIS et al., 2012).

A MA apresenta propriedades antibióticas e antiinflamatórias e, essas propriedades fazem com que ocorra a formação de um epitélio de proteção contra infecções, o que as destacam para utilização clínica. A MA vêm sendo utilizado para cicatrização de feridas, queimaduras de pele e reconstrução da superfície ocular (KIM et al., 2007) como em casos de perfurações de córnea (KITAGAWA et al., 2011).

Estudos recentes isolaram células obtidas de MA de humanos, nos quais as mesmas apresentaram adesão ao plástico, morfologia fibroblastóide, características fenotípicas semelhantes a tecidos adultos e capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens (ILANCHERAN et al., 2007; MANUELPIILLAI et al., 2011). Imunofenotipicamente revelaram expressão para antígenos como CD13, CD29, CD44, CD49e, CD54, CD73, CD90, CD105 e CD166, não expressaram marcadores hematopoiéticos como CD34, CD14, CD45 e CD49d (ROUBELASKIS et al., 2012) e expressaram marcadores de pluripotência Oct- 3/4, SSEA-4, SOX-2, NANOG (MIHU et al., 2009; DIAZ-PRADO et al., 2011, em humano; URANIO et al., 2011, em cão; MAURO et al., 2010, em ovinos; RUTIGLIANO ET AL., 2013, em gatos).

3.3.2 Células tronco derivadas da matriz extravascular do cordão

O cordão umbilical é recoberto pelo epitélio amniótico que protege uma matriz gelatinosa e elástica de mucopolissacarídeos, composta por ácido hialurônico e sulfato de condroitina, chamada de “Wharton’s Jelly” (WJ) (McGEADY et al., 2006). O âmnion e a gelatina de Wharton recobrem três importantes vasos sanguíneos, os quais são essenciais para o desenvolvimento do feto: um grande vaso que supre o desenvolvimento fetal com sangue placentário, rico em nutrientes e oxigênio e dois

vasos menores, que retornam o sangue fetal com dióxido de carbono, resíduos e outras toxinas (FORRAZ & McGUICKIN, 2010).

Segundo Barclay e colaboradores (1945) os bovinos apresentam duas veias e duas artérias umbilicais, as veias se anastomosam na porção média do funículo, mediante a anastose transversal; as veias contíguas, se fusionam com outra veia no canal umbilical.

O estudo pioneiro realizado na medicina veterinária com células obtidas da matriz extravascular do cordão umbilical (C.U.) foi realizado em suínos por Carlim e colaboradores (2006), os quais isolaram e cultivaram células obtidas desta fonte e as mesmas apresentaram morfologia fibroblastóide, aderência ao plástico, expressaram marcadores de superfície como Oct-4, NANOG, SOX-2 através da avaliação imunocitoquímica.

Estudos recentes na medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação de células derivadas do C.U. em células ósseas, endotelial hepática e em linhagens neurogênicas (ZHANG, LIE & WEI, 2009; XU et al., 2010; CABALLERO et al., 2010; ZHANG & FAN, 2010).

CTMs obtidas da gelatina de Wharton de cordão umbilical de equinos foram também cultivadas e isoladas. As células apresentaram morfologia fibroblastóide e expressaram marcadores de pluripotência como Oct-4, SSEA-4, c-kit e a expressão de c-Myc (proliferação celular), CD54, CD90, CD105, CD146 e não expressaram os marcadores CD34, CD45, CD133. Além disso, as células demonstraram um potencial de diferenciação *in vitro* para as linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica (De VITA et al., 2011) e neurogênica (HOYNOWSKI et al., 2007).

Células do C.U. de cães foram isoladas e caracterizadas expressando marcadores de pluripotência como Oct-3/4, NANOG, SOX-2 e SSEA-4 e marcadores de superfície específicos de CTMs como CD44, CD90, CD105, CD184 e estas células foram capazes ainda de diferenciar-se nas linhagens mesodermal (adipócitos, osteócitos e condrócitos) e ectodermal (célula neuronal) quando cultivadas *in vitro* com meios de indução específicos (LEE et al., 2013).

Em bovinos foram isoladas células obtidas do C.U., as células isoladas foram obtidas sem digestão enzimática, e segundo Cardoso e colaboradores (2012) a utilização

dessas enzimas como collagenase, tripsina, entre outros, podem apresentar uma desvantagem durante a digestão dos tecidos, podendo haver uma redução na viabilidade celular, degradação nos receptores de superfície celular e na sua função. No entanto, no cultivo, a morfologia durante as passagens não apresentaram nenhuma alteração, e as mesmas ainda foram capazes de se diferenciar em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica e expressaram marcadores de superfície, como CD105, CD29, CD73 e CD90.

Calloni e colaboradores em 2014, isolaram e cultivaram CTMs de medula óssea e do C.U. de bovinos, as quais apresentaram morfologia fibroblastóide e expressaram os marcadores da superfície celular CD29, CD73, CD90, CD105 além do Oct-4 marcador de pluripotência e capacidade de diferenciação *in vitro* em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica. Além disso, as células da matriz extravascular do cordão demonstraram capacidade de inibir a proliferação de células T em resposta à divisão celular. Células obtidas a partir destas fontes apresentaram morfologia de células nervosas e expressão de marcador neural após indução *in vitro*.

3.3.3 Células tronco derivadas do sangue do cordão umbilical

O sangue do cordão umbilical (SCU) tem sido utilizado por mais de 20 anos como fonte de células tronco hematopoiéticas (CTHs) para transplante na medicina humana. Além disso, as células derivadas do sangue do cordão e do tecido extravascular do cordão, demonstraram potencial de diferenciação de pluripotência, diferenciando-se em linhagens das três camadas germinativas *in vitro* e *in vivo*, tornando-as uma fonte rica e ética de células tronco (FORRAZ & MCGUCKIN, 2010).

Em 2004 foi relatada a descoberta de células tronco não hematopoiéticas, pluripotentes chamadas de células tronco *embryonic-like* (MCGUCKIN et al., 2006) que foram capazes de diferenciar-se *in vitro* em células neuronais, hepatobiliares, pancreáticas, endoteliais, do músculo liso, adipócitos, condrócitos e osteócitos (BIEBACK et al., 2006; KOGLER et al., 2004).

Segundo estudo conduzido por Koch e colaboradores (2007), as CTMs do cordão umbilical de equinos foram isoladas utilizando-se amostras a fresco colhidas no momento do parto. De acordo com Iocano e colaboradores (2012) estas células aderiram

rapidamente à placa de cultivo, apresentaram morfologia fibroblastóide e, ainda capacidade de diferenciar-se *in vitro* em osteócitos, condrócitos e adipócitos.

Na medicina veterinária bovina ainda são poucos os estudos com células tronco do sangue cordão umbilical e seu armazenamento comercial para futuros transplantes. No entanto, Raoufi e colaboradores (2011) isolaram e diferenciaram CTMs obtidas do sangue do cordão umbilical de bovinos, a colheita realizada foi através da punção do cordão umbilical, uma colheita minimamente invasiva. Estas células foram capazes de diferenciar-se *in vitro* em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Além disso, expressaram marcadores de pluripotência como Oct-4 e SH3 (CD73), por meio de expressão gênica.

3.4 Criopreservação

O método mais utilizado para criopreservação das células é o da refrigeração equilibrada, no qual ocorre uma queda gradativa da temperatura que leva à formação de gelo extracelular promovendo uma desidratação progressiva da célula, aumentando a concentração de soluto intracelular até um estado passível de vitrificação (BENSON et al., 2008). Nestas condições os índices de sobrevivência de células mamíferas só são aceitáveis na presença de substâncias crioprotetoras (HUBEL, 1997).

Os danos causados as células durante a refrigeração equilibrada são de 3 classes: osmótico, devido ao influxo e efluxo de água durante a adição e remoção do crioprotetor; mecânico, devido a formação dos cristais de gelo, e efeito do soluto, ou dano químico, que ocorre devido ao aumento da concentração intracelular de íons durante a desidratação celular (BENSON et al., 2008).

A criopreservação tem como objetivo preservar o tecido vivo de várias maneiras, recuperando o grau de viabilidade e integridade funcional, sem induzir toxidades quando introduzidas. O crioprotetor mais utilizado para fazer a proteção das células durante o congelamento é o dimetilsulfóxido (DMSO), porém quando utilizados em altas concentrações podem apresentar toxicidade.

Desta forma, estudos vem sendo desenvolvidos na tentativa de diminuir a concentração de DMSO, adicionando ao meio de congelamento dissacarídeos como a trealose. Estes dissacarídeos tem a capacidade de aumentar a viscosidade do meio

contribuindo para a desidratação das células e diminuindo os efeitos tóxicos causados pelo DMSO. A trealose já foi utilizada com sucesso para criopreservação de CTs hematopoiéticas quando associadas com 10% de DMSO (ZHANG et al. 2003) como também com 5% de DMSO (SEO et al., 2011).

Outro componente utilizado nos meios de criopreservação é o soro. Podendo-se utilizar tanto soro autólogo como soro fetal bovino. O efeito benéfico do soro ocorre através da interação de suas macromoléculas com os biocompostos celulares durante o processo de criopreservação, estabilizando e protegendo as membranas celulares (KNIGHT et al., 1977; GRILLI et al., 1980). Dessa forma, Schaefer e Dicke (1973) observaram um aumento da capacidade crioprotetora do DMSO quando adicionado soro ao meio de criopreservação.

A maioria dos protocolos de criopreservação de CTMs descritos na literatura, utilizam o DMSO (Me_2SO) como crioprotetor. A utilização de 10% de DMSO já foi descrita com sucesso para a preservação de CTs hematopoiéticas (BRANCH et al., 1994; FLEMING & HUBEL, 2006) e do cordão umbilical de equinos (MAIA et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Colheita das amostras:

Este trabalho realizado foi aprovado pelo conselho de ética animal nº 30/2013.

Colheita no momento do parto

As amostras de MA (n=6), C.U. (n=6) e SCU (n=6) foram colhidas de fetos a termo, durante o parto natural assistido de vacas holandesas (*Bos taurus taurus*) na Fazenda Colorado, localizado na cidade Araras-SP.

Fragmentos de 10cm² de MA e C.U. foram colhidos com pinça anatômica e tesoura estéril, lavados em Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, USA) acrescido de penicilina/estreptomicina e acondicionados em tubos de centrífuga de 50mL

contendo o meio de cultivo composto por DMEM baixa glicose/F12 (Gibco, EUA) (1:1), 20% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, EUA) e 1,1% de anfotericina B (Gibco, EUA).

O SCU foi colhido com bolsa de transfusão de sangue. Os tubos e as bolsas de transfusão foram armazenados a -5°C e transportados no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botuflex[®] (Botupharma, Brasil) até o Laboratório Reprodução Animal Avançada e Terapia Celular (LANÇA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu/SP (Fig.1).

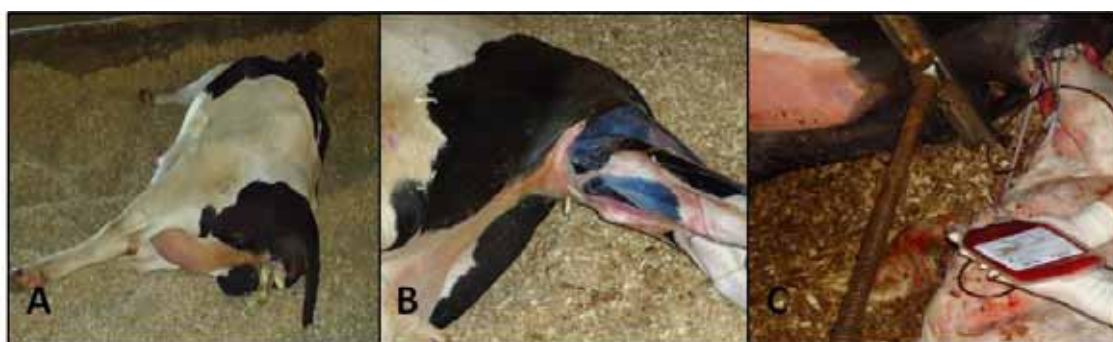


Figura 1: Figura ilustrativa da colheita do material (membrana amniótica, matriz extravascular cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) de fetos a termo, durante o parto natural assistido de vacas holandesas (A); colheita da membrana amniótica (B); colheita do sangue do cordão umbilical (C).

Colheita no abatedouro

As amostras de MA (n=6), C.U. (n=6) e SCU (n=6) foram obtidas de útero gravídico na fase inicial de gestação de bovinos, colhidas no abatedouro Mondelli, localizado na cidade de Bauru/SP.

Após a abertura do útero fragmentos de 10 cm^2 de MA e aproximadamente 4 cm^2 de C.U. foram colhidos com o auxílio de pinça anatômica e tesoura estéril. Os fragmentos foram acondicionados em tubos falcon de 50 ml contendo Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, USA) acrescido de 1% penicilina/estreptomicina (Gibco, USA).

A colheita do sangue do cordão umbilical no terço inicial de gestação (TI), não foi possível devido ao diâmetro das veias do cordão umbilical, sendo as amostras então obtidas de fetos do terço médio (TM) de gestação.

O SCU foram obtidos no TM, sendo colhidos 15 mL de sangue utilizando-se seringas estéreis de 20 mL contendo 0,2 mL de heparina a 1000 UI/mL (Hemofol, Cristália, BRA). Os tubos e as seringas foram armazenados a -5°C e transportados no sistema de transporte refrigerado de sêmen Botuflex[®] (Botupharma, Brasil) até o LANÇA.

Para a mensuração da idade gestacional, os fetos tiveram a distância encéfalo coccígea mensuradas segundo a equação descrita por Neves et al (2008): $IG = 22,623 + 4,2528 CC - 0,0124 CC^2$ ($r^2 = 0,98$). De acordo com esta estimativas foram formado os grupos: Terço inicial (TI entre 39 - 112 dias) e Terço médio (TM entre 113 – 224 dias) (Fig.2).

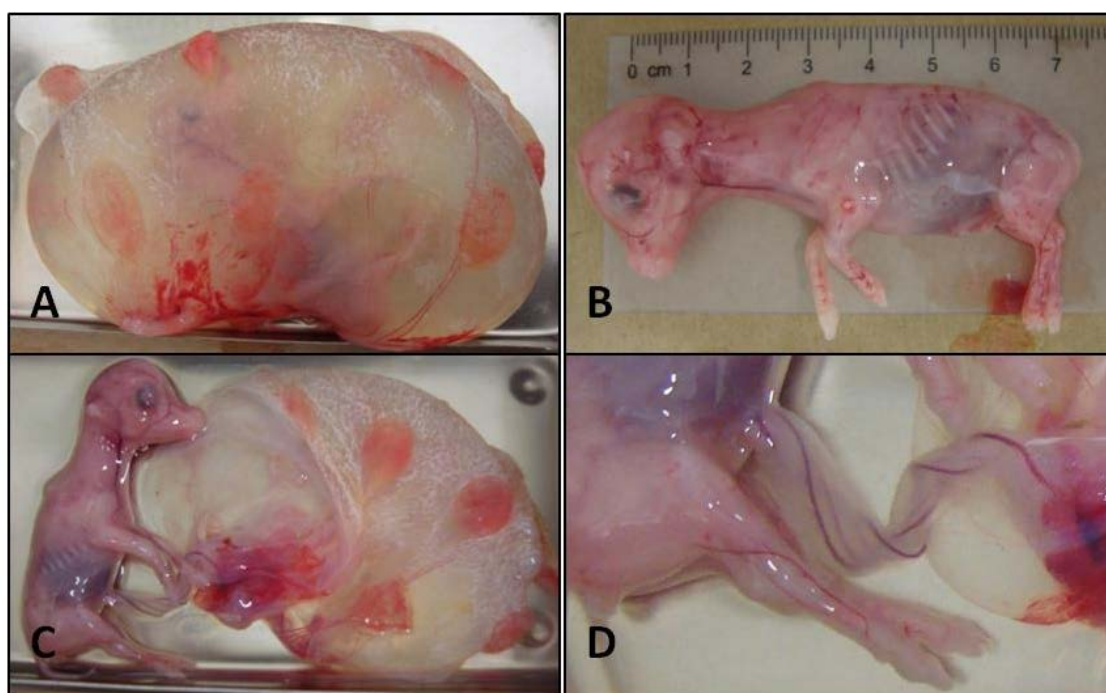


Figura 2: Figura ilustrativa da colheita do material (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical) obtidas de útero gravídico na fase inicial de gestação de bovinos, colhidas em abatedouro (A); mensuração da distância encéfalo coccígea (B); colheita da membrana amniótica (C); colheita da matriz extravascular do cordão umbilical (D).

4.2 Isolamento e cultivo celular

No laboratório, tanto as amostras colhidas no momento de parto (TF) como as colhidas em abatedouro (TI) foram lavadas em Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Invitrogen, USA) acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, USA) e fragmentadas para favorecer a digestão enzimática realizada em solução 0,1% de colagenase tipo 1 (Invitrogen, USA) por 2 horas em banho maria a 37°C. Durante este período as amostras foram agitadas em vortex a cada 15 minutos.

Após a digestão, as amostras foram filtradas em filtro de 70µm (BD, USA) e então centrifugadas a 600G com DMEM baixa glicose por 10 minutos para total remoção da colagenase. Então, o *pellet* celular foi ressuscitado em meio de cultivo previamente citado e cultivadas em garrafas de 25cm² (Sarstedt, USA) e mantidas em estufa a 37,5°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado após 48 horas até alcançar confluência de 80% quando então foram realizadas os subcultivos por tripsinização (TrypLETM Express - Invitrogen, USA) (Fig.3).

As amostras do sangue do cordão umbilical (TM) foram centrifugadas a 600G por 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma) descartado. Ao material remanescente foi adicionado o meio DMEN baixa glicose/F12 (Invitrogen, USA) na proporção de 1:1, sendo que essa mistura foi adicionada lentamente na proporção de 1:1 ao Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Corp, USA), seguida de nova centrifugação na força de 940G por 30 minutos. Após a obtenção das células mononucleares, foi acrescido meio de cultivo e a amostra centrifugada duas vezes a 600G por 10 minutos. Então, o *pellet* celular foi ressuscitado em meio de cultivo previamente citado, cultivadas em garrafas de 25cm² (Sarstedt, USA) e mantidas em estufa a 37,5°C em atmosfera com 90% de umidade e 5% de CO₂.

O meio de cultivo foi trocado após 48 horas até alcançar confluência de 80% quando então foram realizadas os subcultivos por tripsinização (TrypLETM Express - Invitrogen, USA).

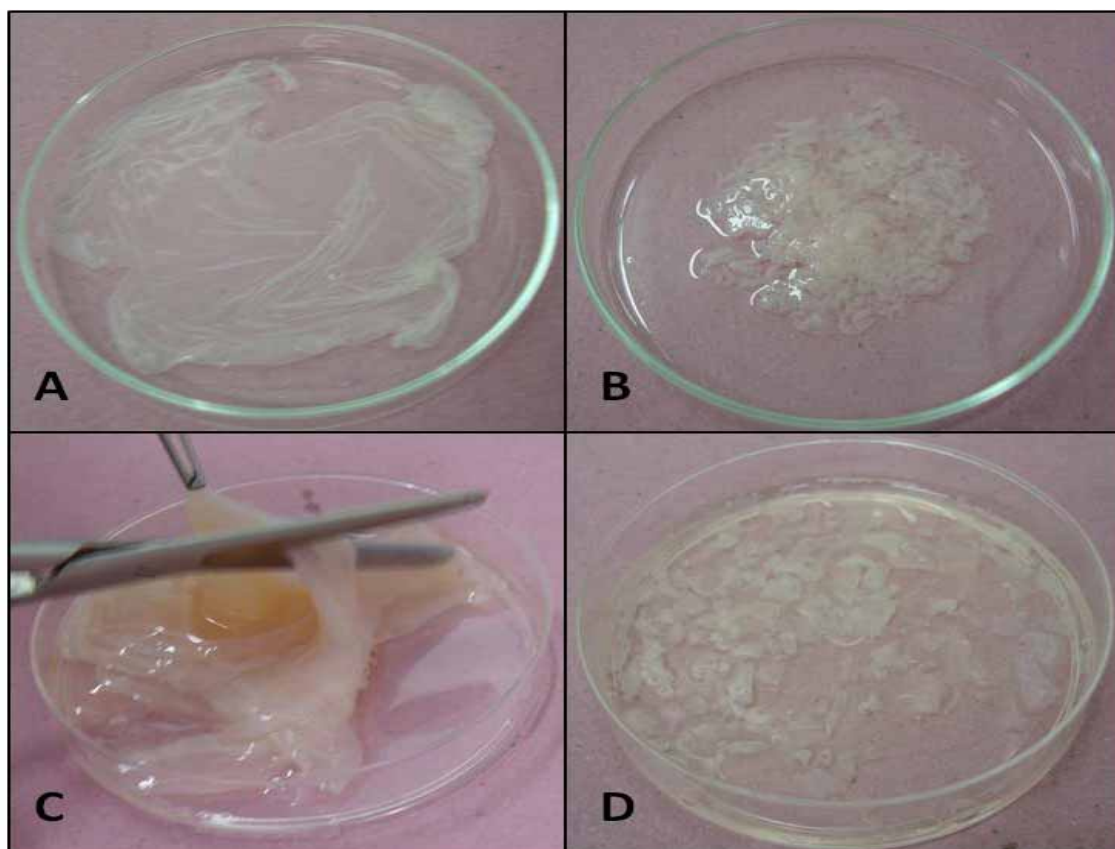


Figura 3: Processamento das amostras de membrana amniótica e de matriz extravascular do cordão umbilical de fetos bovinos colhidos no momento do parto e em abatedouro. Membrana amniótica acondicionadas em placa de petri (A); membrana amniótica fragmentada para facilitar a digestão enzimática (B); matriz extravascular do cordão umbilical acondicionadas em placa de petri (C); matriz extravascular do cordão umbilical fragmentada para facilitar a digestão enzimática (D).

4.3 Subcultivos:

Os subcultivos das amostras de MA, C.U. e SCU dos diferentes períodos gestacionais, foi realizada quando as células atingiram confluência de 80%, elas foram tripsinizadas (TrypLETM Express - Invitrogen, USA) e centrifugadas a 600G por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células resuspendida em meio de cultivo. Neste momento o número de células foram estimadas com o auxílio da câmara de *Neubauer* e um corante de exclusão (Trypan Blue, Gibco, USA). Uma alíquota foi diluída no corante em uma concentração de 1:1 e mantidas por três minutos, tempo o suficiente para corar as células que sofreram morte celular. Uma alíquota de 10ul dessa diluição foi colocada em cada hemicâmera, e foi realizada a contagem dos

quatro quadrantes da extremidade, de forma que a diferença do número de células em cada hemicâmera não ultrapasse 10%. Foi realizada uma média entre as duas hemicâmeras obtendo-se uma média de células vivas, e então, utilizou-se para calcular o número de células/ml a fórmula abaixo, descrita por Zago & Covas (2006). Este procedimento foi conduzido em todas os subconjuntos.

$$\text{Número de células/mL} = \text{média número de células} / \text{número de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

4.4 Caracterização imunofenotípica:

A caracterização imunofenotípica das CTMs das amostras de MA, do C.U, e do SCU dos diferentes períodos gestacionais foram realizada após a terceira passagem (P3). Para isso, as suspensões das CTMs dos diferentes períodos gestacionais foram incubadas com os anticorpos primários Mouse anti CD44 (clone BAG40A, 1:100, VMRD®, USA) mouse anti MHCII FITC (clone CVS20, 1:100, ABD Serotec, VK) e mouse anti CD34 (clone 581, 1:50, BD, USA). Para o marcador CD44 (não conjugado) foi utilizado o marcador secundário goat-anti mouse IgG- FITC (clone STAR117F, 1:200, ABD Serotec, VK). Foi utilizado o protocolo padrão sugerido pelo fabricante de cada um dos anticorpos. As marcações foram baseadas em reatividades cruzadas. As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo FACS Calibur BD®.

4.5 Imunocitoquímica

Para a imunocitoquímica das CTMS das amostras de MA, do C.U, e do SCU dos diferentes períodos gestacionais foram realizada após a terceira passagem (P3), foram acondicionados em placas de 24 “wells” (Sarstedt, USA). Após confluência de 80%, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytotfix/Cytoperm™ (BD, USA), sendo em seguida conduzido o bloqueio da peroxidase endógena por 20 minutos. Após esse período as amostras foram incubadas por uma hora em solução de leite em pó a 3% para o bloqueio de proteínas inespecíficas. Em seguida, o anticorpo primário mouse anti-horse MHC class II monomorphic (clone CVS20, abD Serotec, UK) Rb pAb to NANOG, ABCAM, ac. policlonal goat anti Oct-4 (MILIPORE, 1:100, SCR002, USA)

e o controle negativo IgG anti mouse (Dako Cytomation, DNK) foram incubados por 18 horas a 4°C, no escuro. Os anticorpos primários foram detectados por incubação no sistema de polímeros HiDef HRP mouse/rabbit Polymer Detection System (Cell Marque, CA, USA). A revelação da reação foi conduzida utilizando a solução de substrato cromogênico DAB (Dako Cytomation, DNK) por 5 minutos, seguida de contracoloração com Hematoxilina de Harris (Merck, BRA) por 1 minuto. A avaliação da reação foi realizada em microscópio de luz invertido (Leica Microsystems, GER).

4.6 Ensaio de diferenciação nas tri-linhagens mesodermas (osteogênica, adipogênica e condrogênica)

Osteogênica

Para a diferenciação osteogênica das CTMs das amostras de MA, do C.U. e do SCU, após P3 foram cultivadas em placas de seis “well” (Sarstedt, USA). Com a densidade celular de 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco, USA). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 10 dias.

Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas duas vezes com água deionizada (MILLIQ) e cobertas com o corante Alizarin Red S 2% (Sigma-Aldrich, USA) e pH 4,2 (Sigma, USA) por 3 minutos. Após este período, o excesso de corante foi removido mediante as duas lavagens com água MILLIQ e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de depósitos de matriz de cálcio, corados em vermelho pelo Alizarin Red S.

Adipogênica

Para a diferenciação adipogênica das CTMs das amostras de MA, do C.U. e do SCU, foram cultivadas em placas de seis “well” (Sarstedt, USA). Com a densidade de 60% de confluência o meio de cultivo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (StemPro Adipogenesis Kit, Gibco, USA). Foram realizadas trocas de meio a cada 48-72 horas por 10 dias.

Para a avaliação da diferenciação, as monocamadas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes em PBS, seguida de duas vezes com água MILLIQ e cobertas com o corante Oil Red O (Sigma-Aldrich,USA) por 10 minutos. Após este período, foram lavadas mais duas vezes com água MILLIQ e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de gotículas de lipídeos intracitoplasmático.

Condrogênica

Para a diferenciação condrogênica das CTMs das amostras de MA, do C.U. e do SCU, as células foram tripsinizadas e centrifugadas para obtenção do “pellet” de células. O cultivo foi realizado em tubos falcon de 15 mL e os “pellets” foram mantidos por 24-48 horas no meio de manutenção quando o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco, USA).

Os meios foram trocados a cada 72 horas por 21 dias, e os pellets então fixados em formol tamponado a 10% seguidos de inclusão em parafina, micritomia e foram coradas com HE, Alcian Blue (ph=2,5) e Azul de Toluidina (ph= 1) para a observação de deposição de proteoglicanos.

4.7 Criopreservação

As amostras de membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical, após a terceira passagem foram tripsinizadas e o pellet ressuspendido em criotubos de 1,5ml com meio de congelamento (90% de SFB acrescido de 10% de DMSO) e então devidamente etiquetado, contendo a linhagem celular, passagem, concentração de células por ml e a data de congelamento.

Após a diluição os criotubos foram colocadas em um suporte de refrigeração controlada “Mr. Frosty” (1°- C/minuto a -80- °C – 24 horas, Nalgene) para que ocorresse uma curva controlada de congelamento das células. Após este período as células foram retiradas do freezer -80°C e colocadas rapidamente em botijão de nitrogênio líquido a -196°C.

Descongelamento

Um criotubo de cada amostra foi descongelado para análise de viabilidade, no qual foram utilizadas duas metodologias: a coloração com azul de tripan (estimar integridade de membrana celular) e a marcação com anexina V (avaliar processo de morte celular programada – apoptose), analisadas pelo citômetro de fluxo.

4.8 Análise Estatística

Para a análise estatística os resultados referente aos marcadores CD44, CD34 e MHC II foram expressos em média $\pm$ erro padrão de média e submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando-se o PROC GLM do SAS (SAS, Inst. Inc., Cary, NC, EUA), para verificar se há diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente. Para todas as análises foi adotado o nível de significância $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

Morfologia

As amostras de membrana amniótica colhidas no terço inicial (TI) de gestação obtidas em abatedouro apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 24 horas. Já as amostras colhidas no terço final de gestação colhidas no momento do parto (TF), apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 48-72 horas (Fig.4). As amostras de ambos os períodos gestacionais, permaneceram em cultivo primário até alcançarem confluência de 80-100%, quando realizou-se a primeira passagem.

As amostras de matriz extravascular do cordão umbilical colhidas no (TI) de gestação colhidas em abatedouro apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 24 horas. Já as amostras colhidas no terço final de gestação colhidas no (TF), apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 48-72 horas (Fig.5). Em ambos os períodos gestacionais, as CTMs permaneceram em cultivo primário até alcançarem confluência de 80-100%, quando realizou-se a primeira passagem.

As amostras de sangue do cordão umbilical isoladas do momento do parto não apresentaram adesão à superfície plástica, e consequentemente não cresceram *in vitro*.

A colheita do sangue do cordão umbilical no TI, não foi possível devido ao diâmetro das veias do cordão umbilical, sendo as amostras então obtidas de fetos do terço médio TM de gestação. Quando submetidas ao cultivo, estas células aderiram ao plástico e apresentaram morfologia fibroblastóide, em 48 horas, a qual pôde ser visualizadas somente após a primeira troca de meio devido à alta concentração de hemácias. As células permaneceram em cultivo primário até alcançar confluência de 80-90% (Fig.6).

Nas amostras de membrana amniótica obtidas no TI e TF observou-se colônias circunscritas de células com morfologia poligonal em cultivo primário, compatíveis com células epiteliais, as quais permaneceram sem alterações morfológica, até P3 nas amostras obtida no TF (Fig.7).

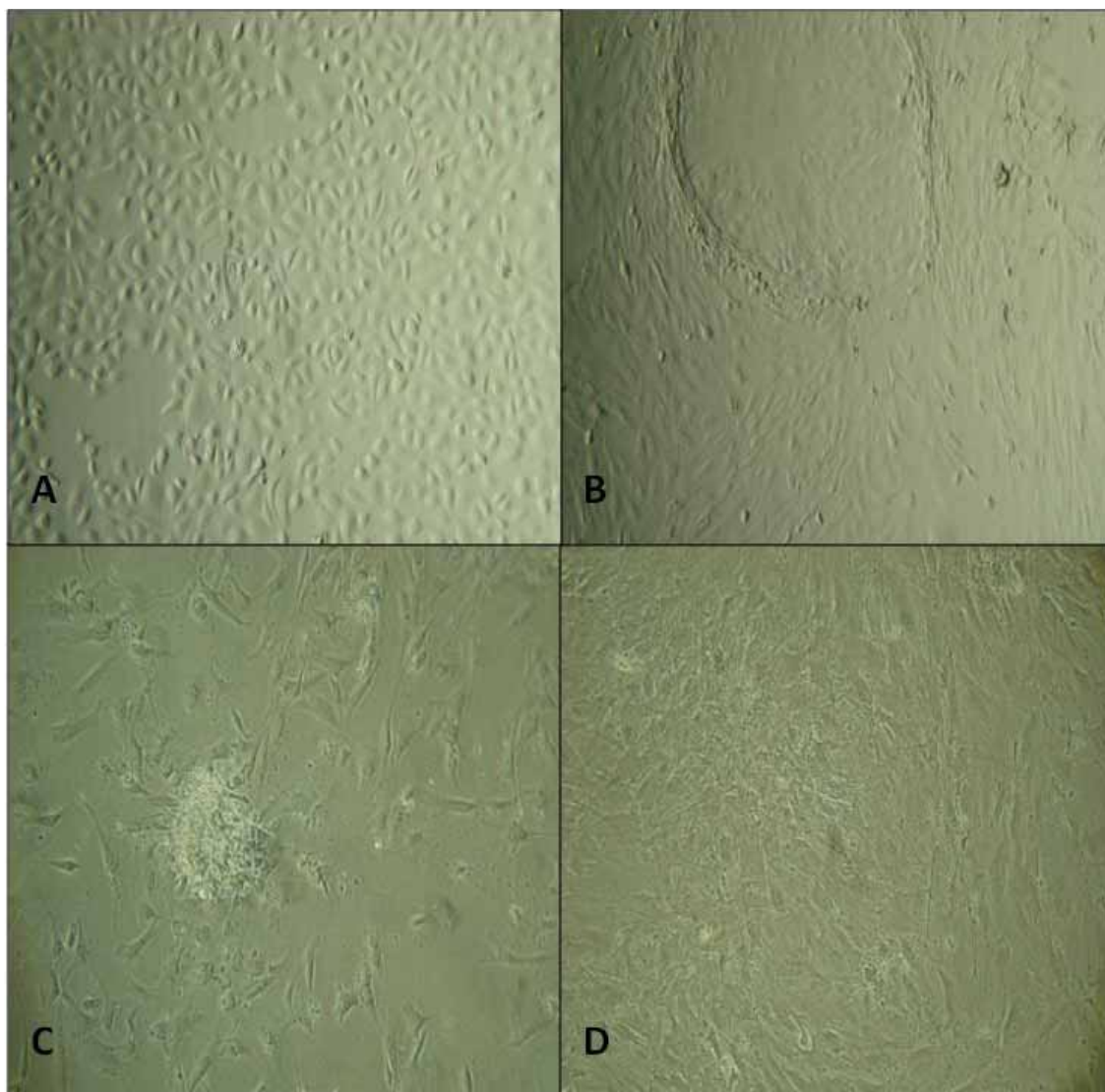


Figura 4: Cultivo primário de células de membrana amniótica colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro. Células apresentando adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 24 horas (A), células de membrana amniótica, com aproximadamente 48 horas de cultivo, apresentando confluência de 90% (B). Cultivo primário de células de membrana amniótica colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas. Células derivadas de membrana amniótica, aderida e apresentando morfologia fibroblastóides em 48-72 horas de cultivo (C). Células de membrana amniótica, com aproximadamente 3-4 dias de cultivo, apresentando confluência de 100% (D). Aumento de 10X (A, B, C e D).

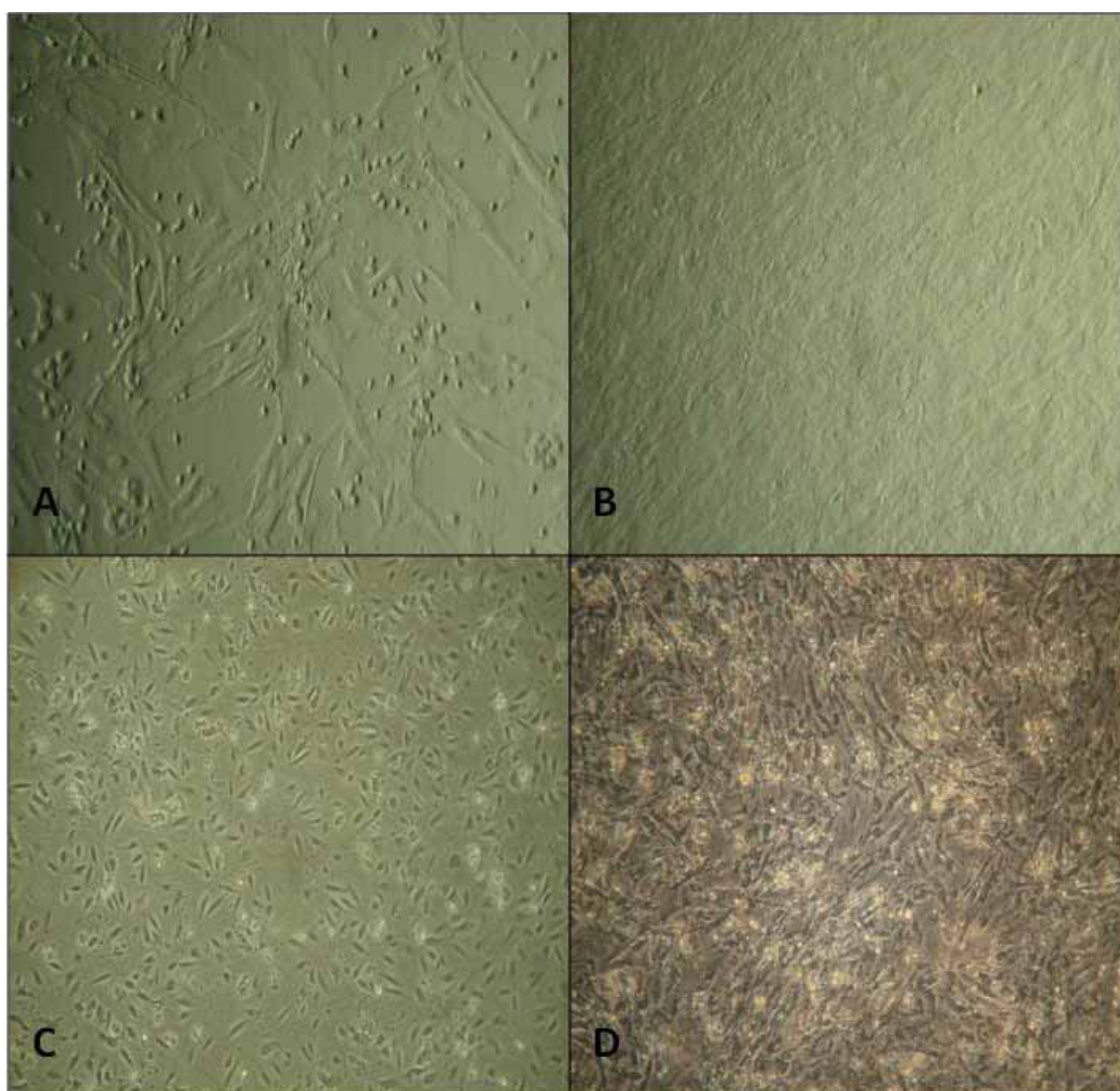


Figura 5: Cultivo primário de células de matriz extravascular do cordão umbilical colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro. Células da matriz extravascular do cordão umbilical apresentando adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide em um período de 24 horas (A), células da matriz extravascular do cordão umbilical, com aproximadamente 48 horas de cultivo, apresentando confluência de 100% (B). Cultivo primário de células de matriz extravascular do cordão umbilical colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas. Células derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical, aderida e apresentando morfologia fibroblastóides em 48-72 horas de cultivo (C). Células de matriz extravascular do cordão umbilical, com aproximadamente 3-4 dias de cultivo, apresentando confluência de 100% (D). Aumento de 10X (A, B, C e D).

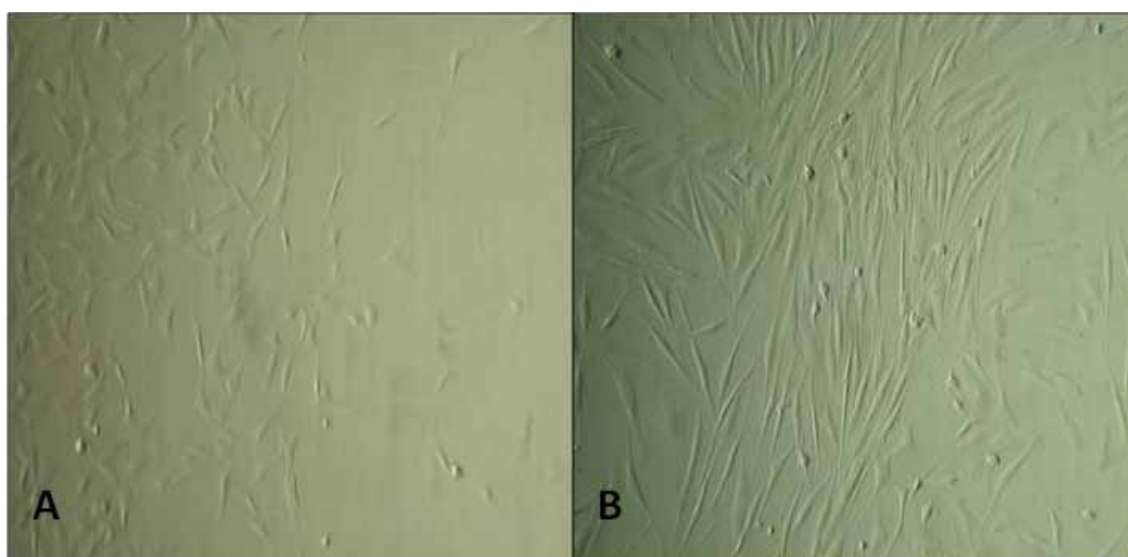


Figura 6: Cultivo primário de células derivadas de sangue do cordão umbilical, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação de amostras obtidas em abatedouro. Células derivadas do sangue do cordão umbilical, aderidas e apresentando morfologia fibroblastóide em 48 horas de cultivo (A). Células do sangue do cordão umbilical, com aproximadamente 72 horas de cultivo, apresentando confluência de 80-90% (B). Aumento de 10X (A e B).

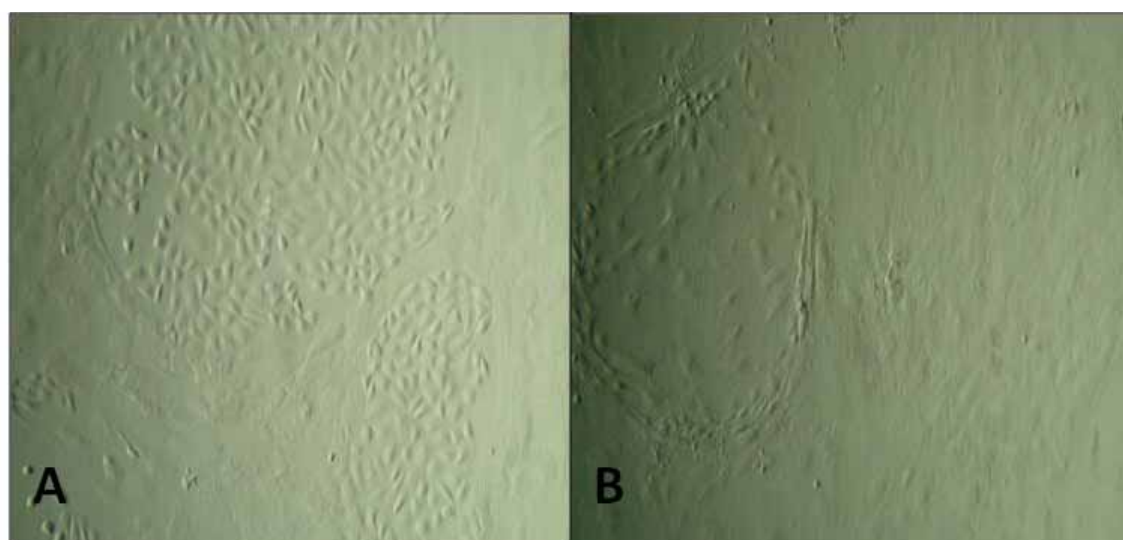


Figura 7: Cultivo primário de células de membrana amniótica colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro. Células

apresentando adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia poligonal (A). Cultivo primário de células de membrana amniótica colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas. Células derivadas de membrana amniótica, aderida e apresentando morfologia poligonal (B).

Imunocitoquímica para os marcadores CD44, Oct-4, NANOG e MHC II

As amostras obtidas de membrana amniótica do (TI) e as obtidas no (TF) apresentaram imunomarcacão positiva para o CD44, Oct-4, NANOG e ausência marcação de MHCII. Ambos os períodos gestacionais foram avaliadas após a terceira passagem (P3), não havendo diferença quanto a marcação entre os diferentes períodos gestacionais (Fig.8).

As amostras obtidas de matriz extravascular do cordão umbilical do (TI) e as obtidas no (TF) apresentaram imunomarcacão positiva para o CD44, Oct-4, NANOG e ausência marcação de MHCII (Fig.9). Ambos os períodos gestacionais foram avaliadas após (P3), não havendo diferença qualitativamente da marcação entre os diferentes períodos gestacionais.

Da mesma forma, as amostras obtidas do sangue do cordão umbilical do (TM) apresentaram imunomarcacão positiva para o CD44, Oct-4, NANOG e ausência marcação para o MHCII, todas as amostras foram avaliadas após a (P3) (Fig.10).

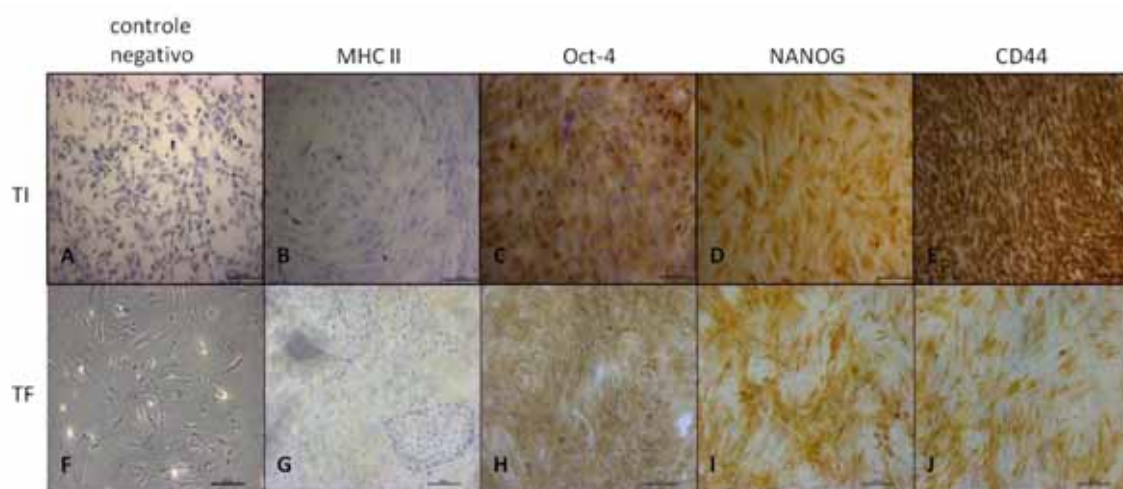


Figura 8: Imunocitoquímica das células derivadas de membrana amniótica, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro para os marcadores MHC II, Oct-4, NANOG e CD44. Células apresentando morfologia fibroblastóide, controle negativo (A); MHCII (B); Oct-4 (C); NANOG(D); CD44 (E). Células derivadas de membrana amniótica obtidas no terço final de gestação de bovinos colhidas no momentos do parto. Células apresentando morfologia fibroblastóide, controle negativo (F); MHCII (G); Oct-4 (H); NANOG (I); CD44 (J). Aumento de 10X (A, B, C, D, E, F, G, H, I, e J).

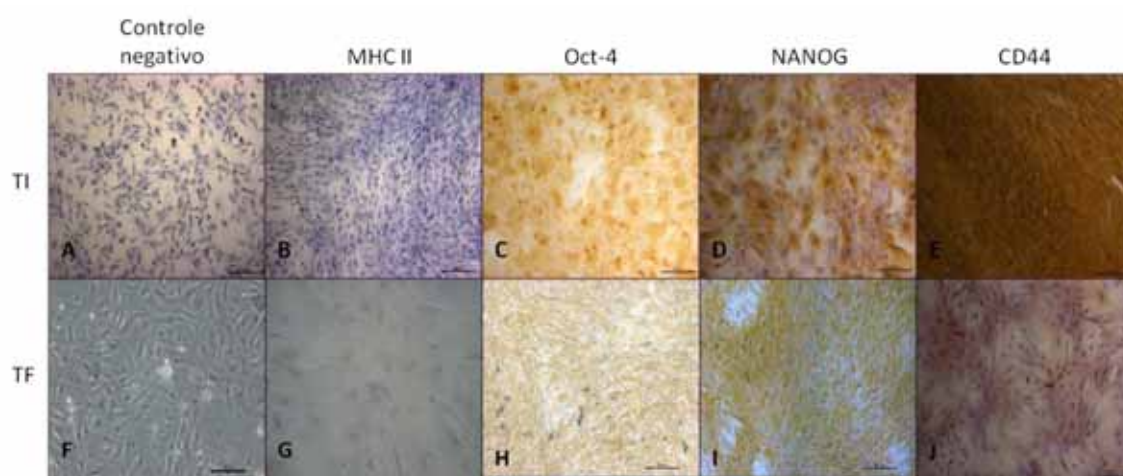


Figura 9: Imunocitoquímica das células derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro para os marcadores MHC II, Oct-4, NANOG e CD44. Células apresentando morfologia fibroblastóide, controle negativo (A); MHCII (B); Oct-4 (C); NANOG(D); CD44 (E). Células derivadas da matriz extravascular do cordão umbilical obtidas no terço final de gestação de bovinos colhidas no momentos do parto. Células apresentando morfologia fibroblastóide, controle negativo (F); MHCII (G); Oct-4 (H); NANOG (I); CD44 (J). Aumento de 10X (A, B, C, D, E, F, G, H, I e J).

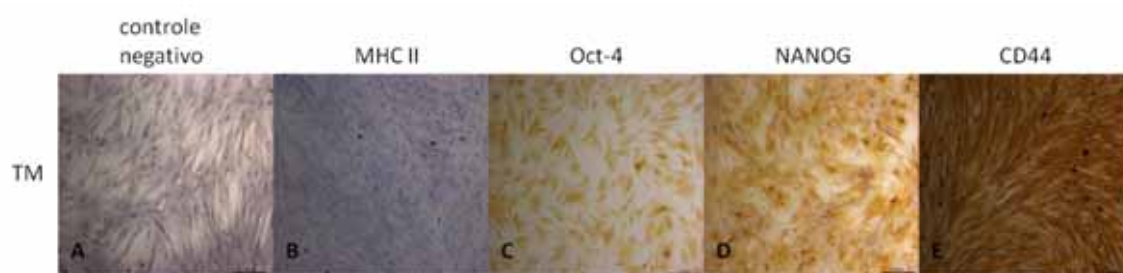


Figura 10: Imunocitoquímica das células derivadas do sangue do cordão umbilical, colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro para os marcadores MHC II, Oct-4, NANOG e CD44. Apresentando morfologia fibroblastóide, controle negativo (A); MHCII (B); Oct-4 (C); NANOG(D); CD44 (E). Aumento de 10X (A, B, C, D e E).

Diferenciação nas tri-linhagens: osteogênica, adipogênica e condrogênica

- CTMs da Ma:

A avaliação do potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* das amostras de membrana amniótica colhidas no (TI) de gestação obtidas em abatedouro e amostras colhidas no (TF) de gestação obtidas no momento do parto foram analisadas em (P3). Todas as amostras dos dois períodos gestacionais apresentaram mudanças morfológicas e presença de depósito de matriz extracelular rica em cálcio (Fig.11). Quando avaliadas para diferenciação adipogênica, todas as amostras dos diferentes períodos gestacionais apresentaram mudanças morfológicas e presença de gotas de lipídio no citoplasma (Fig.12).

A avaliação da diferenciação condrogênica das amostras de membrana amniótica dos diferentes períodos gestacionais, foi realizada por meio de análise histológica dos cultivos em 3D. As amostras foram avaliadas em (P3) e apresentaram mudanças morfológicas e presença de deposição de proteoglicanos (Fig.13).

- CTMs do C.U.:

Na avaliação da diferenciação osteogênica das amostras de matriz extravascular do cordão umbilical obtidas em abatedouro (TI) e de amostras colhidas no momento do parto (TF) foram analisadas em (P3). Observou-se mudanças morfológicas e presença de deposição de matriz extracelular rica em cálcio (Fig.14). Quando avaliadas para diferenciação adipogênica, todas as amostras dos dois períodos gestacionais apresentaram mudanças morfológicas e presença de gotículas de lipídio no citoplasma (Fig.15).

A avaliação da diferenciação condrogênica das amostras de matriz extravascular do cordão umbilical dos diferentes períodos gestacionais, foi realizadas por meio de análise histológica dos cultivos em 3D. Todas as amostras foram avaliadas em (P3) e apresentaram mudanças morfológicas e presença de depósito de proteoglicanos (Fig.16).

- CTMs do SCU:

Na avaliação da diferenciação osteogênica das amostras de sangue do cordão umbilical, colhidas no (TM) de gestação obtidas em abatedouro foram analisadas em (P3) resultando em alterações morfológicas e presença de depósito de matriz extracelular rica em cálcio (Fig.17). Da mesma maneira, quando avaliadas para diferenciação adipogênica, todas as amostras apresentaram mudanças morfológicas e presença de lipídio no citoplasmas (Fig.18).

Para avaliação da diferenciação condrogênica das amostras de sangue do cordão umbilical, foi realizado análise histológica dos cultivos em 3D. Todas as amostras foram avaliadas em (P3) e apresentaram mudanças morfológicas e presença de deposição de proteoglicanos (Fig.19).

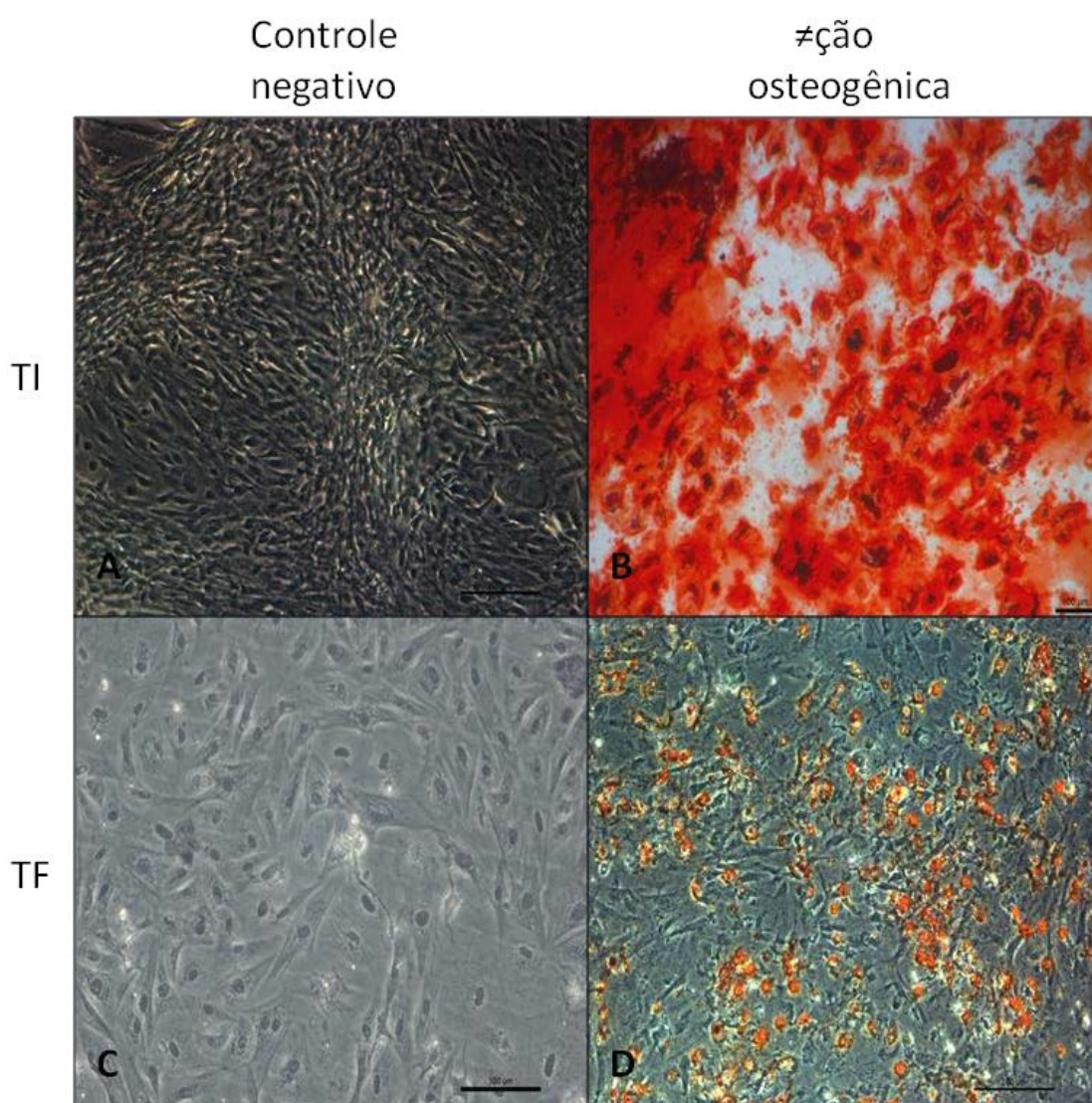


Figura 11: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de membrana amniótica analisadas para diferenciação osteogênica de amostras colhidas de útero grávidico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando mudanças morfológicas, controle negativo diferenciação osteogênica (A); diferenciação osteogênica, observando-se depósito de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (B) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, observando mudanças morfológicas, controle diferenciação osteogênica (C); diferenciação osteogênica, observando-se depósito de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (D). Aumento de 10X (A, B, C e D).

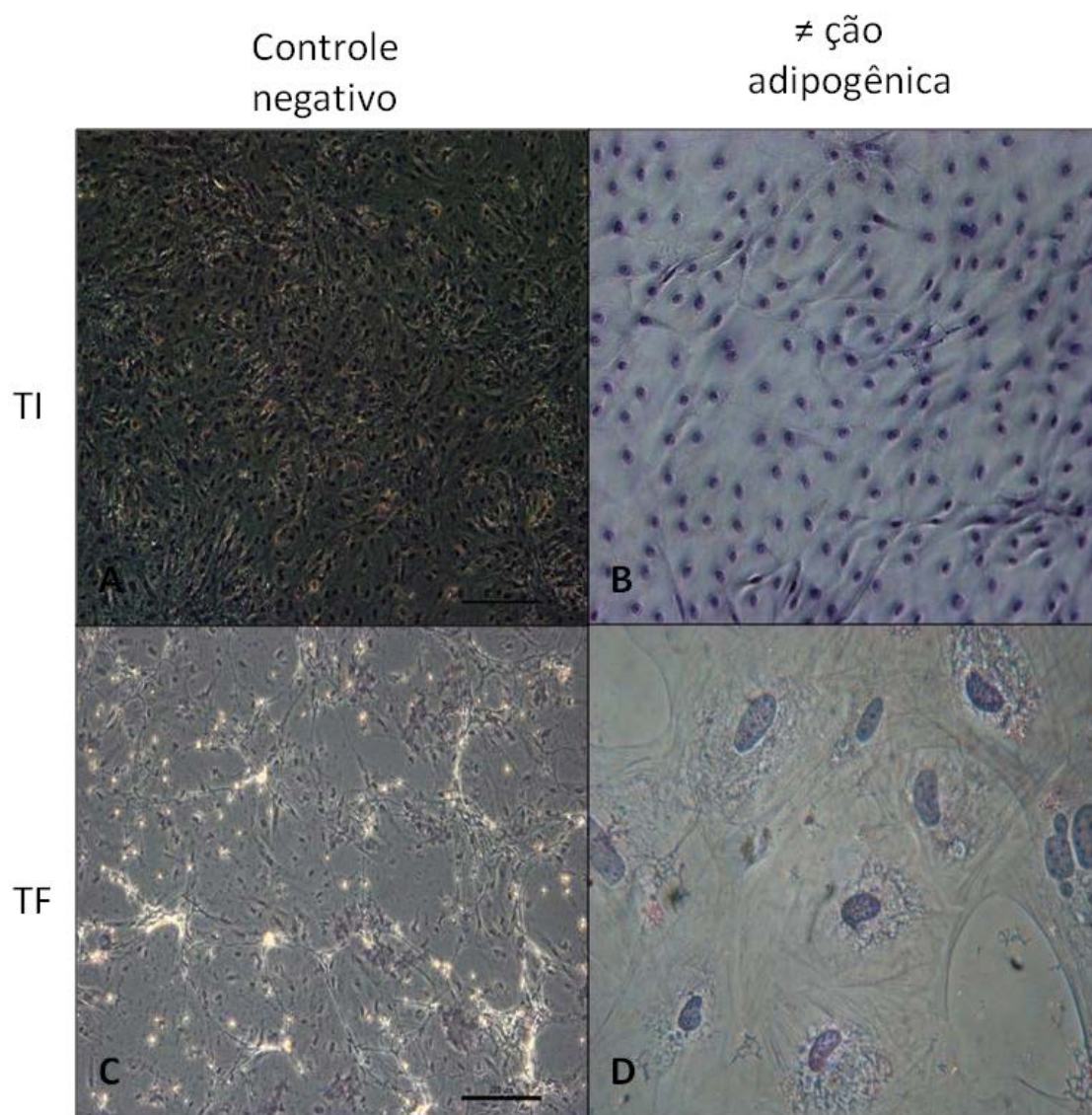


Figura 12: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de membrana amniótica analisadas para diferenciação adipogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando alterações morfológicas, controle diferenciação adipogênica (A); diferenciação adipogênica, observando-se gotículas de lipídios corados por Oil Red (B) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, observando alterações morfológicas, controle diferenciação adipogênica (C); diferenciação adipogênica, observando-se gotículas de lipídios corados por Oil Red (D). Aumento de 10X (A, B e C), aumento de 20X (D).

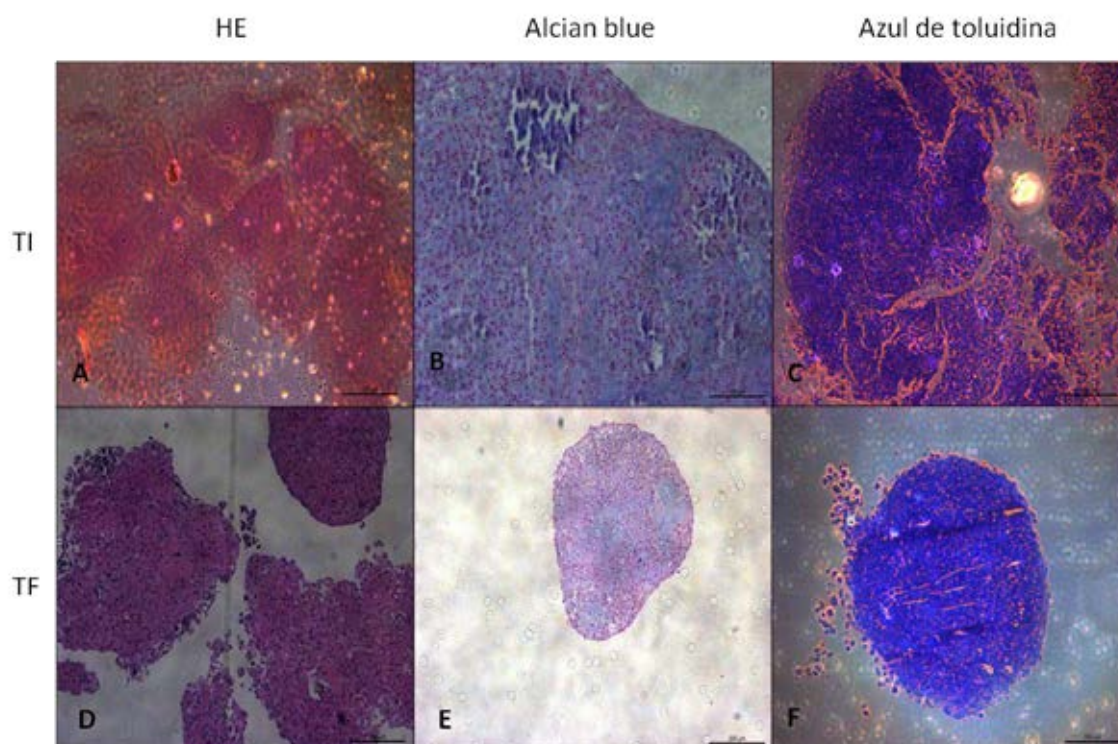


Figura 13: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de membrana amniótica analisadas para diferenciação condrogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando alterações morfológicas observadas em róseo pela coloração HE (A); presença da matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul pela coloração de alcian blue (B); metacromasia pela coloração azul de toluidina (C) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, observando alterações morfológicas observadas em róseo pela coloração HE (D) ; presença da matriz de glicosaminoglicanos observadas em azul pela coloração de alcian blue (E); metacromasia pela coloração azul de toluidina (F). Aumento de 10X (A, B, C, D, e F).

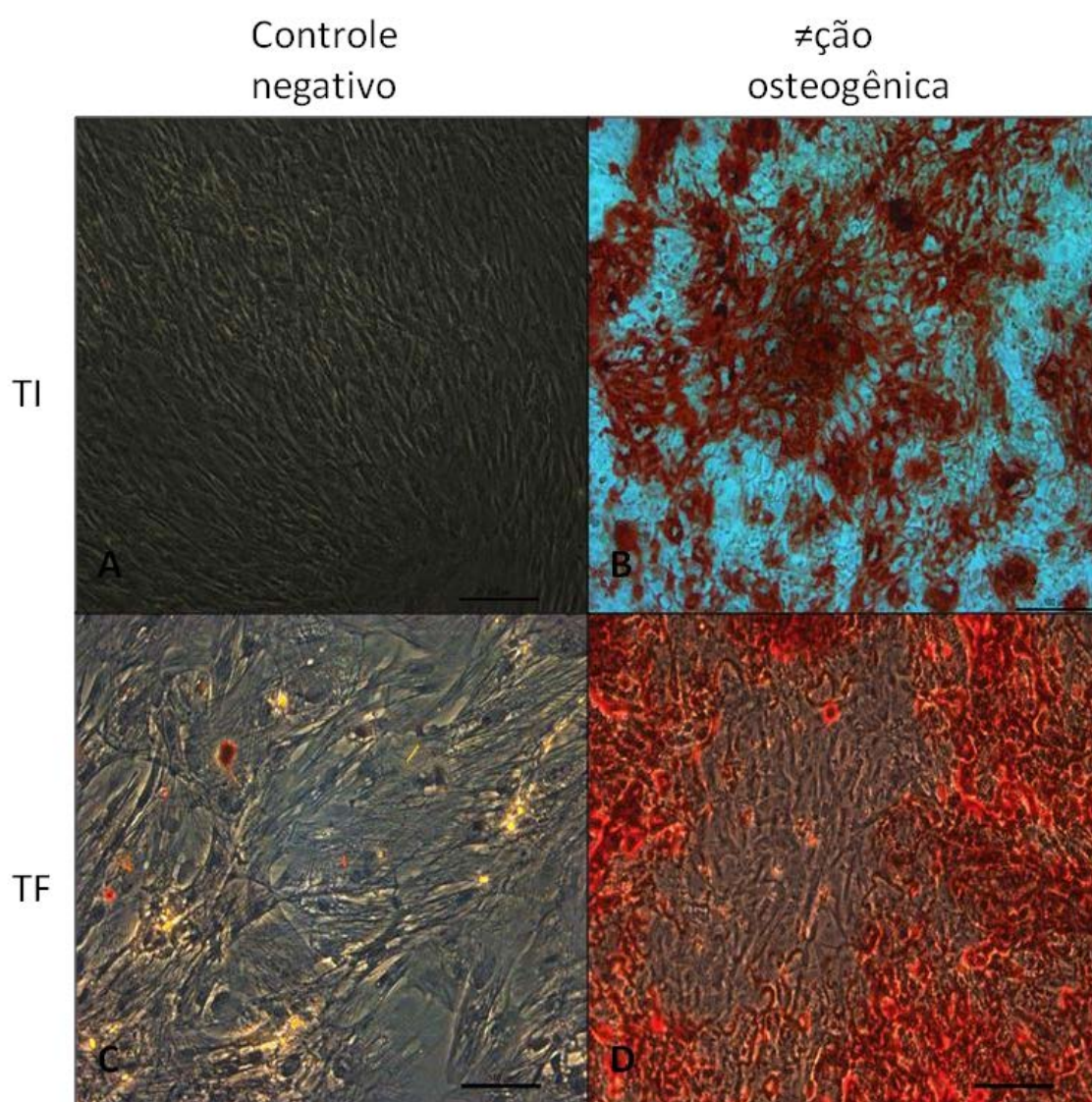


Figura 14: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação osteogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando mudanças morfológicas, controle diferenciação osteogênica (A); diferenciação osteogênica, observando-se depósito de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (B) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, observando mudanças morfológicas, controle diferenciação osteogênica (C); diferenciação osteogênica, observando-se depósito de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (D). Aumento de 10X (A, B, C e D).

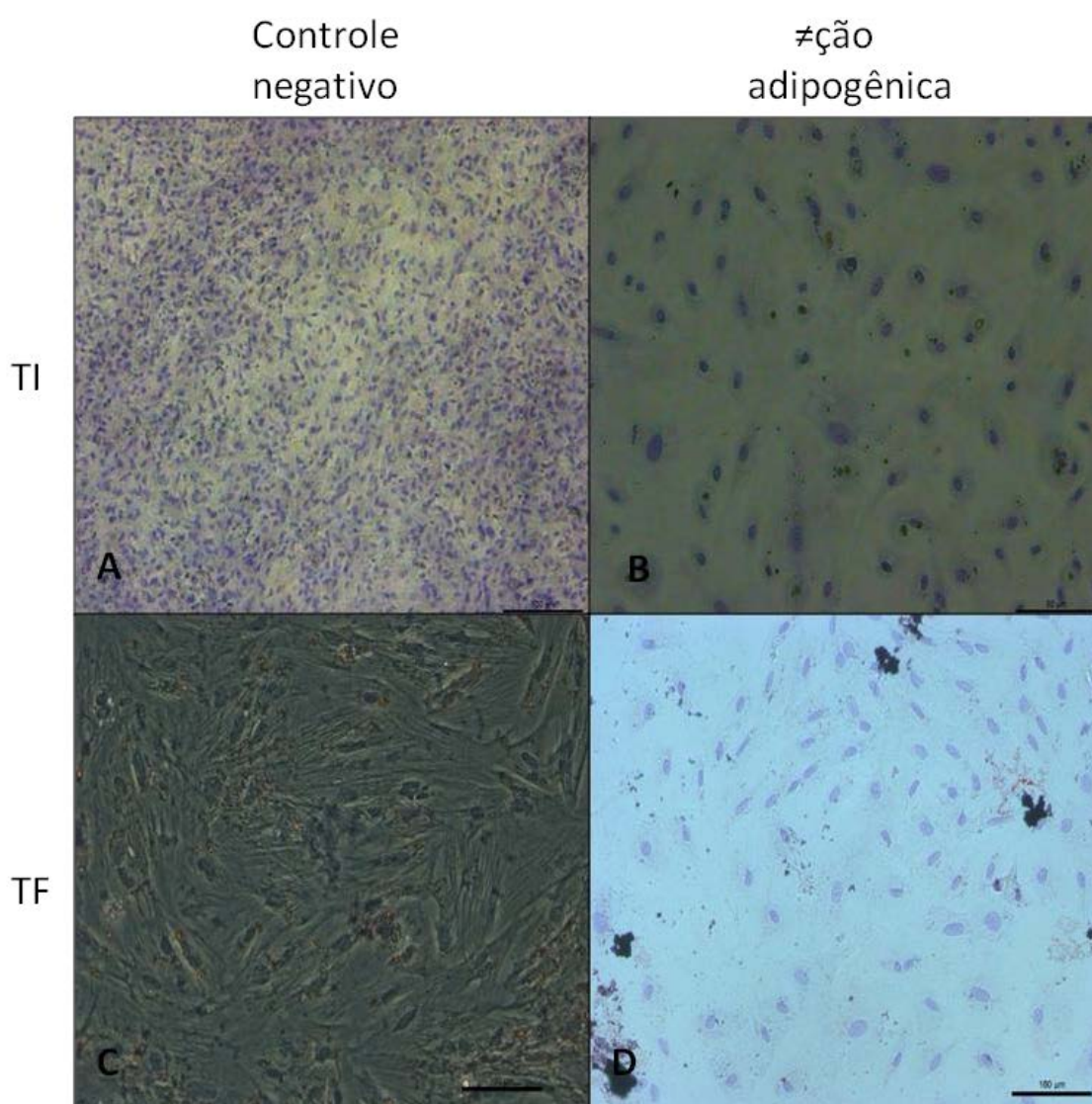


Figura 15: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação adipogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando alterações morfológicas, controle diferenciação adipogênica (A); diferenciação adipogênica, observando-se gotículas de lipídios corados por Oil Red (B) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando alterações morfológicas, controle negativo diferenciação adipogênica (C); diferenciação adipogênica, observando-se gotículas de lipídios corados por Oil Red (D). Aumento de 10X (A, B, C e D).

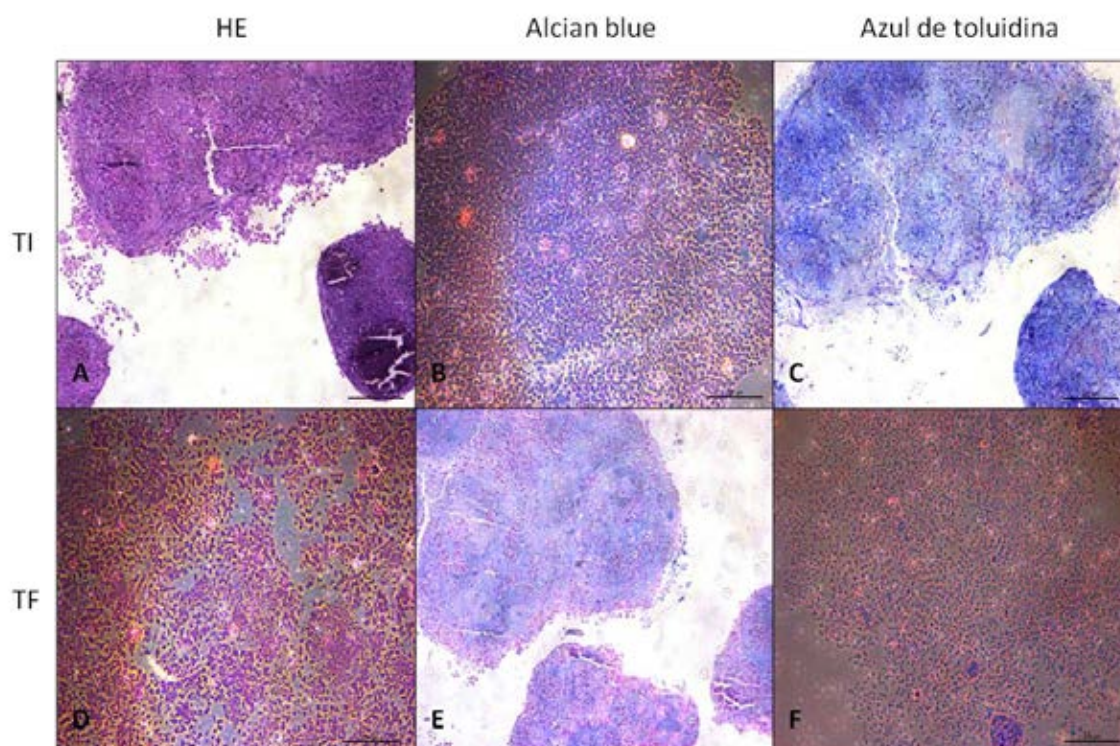


Figura 16: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical analisadas para diferenciação condrogênica de amostras colhidas de útero gravídico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro, observando alterações morfológicas observadas em róseo pela coloração HE (A); presença da matriz de glicosaminoglicanos coradas em azul pela coloração de alcian blue (B); metacromasia pela coloração azul de toluidina (C) e amostras colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando alterações morfológicas observadas em róseo pela coloração HE (D); presença da matriz de glicosaminoglicanos observadas em azul pela coloração de alcian blue (E); metacromasia pela coloração azul de toluidina (F). Aumento de 10X (A, B, C, D, E e F).

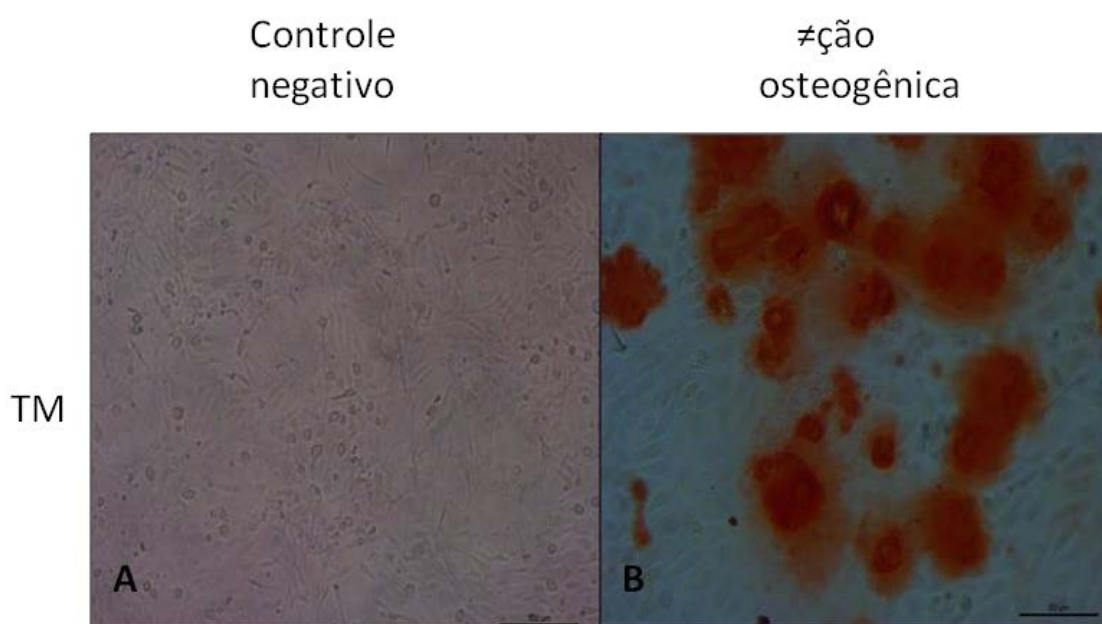


Figura 17: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de sangue do cordão umbilical analisadas para diferenciação osteogênica de amostras colhidas de útero grávidico de fetos bovinos no terço médio de gestação obtidas em abatedouro, observando mudanças morfológicas, controle negativo diferenciação osteogênica (A); diferenciação osteogênica, observando-se depósito de cálcio extracelular corados em vermelho por Alizarin Red (B). Aumento de 10X (A e B).

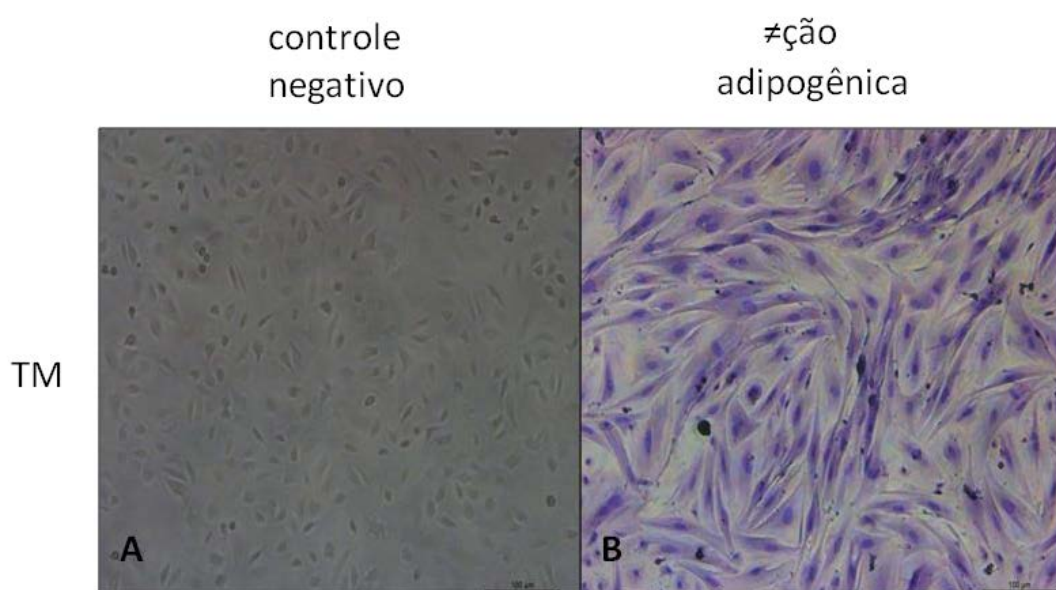


Figura 18: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de sangue do cordão umbilical analisadas para diferenciação adipogênica de amostras colhidas de útero grávidico de

fetos bovinos no terço médio de gestação obtidas em abatedouro, observando alterações morfológicas, controle negativo diferenciação adipogênica (A); diferenciação adipogênica, observando-se gotículas de lipídios corados por Oil Red (B). Aumento de 10X (A e B).

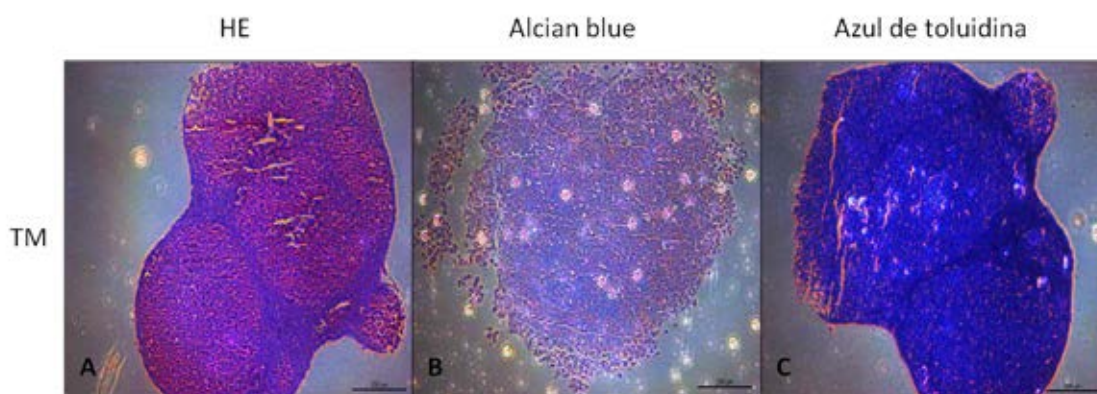


Figura 19: Ensaio de diferenciação das CTMs derivadas de sangue do cordão umbilical analisadas para diferenciação condrogênica de amostras colhidas de útero grávidico de fetos bovinos no terço médio de gestação obtidas em abatedouro, observando alterações morfológicas observadas em róseo pela coloração HE (A); presença da matriz de glicosaminoglicanos observadas em azul pela coloração de alcian blue (B); metacromasia pela coloração azul de toluidina (C). Aumento de 10X (A, B e C).

Citometria de fluxo para os marcadores CD34, CD44 e MHC II

As amostras de MA de bovinos, colhidas no TI em abatedouro e as amostras obtidas no TF, foram avaliadas após P3. Foi considerada marcação negativa quando os resultados eram $\leq 2\%$. Todas as amostras dos diferentes períodos apresentaram marcação positiva para CD44 e não houve diferença ($P < 0,05$) na expressão deste marcador entre os grupos estudados. Nas amostras de TI de gestação não foi evidenciada marcação para os marcadores de superfície CD34 e MHCII. No entanto, nas amostras obtidas no TF a expressão dos marcadores de superfície CD34 e MHCII foi relativamente maior em relação ao TI ($P < 0,05$) sendo considerada positiva. Apesar disso, o índice de marcação não ultrapassou os 10% em nenhuma das amostras (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de média e erro padrão de média para marcadores CD44, CD34 e MHC de classe II das células tronco mesenquimais derivadas de membrana amniótica de bovinos, colhidas de útero gravídico no terço inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.

Expressão dos Marcadores (%)			
Marcadores	Terço	Momento	do
	Inicial	Parto	
CD44	56,8	59,5	
CD34	0,3 ^a	3,4 ^b	
MHCII	1,05 ^a	9,7 ^b	

As amostras de C.U. de bovinos, colhidas no TI em abatedouro e amostras obtidas no TF, foram avaliadas após P3. Todas as amostras dos diferentes períodos gestacionais apresentaram marcação positiva para CD44 e negativos para a marcação CD34. Não houve diferença ($P < 0,05$) na expressão de CD44 e CD34 nos grupos estudados. No entanto, a expressão do MHCII foi relativamente maior nas amostras de TF do que nas amostras de TI, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Valores de média e erro padrão de média para os marcadores CD44, CD34 e MHC classe II de células derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical de bovinos, colhidas de útero grávidico no terço inicial de gestação e de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.

Expressão dos Marcadores (%)			
Marcadores	Terço	Momento	do
	Inicial	Parto	
CD44	77,6	63,4	
CD34	0,4	1,4	
MHCII	0,7 ^a	5,2 ^b	

As amostras do sangue do cordão umbilical de bovinos, colhidas no TM em abatedouro, foram avaliadas após P3. Todas as amostras avaliadas expressaram marcação elevada para CD44, e baixa para CD34 e MHCII, conforme representados na tabela 3.

Tabela 3: Valores de média e erro padrão de média dos marcadores CD44, CD34 e MHC classe II de células derivadas do sangue do cordão umbilical de bovinos, colhidas de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro.

Expressão dos Marcadores (%)	
Marcadores	Terço
Médio	
CD44	
62,7	
CD34	
5,6	
MHCII	
10,2	

Quando comparamos as amostras de MA e C.U. de bovinos nos diferentes períodos gestacionais, não foram observadas diferenças ($P < 0,05$) para cada marcador

(CD44, CD34, MHCII) entre os momentos estudados, demonstrados na tabela 4. Entretanto as amostras colhidas no TF de gestação apresentaram positividade para MHCII ($\geq 2\%$). Apesar disso, como os valores observados foram baixos, não houve diferença estatística em relação as amostras negativas ($\leq 2\%$).

Tabela 4: Valores da expressão em porcentagem dos marcadores CD44, CD34 e MHC classe II comparando fontes e grupos de células derivadas de membrana amniótica e matriz extravascular do cordão umbilical de bovinos, colhidas no terço inicial de gestação em abatedouro e de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas.

Expressão dos marcadores (%) entre fontes e grupos				
Marcadores	MA(TI)	MA(TF)	CU(TI)	CU(TF)
CD44	56,87	59,53	77,63	63,45
CD34	0,38	3,47	0,47	1,45
MHCII	1,05	9,77 ^a	0,78	5,25 ^a

Análise de viabilidade, apoptose e necrose

As amostras obtidas de MA do TI e as obtidas no TF apresentaram viabilidade de 80%. As CTMs das amostras dos diferentes períodos gestacionais foram criopreservadas após a terceira passagem P3 e descongeladas para análise de viabilidade, apoptose e necrose ($P>0,05$) entre os diferentes períodos gestacionais (Fig.20).

As amostras obtidas de C.U. do (TI) e as obtidas no TF apresentaram viabilidade de 80%. Ambos os períodos gestacionais foram criopreservadas após a

terceira passagem (P3) e descongeladas para análise de viabilidade, ($P>0,05$) entre os diferentes períodos gestacionais (Fig.21).

Da mesma forma, as amostras obtidas do sangue do cordão umbilical do (TM) apresentaram viabilidade de 90% (fig.22).

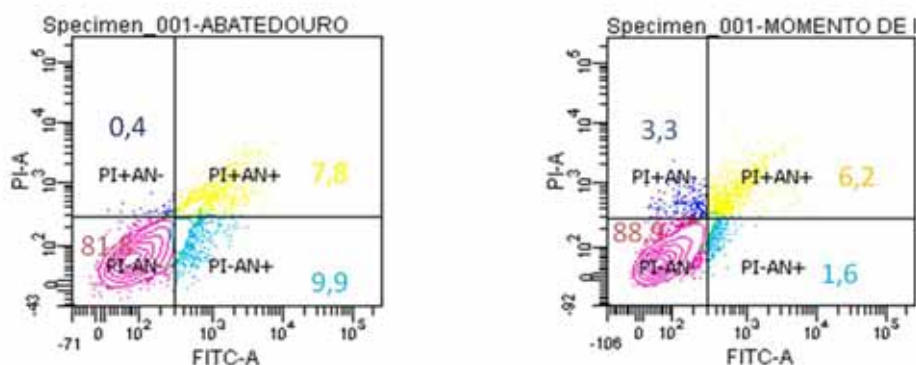


Figura 20: Amostras derivadas de membrana amniótica colhidas de útero grávidico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando viabilidade de 80% após serem criopreservadas.

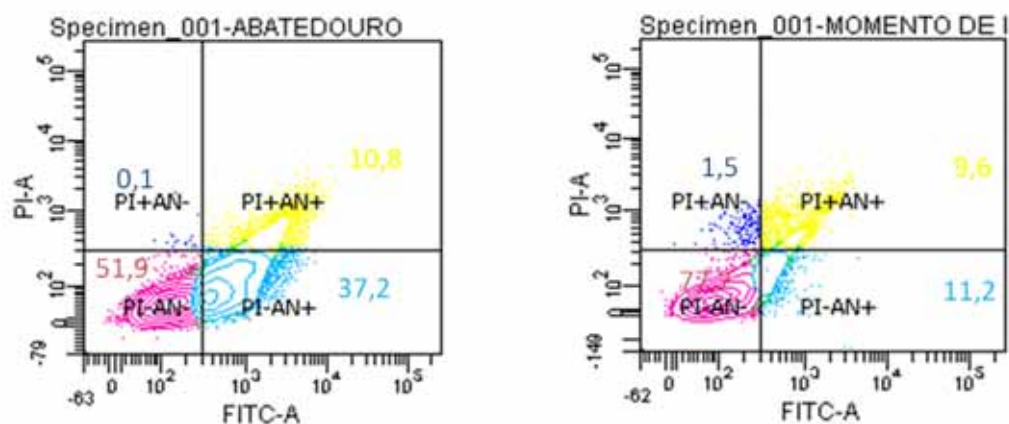


Figura 21: Amostras derivadas de matriz extravascular do cordão umbilical colhidas de útero grávidico de fetos bovinos na fase inicial de gestação em abatedouro e colhidas de fetos a termo durante o parto natural assistido de vacas holandesas, apresentando viabilidade de 80% após serem criopreservadas.

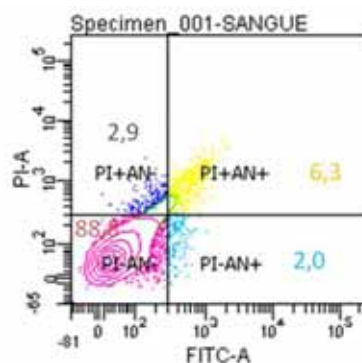


Figura 22: Amostras derivadas de sangue do cordão umbilical colhidas de útero gravídico de fetos bovinos no terço médio de gestação em abatedouro, apresentando viabilidade de 90% após serem criopreservadas.

6. DISCUSSÃO

A busca por novas fontes de células tronco mesenquimais (CTM) como alternativa a medula óssea tem crescido nas últimas décadas. Neste sentido, os anexos fetais destacam-se como uma fonte vantajosa por serem tecidos normalmente descartados após o parto, sendo portanto, de fácil obtenção, de colheita não invasiva e com grande possibilidade de utilização para formação de bancos de armazenamento na medicina humana (FAUZA, 2004; GUCCIARDO, 2008) e veterinária (CORRADETTI et al., 2013).

Por este motivo este estudo teve como objetivo isolar, caracterizar, diferenciar e criopreservar células tronco mesenquimais de fetos bovinos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical), obtidas de fetos a termo, durante o parto natural assistido de vacas holandesas, bem como de fetos bovinos na fase inicial de gestação obtidas em abatedouro, comparando suas características e a expressão de marcadores. O sangue do cordão umbilical foi colhido somente de fetos no terço médio de gestação em abatedouro.

As amostras obtidas de membrana amniótica e matriz extravascular do cordão umbilical colhidas no terço inicial de gestação bem como sangue do cordão umbilical colhidas no terço médio de gestação em abatedouro, foram facilmente isoladas após transporte por até 48 hrs refrigeradas a 5°C. A colheita em abatedouro se mostrou mais fácil e livre de contaminação ambiental quando comparada à colheita a campo, uma vez

que no momento do parto, se as membranas fetais tocarem a cama da baia antes da coleta, estas não poderão ser aproveitadas .

As células obtidas no TI da gestação apresentaram aderência ao plástico e aquisição da morfologia fibroblastóide muito rapidamente 24hrs, alcançando confluência de 80-90% em um período de 48 horas. O mesmo ocorreu com as células do sangue do cordão umbilical obtidas no TM da gestação que em 72hrs após o início do cultivo já se encontravam em confluência. Por outro lado as células obtidas dos tecidos fetais no momento do parto apresentaram crescimento um pouco mais lento, com aderência após 48hrs e confluência em 3-4 dias. Estes dados corroboram com os achados relatados em estudos com células humanas (ZHANG & FAN, 2010), caninas (LEE et al., 2012) e bovinos (CORRADETTI et al., 2013), sugerindo um alto índice de proliferação em células obtidas de tecidos fetais. Estes resultados também foram confirmados por experimentos anteriores realizados em nosso laboratório para outras espécies animais, uma vez que a aderência ao plástico foi observada após 4,8 dias para células do cordão umbilical equino, com confluência de 80% após 6 dias de cultivo (BARBERINI et al., 2014).

No presente trabalho, em cultivos primários de células obtidas da membrana amniótica frequentemente observou-se colônias circunscritas de células com morfologia poligonal. Resultados semelhantes foram obtidos por MIKI et al., (2005) que descreveu tais células como sendo da porção epitelial da membrana amniótica. Existem diversos relatos da presença destas células em cultivo e contradições quanto ao número de passagens nas quais elas continuam presentes. PAROLINI et al. (2008) afirma que estas células se proliferam rapidamente entre as passagens 2 a 6. Da mesma forma DÍAZ-PRADO et al. (2010) indicam que ambas as populações de células (mesenquimais e epiteliais) mantêm suas características fenotípicas até a 9 passagem. Por outro lado SONCINI et al. (2007), confirmou suas características até 15ª passagem sem alterações morfológicas. No presente estudo observou-se a presença de células semelhantes as epiteliais em amostras de membrana amniótica colhidas no TI da gestação, com proliferação até a 3ª passagem, sem alterações morfológicas, corroborando com os trabalhos descritos na literatura.

Na análise imunocitoquímica, realizadas diretamente nas placas de cultivo, todos os tecidos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do

cordão umbilical) dos diferentes períodos gestacionais (TI, TM e TF) apresentaram marcação para CD44, confirmando sua origem mesenquimal, e expressão de marcadores de pluripotência como Oct-4 e NANOG juntamente com a ausência de marcação para MHC de classe II. Estes resultados corroboram com o observado por outros autores (LEE et al., 2012; CALLONI et al., 2014) que observaram a presença de marcadores para células pluripotentes em cultivos celulares de tecidos fetais. No entanto discorda de resultados prévios obtidos em nosso laboratório para a espécie equina (DE VITA et al., 2013) e dos resultados obtidos por URANIO et al., (2011) para a espécie canina. Como a metodologia de análise utilizada foi qualitativa, sugere-se a utilização de uma metodologia quantitativa para verificar se existem diferenças nas expressões destes marcadores entre os grupos (TI e TF).

A marcação positiva para CD44 foi confirmada na avaliação por citometria de fluxo em todos os tecidos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) nos diferentes períodos gestacionais (TI, TM e TF). Este resultado é compatível com o observado por outros autores em tecidos fetais (IACONO et al., 2012, DE VITA et al., 2013). Entretanto, esta marcação não foi muito elevada, uma vez que de acordo DOMINICI et al., (2006) o ideal seria uma marcação $\geq 95\%$. Vale ressaltar que a não especificidade do anticorpo pode ter contribuído para a queda nos valores de positividade.

Quando o marcador de superfície CD34, característico de células hematopoiéticas, foi avaliado observou-se negatividade tanto nas amostras de membrana amniótica como nas de matriz extra-vascular do cordão umbilical no terço inicial de gestação, concordando com dados da literatura (CARDOSO et al., 2012; ROUBELAKIS et al., 2012; IACONO et al., 2012). Entretanto, nas amostras de membrana amniótica colhidas no terço final de gestação, bem como nas amostras de sangue do CU, a expressão de CD34 foi considerada positiva ($> 2\%$). Estes resultados são semelhantes aos observados por Seo et al. (2012) onde as células de MA canina apresentaram baixa expressão para o CD34 (2,62%).

Da mesma forma a expressão de MHCII foi negativa nas amostras colhidas no terço inicial de gestação, mas considerada positiva nas amostras colhidas no TF e nas oriundas do sangue do CU. Estes resultados concordam com o observado em experimentos prévios realizados em nosso laboratório onde observou-se 5,9% de

expressão de MHCII em células do cordão umbilical de equinos (BARBERINI et al., 2014). Apesar das amostras terem sido consideradas positivas, a expressão de MHCII foi extremamente baixa e essa classificação (negativa ou positiva), varia de acordo com os autores (DOMINICI et al., 2006; SEO et al., 2012, YUAN et al., 2013). Vale ainda ressaltar que quando a expressão de MHCII foi avaliada pela técnica de imunocitoquímica todas as amostras foram negativas. Sabe-se que MHC do tipo II somente é expresso nas membranas de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) que inclui células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (TEVA et al., 2010), e a não expressão nas CTMs, indica um potencial efeito imunomodulatório (HOYNOWSKI et al., 2007; CARRADE et al., 2012).

Uma das formas de se caracterizar células tronco mesenquimais é testar sua capacidade para se diferenciar em tecidos da linhagem mesodermal. No presente estudo todos os tecidos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) dos diferentes períodos gestacionais (TI, TM e TF) apresentaram capacidade de diferenciação adipogênica observada pela presença de gotículas de lipídios no citoplasma, diferenciação osteogênica observada pela presença de matriz extracelular de cálcio, e capacidade de diferenciação condrogênica observada pela presença de matriz extracelular rica em proteoglicanos. Estes resultados corroboram com os estudos descritos na literatura por CORRADETTI et al., (2013); IACONO et al., (2012); LEE et al., (2012); DE VITA et al., (2011) e RAUOFI et al., (2011).

As células se diferenciaram nas linhagens osteogênica e adipogênica em 10 dias, concordando com os resultados de Barberini et al. (2014) para tecido fetal equino e Maia et al. (2011) para MO equina. Já para a diferenciação condrogênica foram necessários 21 dias o que também concorda com resultados prévios obtidos em nosso laboratório para CTMs obtidas de medula óssea (MAIA et al. 2013) e de tecido fetal equino (DE VITA et al., 2014 e BARBERINI et al., 2014). O maior tempo necessário para a indução da diferenciação condrogênica pode estar associado ao tipo de cultivo celular utilizado, uma vez que neste procedimento foi realizado um cultivo 3D em pellet. Avaliações quantitativas quanto a produção de cálcio, lipídeos e matriz cartilaginosa, assim como expressão gênica, também poderiam ser utilizadas na comparação entre os diferentes tecidos estudados. Entretanto o alto custo dessas análises limitou a sua utilização nas condições do presente experimento.

Quando se pensa em terapia celular deve-se considerar a formação de bancos de células que ofereçam uma maior disponibilidade de material para o tratamento de afecções. Desta forma, é necessário utilizar protocolos seguros onde as células possam se manter viáveis por longos períodos. Em estudo pioneiro, CTMs provenientes do sangue do cordão umbilical foram criopreservadas por tempo prolongado obtendo-se resultados positivos, em relação à expansão e diferenciação *in vitro* destas pós-congelamento (LIU et al., 2011). No presente experimento, após a descongelação as CTMs de todos os tecidos testados apresentaram viabilidade acima de 80% quando analisadas pela citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio e anexina V.

O sucesso da metodologia de criopreservação utilizada está associado a escolha do crioprotetor, a utilização de uma curva controlada de resfriamento bem como a uma metodologia eficiente de descongelamento. Utilizando células de líquido amniótico Janz et al. (2012), testaram alguns crioprotetores, e demonstraram que o glicerol e o DMSO mantêm uma melhor viabilidade, assim como as características de proliferação e marcadores específicos, quando criopreservadas por 6 meses. CHAYTOR et al. (2012) demonstraram que tão importante quanto a forma de congelar, é também a inibição da recristalização de gelo na pós-congelação, o que foi obtido no presente experimento através da manutenção das células em banho-maria sob leve agitação até ficar uma minúscula pedra de gelo, e ao gotejamento da amostra no momento da re-hidratação.

7. CONCLUSÃO

Baseando nos objetivos propostos, podemos concluir que as células tronco mesenquimais podem ser isoladas com facilidade tanto da membrana amniótica como da matriz extra vascular do cordão umbilical de fetos bovinos. Com possibilidade de obtenção adequada destas fontes tanto em abatedouro como de fetos a termo no momento do parto natural assistido. O transporte a 5°C por até 48 horas também se mostrou viável para o encaminhamento das amostras até o laboratório.

A análise morfológica e de crescimento celular realizada neste estudo indicou que as CTMs de tecidos fetais bovinos apresentam alto potencial de adesão e rápida proliferação *in vitro*.

A avaliação imunocitoquímica indicou que as CTMs dos tecidos analisados apresentam características típicas de células estromais, mas também sinais de pluripotência, o que sugere um alto potencial terapêutico.

A baixa expressão de MHCII indica uma característica de baixa imunogenicidade desejável em células destinadas ao uso em terapia celular.

Tanto as células da MA como da C.U., bem como do SCU apresentaram bom potencial de diferenciação em tecidos mesodermis, confirmando assim sua caracterização como CTMs.

A viabilidade celular foi preservada com a utilização de DMSO como crioprotetor e utilização de curvas de congelamento e descongelamento controladas indicam a possibilidade do armazenamento destas células em bancos de células.

Nossos resultados sugerem que todos os tecidos (membrana amniótica, matriz extravascular do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical) dos diferentes períodos gestacionais (TI, TM e TF) são excelentes fontes de células tronco mesenquimais para a medicina bovina, mantendo suas características morfológicas mesmo após serem criopreservadas, porém é necessário estudos mais aprofundados relacionados a identificação de mecanismos e de moléculas que mediam sua ação biológica e que controlam a sobrevivência e proliferação destas células quando inoculadas.

8. REFERÊNCIAS

BARCLAY, A.E.; FRANKLIN, K.J. the feoto circulation and cardiovascular system, and the changes that they undergo at birth. Illiniois: Charles e Thomas Publisher, p: 59-154, 1945.

BARBERINI, D.J.; FREITAS, N.P.P.; MAGNINI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUDANO, M.J.; GOLIM, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from boné marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. Stem Cell Research & Therapy. 5:25 <http://stemcellres.com/content/5/1/25>, 2014.

BENSON, C.M.K.; BENSON, J.D.; CRITSER, J.K.. An improved cryopreservation method for mouse embryonic stem cell line. Cryobiology. v. 56, p. 120-130, 2008.

BERNIRCHKE, K.; KAUFMAN, P. Pathology of the human placenta. New York: Springer Verlag, p: 273-281, 2000.

BIEBACK, K.; KERN, S.; KLUTER, H.; EICHLER, H. Critical paramenters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem cells. v. 22, n°: 625-34, 2006.

BRANCH, D.R.; CALDERWOOD, S.; CECUTTI, M.A.; HERST, R.; SOLH, H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. Transfusion v.34, n°.887-890, 1994.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANS, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Ver. Bras. Hematol. Hemoter. v. 31, n°: 25-35, 2009.

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

CORRADETTI, B.; LANGE-CONSIGLIO, A.; BARUCCA, M.; CREMONESI, F.; BIZARRO, D. Size-sieved subpopulations of mesenchymal stem cells from intra vascular and perivascular equine umbilical cord matrix. Cell Prolif. v. 44, n°: 330-342, 2011.

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

CHAYTOR J. L.; TOKAREW J. M.; KWU L.; LECLERE M.; TAM R. Y.; CAPICCIOTI C. J.; GUOLLA L.; MOO E. V.; FINDLAY C. S.; ALLAN S. A.; BEN R. N., Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*, v.22, n.1, p.123-133, 2012.

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

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

DE VITA, B.; MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; ALVARENGA, F.C.L.; AMORIN, R.L.; PRESTES, N.C. Isolation and Culture of Amniotic Membrane and Umbilical cord Mesenchymal Stem Cells of Canine Foetus In: ANNUAL INTERNATIONAL MEETING OF THE PORTUGUESE SOCIETY FOR STEM CELLS AND CELLULAR THERAPY, 5., 2001, Guimarães, Portugal. *Proceeding...* Guimarães, Portugal, 2010.

DE VITA, B.; CAMPOS, L.L.; LISTONI, A.J.; MAIA, L.; SUDANO, M.J.; CURCIO, B.R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PRESTES, N.C. Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. *Pesq. Vet. Bras.* 33(4):535-542, 2013.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*, v.28, n°:875–884, 2000.

DÍAZ-PRADO, S.; MUINOS-LÓPES, E.; HERMIDA-GOMES, T.; CICIONE, C.; RENDAL-VÁSQUEZ, M.E.; FLUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F.J.; FLANCO, F.J.; Human amniotic membrane as na alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*, v.81, n.3, p: 162-171, 2011.

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

EGGHOFFER, E.; HOOGDUIJN, M.J. Mesenchymal stem cells cell-educated macrophages. *Transplantation Research*. v.1:12. n°:1-5, 2012.

ENGELA, A.U.; BAAN, C.C.; DOR, F.J.M.F.; WEIMAR, W.; HOOGDUIJN, M.J. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Frontiers in immunology*. v.3, n°: 1-8, 2012.

FAUZA, D. Amniotic fluid stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* v. 18, n°: 877-91, 2008.

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

FLEMING, K. K.; HUBEL, A., Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfusion and Apheresis Science*, v. 34, n°. 309-315, 2006.

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

GRILLI, G.; PORCELLINI, A.; LUCARELLI, G. Role of serum on Cryopreservation and subsequent viability of mouse bone marrow hematopoietic stem cells. *Cryobiology*, v.17, n°. 516-520, 1980

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, v.102, n°: 3483-3492, 2003.

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

HUBEL, A., Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 11, n°. 224-233, 1997.

IACONO, E.; BRUNORI, L.; PIRRONE, A.; PAGIARO, P.P.; RICCI, F.; TAZZARI, P.L.; MERLO, B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, cord blood and Wharton's Jelly in the horse. *Reproduction*. v. 143, n°: 455-468, 2012.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E.M.; PERA, M.; MANUEL PILLAI, U. Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multi-Lineage Differentiation Potential. *Biology of Reproduction* v.7, n°: 577-88, 2007.

JANZ, F.L.; DEBES, A.A.; CAVAGLIERI, R.C.; DUARTE, S.A.; ROMÃO, C.M.; MOR, A.F.; ZUGAIB, M.; BYDLOWSKY, S.P. Evaluation of distinct freezing methods and cryoprotectants for human amniotic fluid stem cells cryopreservation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2012/649353, n°: 10, 2012.

KOGLER, G.; SENSKEN, S.; AIREY, J.A.; TRAPP, T.; MUSCHEN, M.; FELDHAHN, N. A new human somatic stem cells from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J. Exp. Med.* v. 200, n°: 123-55, 2004.

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

KIM, J.; LEE, Y.; HWANG, K.J.; KNOW, H.C.; KIM, S.K.; CHO, D.J.; KANG, S.G.; YOU, J. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristic of multipotent stem cells. *Cell Prolif.*, v.40, n°: 75-90, 2007.

KNIGHT, S. C.; FARRANT, J.; MCGANN, L. E., Storage of Human Lymphocytes by Freezing in Serum Alone. *Cryobiology*, v. 14, n°. 112-115, 1977.

LARGEAULT, Anne. Embriões, células-tronco e terapia celulares: questões filosóficas e antropológicas. *Estudos avançados*, v.18, n°.51, p: 227-245, 2004.

LEE, K.S.; NAH, J.J.; LEE, B.C.; LEE, H.T.; SO, B.J.; CHA, S.H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Res. In Veterinary Science*. v. 94, n°: 144-151, 2013.

LIU, G.; YE, X.; ZHU, Y.; LI, Y.; SUN, J.; CUI, L.; CAO, Y., Osteogenic differentiation of GFP-labeled human umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells after cryopreservation. *Cryobiology*, doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.05.005, 2011.

MAIA, L.; AMORIN, R.M.; LANDIN-ALVARENGA, F.C.; NETO, J.F.L.; ALVERENGA, M.A.; WODEWOTZKY, T.I. Considerações do uso de células-tronco mesenquimais em medicina equina. *Ver. mais equina.*, nº: 10-15, 2009.

MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; DE VITA, B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. . Avaliação do potencial osteogênico das células-tronco mesenquimais de medula óssea de equinos, isoladas com Fico-Paque de diferentes densidades. In: *Anais da 12ª Conferência Anual da Abraveq; 2011, Campinas. Campinas: Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos*, nº.198-9, 2011.

MAIA, L.; DE VITA, B.; MORAES, C.N.; DESTRO, F.C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Considerações sobre a obtenção, processamento, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco mesenquimais em medicina equina. *Vet. e Zootec.* v.20; nº3; p. 359-373. 2013.

MAIA, L.; MORAES, C.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; QUEIROZ, C.M.; MOTA, L.S.L.S.; SANTILONI, V.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Development of a cryopreservation protocol for equine mesenchymal stem cells obtained umbilical cord. *Journal of Equine Veterinary Science.* v. 34, nº: 235, 2014.

MAURO, A.; TURRIANI, M.; IOANNONI, A.; RUSSO, U.; MARTELLI, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINO CCHI, N.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research communication*, v.34, suppl. 1., p: 25-28, 2010.

MANUEL PILLAI, U.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C.V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and, amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis? *Placenta*, v. 32, nº: 320-325, 2011.

MIHU, C.M.; CIUCA, D.R.; SORITAU, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* v. 50, nº: 73-77, 2009.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN, E.M.B. Células tronco o que são e o que serão? Genética na escola. Revista online. Sociedade Brasileira de Genética, v.1, 2006.

MONTEIRO, B.S.; NETO, N.M.A.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. Ciênc. Rural, v. 40, n°: 238-245, 2010.

MCGUCKIN, C.; FORRAZ, N.; BARADEZ, M.O. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potencial for neural modeling. Acta Neurobiol. v. 66, n°: 625-34, 2006.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissue. Transplantation, v.6, n°: 230-247, 2007.

NARDI, N.B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. Genética na escola, v.2, n.2, art.5, p: 25-29, 2007.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v.284, n°.143–147, 1999.

POTAPOVA, I.A.; GAUDETTE, G.R.; BRINK, P.R.; ROBINSON, R.B.; ROSEN, M.R.; COHEN, I.S.; DORONIN, S.V. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation and survival of endothelial cells in vitro. Stem Cells, v. 25, n°: 1761-1768, 2007.

RAOUFI, N.H.; TAJIK, P.; DEHGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Bovine Umbilical Cord Blood. Reproduction in Domestic Animals, v.46, n°.95–99, 2011.

ROUBELAKIS, M.G.; TROHATOU, O.; ANAGNOU, N.P. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells. Stem Cells International. doi: 10.1155/107836, 2012.

RIBITSCH, I., BURK, J., DELLING, U., GEIBLER, C., GITTEL, C., JULKE, H., BRHEM, W.; Basic Science and Clinical Application of Stem Cells in Veterinary Medicine, SpringerLink, 2010.

SEO, J. M.; SOHN, M. Y.; SUH, J. S.; ATALA, A.; YOO, J. J.; SHON, Y., Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology*, v. 62, n°. 167-173, 2011.

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

SOLTER, D. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cells research. *Nature reviews genetic*, v.7, n°: 319-327, 2006.

SCHAEFER, V.W.; DICKE K.A. Preservation of haemopoietic stem cells, transplantation potential and CFU-c activity of frozen marrow tested in mice, monkey and man. In: *Cryopreservation of normal and neoplastic cells*, Eds., 1973.

TEVA, A.; FERNANDES, J.C.C.; SILVA, V.L. *Imunologia – Capítulo 1*. In: *Conceitos e Métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde*, v. 4, n°. 19-124, 2010.

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

WALSH, J.; ANDREWS, P. Expression of wnt notch pathway genes in a pluripotent human embryonal carcinoma cell line and embryonic stem cells. *Acta Pathologica, e microbiologia, et Immunologica Scandinavica*, v.111, n°1, p: 197-210, 2003.

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

YUAN, H.; ZHUANG, Y.; XIONG, J.; ZHI, W.; LIU, L.; WEI, Q.; HAN, P. Human umbilical mesenchymal stem cells-seeded bladder acellular matrix grafts for reconstruction of bladder defects in a canine model. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0080959, v. 8, n°11, 2013.

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

ZHANG, X.B.; LI, K.; YAU, K.H.; TSANG, K.S.; FOK, T.F.; LI, C.K. Trehalose ameliorates the criopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFUs long-term culture-initiating cells, and nonobese diabetic SCID repopulating cells. *Transfusion*. v. 43, n° 265-272, 2003.

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

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