

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS E
MESENQUIMAIS DE EQUINOS**

JOÃO FERREIRA DE LIMA NETO

**Botucatu - SP
Outubro de 2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO
DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS E
MESENQUIMAIS DE EQUINOS**

JOÃO FERREIRA DE LIMA NETO

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz
Landim e Alvarenga

Botucatu - SP
Outubro de 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *SULAMITA SELMA CLEMENTE COLNAGO*

Lima Neto, João Ferreira.

Isolamento, caracterização e diferenciação de células tronco
embrionárias e mesenquimais de equinos / João Ferreira Lima Neto. -
Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Assunto CAPES: 50503006

1. Células – Tronco. 2. Equino – Reprodução.

Palavras-chave: Células tronco; Células tronco mesenquimais; Células
tronco embrionária; Cultivo celular; Diferenciação celular; Linhagem
neurogênica.

Nome do Autor: João Ferreira de Lima Neto

Título: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS E MESENQUIMAIS DE EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Sony Dimas Bicudo

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Antonio Visintin

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Claudia Barbosa Fernandes

Membro

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP – São Paulo

Data da defesa: 8 de outubro de 2010

***Dedico este trabalho de tese aos meus pais,
os mais profundos agradecimentos por suas sábias
lições de esperança, amor e educação que infundiram-me
a confiança necessária para realizar os meus sonhos.***

AGRADECIMENTOS

*A minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**, por toda a dedicação, compreensão e amizade, pelos desafios cada vez mais complexos que nos foi colocando na realização deste trabalho e pelo estímulo e exigência crescente que nos foi impondo à medida que caminhávamos para a sua conclusão.*

*À minha **família**, pelo apoio e paciência, que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este doutorado.*

*Aos professores **Sony Dimas Bicudo, Maria Denise Lopes, Nereu Carlos Prestes, Cezinande Meira, Marco Antônio Alvarenga, João Carlos Pinheiro Ferreira, Eunice Oba e Frederico Ozanan Papa** pela cobertura, direta ou indireta, que me deram nessa longa travessia, assim como pela confiança e compreensão, por tudo, agradeço-lhes individualmente.*

*A **Prof^a. Dr^a. Sheila Canevese Rahal** meus agradecimentos pela disposição para discutir o projeto, bem como por seus questionamentos e contribuições.*

*A **Prof^a. Dr^a. Noeme Sousa Rocha** que me deu seu incentivo em momentos diversos e de forma incondicional, contribuindo para esta concretização.*

*Aos amigos **Gustavo, Carla e Paulo**, que com alegria, estão sempre presentes. Obrigado pela força e companheirismo.*

*Ao **Dr. ODUVALDO CÂMARA MARQUES PEREIRA JÚNIOR** pela amizade e pelo inestimável contributo prestado, nesta investigação, tendo sido fundamentais na nossa integração no campo de investigação.*

*Aos colegas e amigos do laboratório, **Crau (Claudinha), Mateus, Daniela, Camila, Tatiana, Thaila, Patrícia, Cely, Luis, Marina** e a todos os outros, muito obrigado pelo apoio e suas contribuições para a realização deste trabalho.*

*A todos os **Residentes de 2009**, por terem colaborados.*

*As amigas **Marjorie** e **Léia** do **Hemocentro** da Faculdade de Medicina da Unesp de Botucatu pelo processamento do material analisado por citometria de fluxo.*

Ao Departamento de Microbiologia e Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu pela concessão do uso do biotério.

A todos os funcionários da FMVZ, aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e aos funcionários da Biblioteca.

*À **CAPES**, pelo auxílio financeiro.*

*À **FAPESP** e **CNPq** pela concessão do auxílio pesquisa.*

A todas as pessoas que, apesar de não mencionadas, contribuíram.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Tabela 1 - Percentual de marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos mononuclear e cultivo primário.....	44
Tabela 2 - Percentual de marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos cultivo primário e cultivo secundário.....	44
Tabela 3 - Percentual comparativo entre os tratamentos pela marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos cultivo primário e cultivo secundário.....	45
Tabela 4 - Caracterização da Linhagem de células mesenquimais.....	45
Tabela 5 - Diferenciação da linhagem mesenquimal em linhagem neurogênica	47
Tabela 6 - % de células marcadas para confirmação da linhagem neurogênica	47

CAPITULO II: CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

Tabela 1 - Comparação (CTE Humano e Camundongo) de Especificidade dos Anticorpos.....	63
Tabela 2 - Caracterização das células tronco embrionária.....	66
Tabela 3 - Porcentagem de colônias que aderiram a placa de cultivo e exibiram crescimento, bem como de células exibindo a marcação.....	66
Tabela 4 - Anticorpos utilizados na marcação da diferenciação celular em linhagem neurogênica.....	69

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

- Figura 1 - Imagem da punção do esterno (A) e aspiração do sangue da medula óssea (B).....31
- Figura 2 - (A) Material aspirado da medula óssea depositado sobre a camada de Ficoll antes da centrifugação. (B) Após a centrifugação observou-se a separação das hemácias na porção inferior e do plasma na porção superior. A fração mononuclear foi localizada na região indicada pela seta.....32
- Figura 3 - Aspecto das células mesenquimais eqüinas em cultivo. (A) Logo após o plaqueamento. Note o aspecto arredondado das células. (B) Células aderidas com aspecto fibroblastoide após cinco dias de cultivo. (C) Tapete celular formado após quinze dias de cultivo.....34
- Figura 4 - Histograma de marcação para o CD44 e CD34.....35
- Figura 5 - Marcação do cultivo celular com anti-corpo anti-vimentina. Células coradas em marrom estão marcadas positivamente (200x).....36
- Figura 6 - Coloração com Hoescht 33342 e iodeto de propídio para análise da viabilidade celular, onde núcleos azuis correspondem a células viáveis e núcleos vermelhos a células mortas. (aumento de 200X).....37
- Figura 7 - Diferenciação em linhagem óssea (A) e controle (B).....46
- Figura 8 - Diferenciação em linhagem de adipócitos (A) e controle (B).....46
- Figura 9 - Diferenciação em linhagem condrogênica (A) e controle (B).....46
- Figura 10 - Marcação para GFAP (A) e controle marcado com DAPI (B).....48

Figura 11 - Marcação para BIII Tubulina (A) e controle marcado com DAPI (B).....	48
Figura 12 - Marcação para MAP2 (A) e controle marcado com DAPI (B).....	48
Figura 13 - Marcação para oligodendrócito (A) e controle marcado com DAPI (B).....	49

CAPITULO II: CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

Figura 1 - (A) Placa contendo fragmento de pele de equino. (B) Monocamada de fibroblastos em confluência (microscópio invertido com contraste de fase Ph 1, aumento de 200x).....	56
Figura 2 - Embrião eqüino com evidente botão embrionário (A), Separação da massa celular interna (B).....	60
Figura 3 - Crescimento da massa celular interna sobre camada de sustentação de fibroblasto equino bloqueada com mitomicina C (200x).....	61
Figura 4 - Colônia formada após repique (200x).....	62
Figura 5 - Marcação para o gene Oct4.....	67
Figura 6 - Marcação para o gene SSEA-1.....	67
Figura 7 - Marcação para o gene TRA-1-60.....	68
Figura 8 - Marcação para o gene TRA-1-81.....	68
Figura 9 - Marcação para o gene BIII-Tubulina.....	70
Figura 10 - Marcação para o gene GFAP.....	70

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Células tronco mesenquimais.....	8
2.2 Células tronco embrionárias.....	11
2.3 Marcadores de pluripotência.....	16
2.4 Diferenciação das células tronco mesenquimais.....	21
2.5 Diferenciação das células tronco embrionárias.....	25
3 OBJETIVOS.....	29
4 HIPÓTESES.....	29
5 CAPITULO I: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	30
5.1 Objetivos do capítulo 1.....	30
5.2 Material e métodos.....	30
5.2.1 Obtenção das amostras.....	30
5.2.2 Isolamento da fração mononuclear.....	31
5.2.3 Cultivo das células tronco mesenquimais.....	32
5.2.4 Caracterização celular.....	34
5.2.5 Análise da viabilidade celular.....	37
5.2.6 Diferenciação celular.....	38
5.2.7 Análise da Intensidade de Marcação.....	43

5.2.8 Metodologia estatística.....	43
5.3 Resultados.....	44
5.3.1 Caracterização celular.....	44
5.3.2 Diferenciação celular.....	45
5. 4 Discussão.....	49
5.5 – Conclusão.....	54
6. CAPITULO II: CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	55
6.1 Objetivos do capítulo 2.....	55
6.2 Material e métodos.....	55
6.2.1 Produção Das Células De Sustentação (Monocamada) Eqüinas.....	55
6.2.2 Manutenção do Cultivo.....	56
6.2.3 Preparo das Camadas De Sustentação.....	57
6.2.4 Obtenção Dos Embriões.....	58
6.2.5 Isolamento da Massa Celular Interna.....	59
6.2.6 Cultivo da Massa Celular Interna.....	60
6.2.7 Repique das Células-Tronco Embrionárias.....	61
6.2.8 Caracterização das Células Tronco Embrionárias.....	62
6.2.9 Diferenciação Celular.....	63
6.2.10 Análise da Intensidade de Marcação.....	65
6.2.11 Metodologia estatística.....	65
6.3 Resultados.....	65
6.3.1 Caracterização das células tronco embrionárias.....	65

6.3.2 Diferenciação das Células Tronco Embrionárias.....	69
6.4 Discussão.....	71
6.5 Conclusão.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

LIMA NETO, J. F. **Isolamento, caracterização e diferenciação de células tronco embrionárias e mesenquimais de equinos.** Botucatu – SP. 2010. 95p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A célula-tronco (CT) é definida como uma célula com capacidade de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tecidos. Além disso, a CT apresenta propriedades de auto-renovação, gerando cópias idênticas a si mesma. De acordo com sua origem, as células-tronco podem ser chamadas de "adultas" e "embrionárias". As células-tronco adultas (CTA) mais utilizadas nas clínicas de terapia celular são as células-tronco hematopoiéticas e as células tronco mesenquimais, encontradas principalmente na medula óssea, tecido adiposo e no sangue do cordão umbilical. As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto. Desta maneira este trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia adequada para o isolamento, cultivo e caracterização de células tronco embrionárias e mesenquimais de eqüinos, além de verificar a capacidade que as células possuem em se diferenciar *in vitro* em outros tipos celulares. Foi coletado sangue da medula óssea de eqüinos entre 8 e 15 anos de idade. As células tronco mesenquimais foram isoladas após a primeira e segunda passagem. As células foram caracterizadas com marcadores de superfície CD34 (mononucleares) e CD44 (mesenquimais). Após isolamento e caracterização, as células tronco mesenquimais foram diferenciadas para as linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica. A confirmação da diferenciação das células tronco foi realizada por marcadores teciduais específicos. Estas células também, foram capazes de expressarem marcadores neurais. Para o isolamento das células tronco embrionária eqüina, embriões com oito a nove dias foram coletado e a massa celular interna (MCI) isolada mecanicamente. Após o isolamento, a MCI foi transferida para a placa de cultivo previamente preparada com monocamada de fibroblastos para o desenvolvimento de colônias. As colônias foram caracterizadas com

marcadores de pluripotência e, após, submetidas ao processo de diferenciação para linhagem neurogênica. A confirmação da diferenciação foi realizada com marcadores específicos para linhagem neural.

Palavras chave: Células tronco; Células tronco mesenquimais; Células tronco embrionária; Diferenciação celular; Linhagem neurogênica; Cultivo celular.

LIMA NETO, J. F. **Isolation, characterization and differentiation of embryonic and mesenchymal stem cells in horses.** Botucatu – SP. 2010. 95p. Tesis (PhD in Veterinary Medicine) FMVZ, University of the State of São Paulo – UNESP.

ABSTRACT

The stem cell (SC) is defined as cells with the capacity of generate different cellular types and rebuild various tissues. Moreover, the SC has a self-regenerate ability, generating identical copies of itself. According to its origins, the SC can be named as “adult” or “embryonic”. The adult stem cell (ASC) more often used in clinical trials and cellular therapy, are the hematopoietic stem cells and the mesenchymal stem cells, isolated mainly from the marrow bone, adipose tissue and umbilical cord blood. The embryonic stem cells (ESC) are obtained from the inner cell mass of embryos at the blastocyst stage. In this way the present study had as objective to develop an adequate methodology of isolation, culture and characterization of embryonic and mesenchymal stem cells from horses, verifying the capacity of those cells to differentiate *in vitro* into different cells types. Bone marrow blood was collected from horses, aging from 8 to 15 years and filtered with a donation blood kit filter, to avoid clots. The mesenchymal stem cells were isolated after the first and the second passage. The SC were characterized using surface markers CD34 (monuclear) and CD44 (mesenchymal). After the isolation and characterization, the mesenchymal stem cells were differentiated into osteogenic, adipogenic, chondrogenic and neurogenic lineage. The cells differentiations were confirmed using specific tissue markers. To isolate the embryonic stem cells equine embryos with 8 to 9 days were used. The inner cell mass (ICM) were extracted mechanically and transferred to a culture dish previously prepared with fibroblasts monolayer to colony formation and development. The colonies were characterized with pluripotency markers and then submitted to a differentiation process into neurogenic lineage, confirmed by specific neural tissue markers.

Keywords: Stem cell; Mesenchymal stem cell; Embryonic stem cell; cellular differentiation; Neurogenic lineage, cellular culture

1- Introdução

A célula-tronco (CT) é definida como uma célula com capacidade de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tecidos. Além disso, a CT apresenta a propriedade de auto-renovação, ou seja, gerar uma cópia idêntica a si mesma. De acordo com sua origem, as células-tronco podem ser chamadas de "adultas" e "embrionárias". As células-tronco adultas (CTA) mais utilizadas nas clínicas de terapia celular são as células-tronco hematopoéticas e as células tronco mesenquimais, encontradas principalmente na medula óssea, tecido adiposo e no sangue do cordão umbilical. As células tronco hematopoiéticas são capazes de originar todos os tipos de células encontrados no sangue e tem sido utilizadas em transplante de medula por mais de 50 anos. Já as células tronco mesenquimais são consideradas multipotenciais, podendo se diferenciar em diversos tipos de tecidos com origem mesodermal, como fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, tenócitos, miofibroblastos e adipócitos..

As células-tronco embrionárias (CTE) são derivadas da massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto. As CTE apresentam grande plasticidade, possuindo, portanto, a capacidade de originar diferentes tipos teciduais. Esta propriedade das CTE deve-se ao fato do blastocisto ser capaz de originar todos os órgãos do corpo. Após a fecundação, o zigoto divide-se e diferencia-se até produzir um organismo adulto que consiste em mais de 200 tipos celulares. Assim podendo reconstituir qualquer tecido do organismo humano.

Devido a sua grande plasticidade, as CTE têm sido vistas como a melhor fonte de células reconstituidoras de qualquer tecido do corpo humano e têm sido usadas na reconstituição de vários tipos de tecidos em pacientes que sofreram algum tipo de injúria. Estudos experimentais têm sido realizados em modelos animais usando-se terapias com CTE para doenças neurológicas. A terapêutica com essas células vêm mostrando ser promissora, uma vez que pesquisas preliminares mostraram sucesso. O uso clínico das células-tronco embrionárias apresenta-se como a principal esperança da ciência no tratamento de diversas doenças neuromusculares degenerativas e de outras doenças sem cura até o presente momento.

A grande maioria dos estudos realizados estão direcionados para murinos e primatas, existe pouca informação sobre outras espécies, incluindo a eqüina. Desta forma, a necessidade de informações pormenorizadas sobre CTE equinas, se faz necessária, uma vez que o domínio da técnica de cultivo é a primeira etapa para tornar possível a manutenção das células indiferenciadas para a realização da pesquisa.

2 - Revisão de Literatura

Nos últimos anos, as pesquisas com células-tronco despertaram grande interesse nos meios de comunicação, levando a população a encarar esse novo conhecimento científico como sendo um método promissor para a cura de doenças até agora, tidas como incuráveis.

As CT podem originar-se de embriões, fetos e adultos. São células que em condições adequadas podem se reproduzir por longos períodos, e no caso das adultas, ao longo da vida de um organismo. Sua principal característica é se diferenciar em diferentes tecidos e órgãos do corpo a partir do estado indiferenciado. A classificação das CT é proposta de maneira diversificada por muitos autores no mundo todo, entretanto descrição clara e objetiva foi proposta por Mingroni-Netto & Dessen (2006), os quais propõem que as CT podem ser subdivididas a partir de dois critérios:

Quanto a sua origem, existindo 2 tipos: as células tronco embrionárias e as células tronco adultas (FRIEL et al, 2005), ou quanto a sua capacidade de diferenciação, mensurada em graus, e que corresponde à capacidade de gerar diferentes linhagens celulares, sendo:

- totipotentes: aquelas que, isoladas, são capazes de gerar todos os tecidos de um indivíduo, incluindo os tecidos placentários.
- pluripotentes: capazes de diferenciar-se em todos os tecidos do corpo humano, exceto nos tecidos placentários.
- multipotentes: também chamadas de células-tronco adultas, são portadoras de um potencial de diferenciação mais restrito, limitado a apenas alguns tipos celulares, são encontradas em estágios posteriores do desenvolvimento fetal e persistem após o nascimento.
- unipotentes: capazes de gerar só um tipo de célula, responsáveis pela regeneração de tecidos particulares, por exemplo; células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos, células do fundo das criptas de Liberkham no duodeno, espermatogônias no testículo etc.

Na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicação, se diferenciando naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo essa própria reserva de células indiferenciadas. Essas células tronco tecido específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. Ainda não se sabe se no adulto persistem células com capacidade de diferenciação ilimitada ou de formar múltiplos tecidos, ou seja, células tronco pluripotentes; se existem, devem ser muito raras e de difícil isolamento (ZAGO e COVAS, 2006).

As CT diferem de outras células do organismo por apresentarem três características: são indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes e são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular (ZAGO e COVAS, 2006; FRIEL *et al.*, 2005). Desta forma, as células tronco permanecem a maior parte do tempo na fase S do ciclo celular, sintetizando DNA; diferentemente das células somáticas diferenciadas elas não necessitam de estímulo externo para iniciar a replicação do DNA (FRIEL *et al.*, 2005).

Hoje em dia, estas células representam enorme potencial como fonte provedora, *in vitro*, dos mais variados tipos celulares para a realização de terapia celular, testes de novas drogas e estudo de sua toxicidade, bioengenharia genética e compreensão completa do processo de embriogênese. Em animais de produção (suínos, bovinos, caprinos, ovinos e eqüinos) O estabelecimento de linhagens de CTE possibilitaria, ainda, a criação de animais transgênicos a serem utilizados como modelo para o estudo de doenças humanas bem como em testes farmacológicos (MUÑOZ *et al.*, 2008).

A deficiência celular e a incapacidade de substituir células que não desempenham sua função perfeitamente são as causas primárias de muitas doenças que diminuem o tempo e a qualidade de vida dos seres humanos, como: diabetes, doenças neurodegenerativas, falhas cardíacas, desordens hematológicas, osteoartrite, falência renal, casos de cegueira entre outras. A possibilidade de produzir números significativos de um mesmo tipo celular é

fundamental para que se iniciem terapias de substituição ou reparação tecidual. Produzir novos tecidos a partir de células tronco do próprio paciente propicia uma ferramenta potente capaz de driblar ações do sistema imunológico auferindo-se maior sucesso nos tratamentos (PARK et al, 2008).

É essencial para o aprimoramento das terapias e tratamentos celulares que o processo de manutenção e caracterização do cultivo celular das células tronco, seja dominado e que se conheça o processo de diferenciação celular. Os modelos experimentais de CT em camundongos têm propiciado informações relevantes para transplantes de CT em outras espécies animais. No entanto, apesar de compartilharem similaridades quanto a morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CT possuem características únicas para cada espécie. Apesar de esforços estarem sendo realizados por diversos grupos de pesquisa, no sentido de isolar e manter CT de animais domésticos, linhagens validadas ainda não foram obtidas (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008). Como agravante, a propagação continuada de linhas de CTE inapropriadamente caracterizadas pode induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas.

2.1 - Células Tronco Mesenquimais

As células tronco adultas são células multipotentes encontradas no sistema hematopoiético, nervoso, locomotor, pele, trato gastrointestinal, sendo mais abundantes na medula óssea e sangue. Essas células existem em pouca quantidade no organismo sendo de difícil extração, purificação e identificação, possuem a capacidade limitada de se diferenciar, geralmente ficando restritas a geração de células do tecido em que estão presentes. Estas células não estão presentes em quantidades suficientes para transplantes e não podem ser cultivadas infinitamente sem sofrerem alterações (HEIDERSBACH et al, 2006).

Desde a década de 50, as células tronco da medula óssea são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético. Na década de 1960, pesquisadores descobriram que a medula óssea era composta por dois tipos de CT: as hematopoiéticas, sendo as responsáveis por originar e repor todos os tipos de células sangüíneas

(linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, hemácias e plaquetas) e as estromais ou células-tronco mesenquimais (CTM), uma população multipotente, progenitora de diversas linhagens celulares.

As CTM são precursoras multipotentes de tecidos conectivos tais como músculo, gordura, tendões, ligamentos, osso e cartilagem. Sua habilidade para auto-renovação e para diferenciação nos respectivos tecidos de interesse oferece um grande potencial para a medicina regenerativa em diversas espécies animais, incluindo a equina. CTM derivada da medula óssea são células de eleição para tratamento de injúrias de cartilagem e tendões em cavalos (TAYLOR et al., 2007). O isolamento de células tronco mesenquimais já foi relatado em diferentes tecidos como medula óssea (SMITH et al., 2005), tecido adiposo (VIDAL et al., 2007), cordão umbilical (KOCK et al., 2007) e sangue periférico (KOERNER et al., 2006).

As células tronco mesenquimais são isoladas do aspirado de medula óssea por um processo de centrifugação em gradiente de densidade, selecionadas e expandidas em garrafas de cultivo *in vitro* (TAYLOR et al., 2007). No aspirado obtido da medula óssea existem diversos tipos celulares, os quais podem ser grosseiramente classificados como: células mononucleares e multinucleares (já diferenciadas). Dentre as células mononucleares, também chamadas de células-tronco, existem as hematopoiéticas e as mesenquimais (GUARITA-SOUZA et al, 2005).

O isolamento e cultivo das CTM já é bem conhecido. A punção da medula óssea pode ser realizada do esterno, costelas, pélvis, crânio, úmero, fêmur e tíbia, pois nesses locais há constante função hematopoiética. Em eqüinos, o esterno é o sítio de escolha para a técnica, pois a atividade hematopoiética persiste na esternébra por toda a vida do animal. Essa região é coberta por massa muscular delgada, e a cavidade medular é coberta por uma fina camada de osso, facilitando o acesso. São recomendadas agulhas especiais para a coleta da medula óssea e dentre elas estão incluídas as agulhas modelo *Rosenthal*, *Illinois sternal*, *Jamshidi* e *Komiyashiki*. A aspiração é realizada com seringa descartável contendo heparina sódica. Como o material da seringa contém anticoagulante, sua observação sobre uma placa de Petri revela a presença de partículas ósseas, também chamadas de

espículas. A presença destas espículas confirma a origem medular da amostra obtida (KATHELEEN, 2000).

Para seleção das células mononucleares a amostra de medula óssea aspirada é centrifugada e o pellet formado utilizado para separar as células-tronco das células sangüíneas pré-formandas, as quais permanecem no sobrenadante. O sobrenadante é descartado e as células presentes no pellet são ressuspensas. O cultivo dessas células é então realizado em garrafas de cultivo celular e se baseia na habilidade das CTM de aderirem ao plástico do frasco e formar colônias. A capacidade de aderência da CTM é usada para separar essas células das células hematopoiética, as quais não aderem ao frasco. A purificação da amostra ocorre quando há troca de meio de cultura (TAYLOR et al, 2007), mas não se pode afirmar que todas as células aderidas sejam CTM.

O cultivo da fração mononuclear para o uso na terapia celular é bem conhecido e está sendo cada vez mais utilizado tanto em medicina humana como veterinária. No entanto, as células tronco mesenquimais aparecem em baixa quantidade no aspirado da medula óssea, e requerem um considerável tempo de isolamento (~20 dias) para sua expansão antes da implantação. Além disso as CTM se tornam mais difíceis de serem isoladas com o acréscimo na idade do doador, demonstrando ainda, uma redução na plasticidade e no crescimento *in vitro* (GUILLOT, 2007).

Até hoje, nenhum estudo realizado em eqüinos contém informações precisas sobre a caracterização dessas células antes do implante, ou sobre a sobrevivência e funcionalidade das células implantadas (FORTIER *et al*, 2007). Atualmente, nenhum fenótipo único foi identificado que permita o isolamento de precursores de CTM com um potencial previsível de desenvolvimento. O isolamento e caracterização destas células, ainda dependem primariamente de sua habilidade em aderir ao plástico e seu potencial de adesão.

O uso de marcadores de superfície tem sido um método aceito para a diferenciação de linhagens de células-tronco somáticas (FORTIER, 2005). CTM carregam proteínas de superfície que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto podem ser utilizados na caracterização dessas células. CTM de humanos e ratos expressam CD105, CD73, CD44, mas não expressam CD45 e CD31. Em adição a isso, é consenso que as CTM

cultivadas e expandidas *in vitro* são negativas para CD34. O CD34 tem sido muito utilizado como marcador para a linhagem hematopoiética (COPLAND *et al*, 2008). Infelizmente, a maioria desses marcadores ainda não foi validada como marcadores de superfície para eqüinos e há evidências que alguns anticorpos não possuem reação cruzada com o cavalo (TAYLOR *et al*, 2007).

Diversas pesquisas têm relatado o uso de células tronco mesenquimais para reparação de lesões ósseas (PITTENGER *et al.*, 1999; BOO *et al.*, 2002). Além disso, estas células também têm sido utilizadas para tratamento de injúrias de cartilagem e osso em coelhos, cães, e cabras com melhoras na qualidade do reparo (TAYLOR *et al.*, 2007). Estudos com animais de laboratório usando células tronco mesenquimais para tratamento de injúrias do tecido conectivo têm demonstrado uma regeneração de fibras colágenas, com retomada da função mecânica e aparência histológica (RICHARDSON *et al.*, 2008).

Os tratamentos utilizando células tronco adultas têm como objetivo melhorar a qualidade e função do tecido neoformado, minimizando o tempo de reparo e garantindo o retorno rápido às atividades normais (OLIVEIRA, *et al.*, 2010). Apesar disso, a real eficácia e segurança dos tratamentos desenvolvidos permanece desconhecida (KOCH *et al.*, 2007).

2.2 - Células Tronco Embrionárias

As células tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes, isto é, possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer um dos três tipos de tecidos embrionários germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme). Nos mamíferos essas células podem ser encontradas em zigotos, células embrionárias, nas células primordiais e em tumores originários de células embrionárias (BENJAMIM *et al*, 2000).

As CTE são derivadas da massa celular interna (MCI), ou do hipoblasto, sendo portanto, pluripotentes (BENJAMIM *et al*, 2000). O perfil genético das CTE apresenta dados controversos. Apesar de muitos genes terem sido identificados, poucos são consenso entre a comunidade científica. Publicações de diferentes grupos (HOFFMAN e CARPENTER, 2005 e ALLEGRUTTI e YOUNG, 2007) demonstraram que, em uma mesma espécie, linhagens

diferentes apresentam alto grau de heterogeneidade quanto a sua capacidade de diferenciação e expressão gênica, levando a diferentes respostas quando submetidas aos mesmos tratamentos. No entanto, de maneira geral as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio - específicos embrionários (DONOVAN e GEARHART, 2001). As CTE requerem adesão a uma matriz celular ou extracelular para sobrevivência e crescimento (NIETO *et al.*, 2007). Geralmente são cocultivadas com fibroblastos mitoticamente inativos, mas metabolicamente ativos, permitindo a síntese estável de receptores e citocinas necessários ao crescimento das CTE (ROY *et al.*, 2001). Para esse fim são utilizadas a inativação química por meio de Mitomicina C e a inativação por irradiação gama, sendo que ambas inibem a replicação do DNA (ROY *et al.*, 2001).

A mitomicina C é um agente quimioterápico que evita a separação da dupla fita de DNA durante a replicação celular por formar ligações covalentes entre as fitas opostas, enquanto a síntese de RNA e de proteínas continua. É capaz de bloquear o ciclo celular em G1, S e G2 enquanto as células permanecem viáveis (TOMASZ *et al.*, 1987). A irradiação gama quebra as fitas de DNA (MALINOWSKI *et al.*, 1992) impedindo assim a replicação celular.

A camada de fibroblastos inativos, também chamada de “feeder” contribui com vários fatores essenciais para a manutenção da auto renovação das CTE, entretanto a identidade bioquímicas desses é desconhecida. Acredita-se que seja um conjunto de fatores de crescimento, moléculas de superfície celular, matriz extracelular e neutralizantes de produtos tóxicos e metabólitos produzidos pelas CTE (PEDERSEN., 2002). Além disso, é conhecido que fibroblastos secretam promotores da manutenção do estado indiferenciado como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator transformador de crescimento β (TGF β), activinas, proteínas WNT e antagonistas da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) que promovem a manutenção do estado indiferenciado (WANG *et al.* (2005).

No cultivo de CTE humanas a monocamada de fibroblastos murinos pode ser substituída por células do parênquima da glândula mamária,

fibroblastos fetais, células endometriais uterinas, células musculares fetais e epiderme adulta de humanos (UNGER et al, 2008).

Pedersen (2002) relata também que alguns pesquisadores identificaram o LIF (leukemia inhibitory factor) como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários murinos. O efeito do LIF consiste em ativar o fator STAT 3 indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas (NIWA et al, 1998). A ativação de STAT 3 é essencial para a manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (MATSUDA *et al.*, 1999). Possivelmente os fatores de transcrição Oct- 4 e STAT 3 interagem afetando a função dos mesmos genes (NIWA et al, 2000).

O cultivo de CTE é caracterizado pela formação de agregados celulares denominados corpos embrióides, compostos pelos três tipos de camadas germinativas (SCHULDINER et al. 2000). Um amplo perfil da expressão gênica foi realizado em CTE murinas induzidas à diferenciação por meio da retirada do LIF a fim de identificar genes cuja alteração da expressão estivesse relacionada com a perda da pluripotência.

Estudos preliminares realizados por Keefer et al. (2007) demonstraram que células da MCI de blastocistos bovinos apresentam receptores para LIF. No entanto, a presença da LIF não auxiliou no estabelecimento e manutenção de CTE em outros ungulados. De fato, Vejlsted et al. (2005) demonstraram um efeito deletério da adição de LIF ao cultivo de CTE em bovinos. Da mesma maneira outros fatores de crescimento como que suprimem a diferenciação de CTE murinas como o bFGF, EGF e IGFs, não são capazes de inibir a diferenciação de CTE de suíno. Acredita-se que o bFGF atua na fosforização da tirosina de várias proteínas e ativação da sinalização extracelular das quinases ERK1/2.

Na tentativa de contornar desafios biológicos e éticos que envolvem o estudo das CTE, a literatura apresenta métodos capazes de aperfeiçoar o isolamento da MCI e condições de cultivo dessas células.

Para isolar a MCI, os métodos conhecidos são todos vertentes de três protocolos mais utilizados e com resultados já repetidos por diferentes grupos de pesquisa: Imunocirurgia, isolamento por separação mecânica e isolamento por microcirurgia.

A Imunocirurgia foi a primeira técnica utilizada no isolamento da MCI, permitindo isolar seletivamente a MCI do blastocisto. Descrita em 1975 por Solter e Knowles, ela consiste em incubar o embrião em uma solução com anticorpos anti-humanos (ou de acordo com a espécie do embrião). A penetração dos anticorpos no interior do embrião é bloqueada pela forte aderência e comunicação entre as células da camada externa da trofoderme. Após a retirada e lavagem dos anticorpos, o embrião é incubado em uma nova solução com complemento até que as células da trofoderme sejam destruídas e a MCI possa ser retirada e colocada em cultivo.

O isolamento por separação mecânica consiste no corte do embrião pela utilização lâminas e agulhas, separando o trofoblasto e fazendo o plaqueamento subsequente.

Ellerstrom et al (2006) publicaram outra variação da técnica, a partir do plaqueamento prévio do embrião intacto; após adesão e expansão das células do trofoblasto, a MCI foi separada mecanicamente, com aproveitamento de 26% do total de blastocistos humanos utilizados.

Cortez et al (2008) desenvolveram uma nova técnica visando à obtenção de células pluripotentes sem a utilização de qualquer produto com proteínas animais. Associaram a separação mecânica e a ação de *laser* para romper o embrião e retirar a MCI; após cultivarem o embrião intacto isolaram a MCI com auxílio da *laser* “Drilling” e obtiveram aproveitamento de 16% no estabelecimento de novas linhagens de CTE murinas.

Uma vez obtido o isolamento da MCI e cultivo de células CTE, diversos testes podem ser realizados para comprovar o potencial pluripotente das células. O ideal é que sejam realizadas provas concomitantes, uma vez que um resultado positivo em apenas um teste não garante que o material isolado apresente as características desejadas.

Uma das formas de confirmar a pluripotência celular das linhagens estabelecidas é a indução da formação de teratomas em camundongos imunodeprimidos. Este método consiste em inocular uma solução com alta concentração de CTE em camundongos imunocomprometidos e observar a formação de teratoma durante as 12 semanas seguintes.

O potencial pluripotente pode também ser avaliado *in vitro*. Ao cultivar as CTE em suspensão, elas devem formar agregados tridimensionais de células

diferenciadas denominados corpos embrióides, cujo cultivo por longos períodos resulta na formação de uma variedade de tecidos formados a partir das linhagens embrionárias como células hematopoiéticas, musculares, linhagens neuronais (SCHULDINER et al, 2000).

Outro uso possível da manipulação genética das CTE é a recriação de gametas de animais de alto valor. O cultivo de CTE também permite a criação de células deficientes *in vitro*, mimetizando o ambiente encontrado no organismo de um animal doente, situação esta que não só beneficia o estudo e desenvolvimento de novos fármacos, como permite compreender melhor a evolução de certas afecção.

Além da aplicação clínica e pesquisa, as CTE podem elucidar um número grande de processos fisiológicos relacionados aos grandes animais, utilizando o cavalo como modelo. Até o momento o isolamento e caracterização parcial de seis linhagens de CTE eqüinas foi descrita (QUEST e ALLEN, 2007). Saito, et al 2002 descreveu a dissecação da MCI de blastocistos com 6 a 7 dias e cultivo em meio de cultivo DMEN com soro fetal bovino (SFB). As células tronco obtidas foram cultivadas em placa contendo uma camada de “feeder” de bovino (camada de fibroblastos), sem a presença de LIF, e foi possível a manutenção *in vitro* da cultura estabilizada por mais que 56 passagens. Estas células foram marcadas para os seguintes genes indicativos de indiferenciação: Oct4, POU5F1, STAT3, SSEA1 e também para fosfatase alcalina (AP). Estas células também puderam ser induzidas a diferenciação em precursoras neurais.

Em contraste com Saito et al (2002), LI et al. (2006) produziu quatro linhagens de células tronco embrionária eqüina utilizando blastocistos de 8 dias, onde a massa celular interna foi cultivada em DMEN/F12 contendo SFB. As células tronco embrionária isoladas foram co-cultivadas em “feeder” de camundongos em presença de LIF, e foram realizadas mais de 26 passagens. As linhagens foram marcadas para OCT4, STAT3, FOSFATASE ALCALINA, SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81. Quando removido o meio que continha a LIF e a “feeder”, as células se diferenciaram para os tecidos neural (ectoderme), visceral (endoderme) e cardíaco e hematopoiético (mesoderme).

Apesar destes estudos o entendimento do processo de controle da pluripotência em células eqüinas é rudimentar e baseado no que são descritos

para camundongos ou humanos. Marcadores confiáveis ou testes de comportamento das células para estados de pluripotência são ambos claramente requeridos para caracterizar as linhagens de células tronco equinas e para avançar o entendimento de como manipular a diferenciação destas células (PARIS e STOUT, 2010).

2.3 - Marcadores de Pluripotência

A expressão dos marcadores de pluripotência pode ser determinada por análise do RNA por meio da transcriptase reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) ou pela detecção protéica por imunohistoquímica. Em bovinos, a imunohistoquímica é muito utilizada (VELJSTED et al., 2006; MUÑOZ et al., 2008), havendo escasso uso de expressão gênica por RT-PCR (SAITO et al., 2003), sendo inexistente, na literatura, uma comparação entre a expressão de RNA mensageiro codificador da proteína e a presença dessa proteína, relacionados à pluripotência.

As células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários, no entanto esses marcadores não são específicos (DONAVAM et al. 2001). Apesar da importância de muitos desses fatores ainda não ser totalmente compreendida a importância da expressão do fator e transcrição Oct-4 é comprovada (DONAVAM et al., 2001). A expressão do Oct-4 permite que as células permaneçam no estágio indiferenciado, podendo se multiplicar infinitamente sem que ocorra a diferenciação. No entanto, uma vez que ocorra a baixa expressão do Oct-4 nas células, estas perdem sua pluripotência e começam a se diferenciar. O Oct-4 é encontrado em blastômeros, células embrionárias pluripotentes e linhagens germinativas que pode ativar ou reprimir sítios de transcrição gênica (SHOELER, 1991) regulando a transcrição de vários genes devido sua interação com outros dois fatores de transcrição gênica, o E1A like activity (SHOELER, 1991), e a proteína Sox2 HMG-box (YUAN et al, 1996).

Em embriões de ratos está bem determinado que a pluripotência é mantida primariamente pelos seguintes genes: Oct-4, Sox-2 e Nanog (Cowan et al, 2004). Esses genes são ativados por fatores de transcrição próprios que também se ligam á genes responsáveis em codificar componentes que irão inibir vias essenciais para que o desenvolvimento. A expressão de Oct-4 é considerada um marco fundamental para a identificação de células pluripotentes do rato. O Oct-4 é expresso em células pluripotentes durante as clivagens, na massa celular interna, no epiblasto no início da fase pós-implantação do embrião, e em células-tronco embrionárias em cultivo (SCHOLER, 2001).

Apesar de o gene Oct-4 ser necessário para a manutenção da pluripotência de CTE ele sozinho não é excludente de diferenciação. Blastocistos humanos em diferentes estágios de desenvolvimento apresentam variados níveis de expressão do Oct-4, também encontrado em células já diferenciadas, como as do trofoblasto (CAUFFMAN et al, 2005).

O gene Nanog também tem se mostrado muito importante, pois a ausência de sua transcrição induz a diferenciação celular para linhagens de endoderme extra-embrionária, enquanto uma expressão 50 a 60% menor induz a geração de vários tipos de tecidos, ativando genes da endoderme, mesoderme e ectoderme (HATANO *et al.*, 2005).

O Nanog é um gene que contém homeobox para manutenção da pluripotência, não está diretamente relacionado com o Oct-4 e previne as células de se diferenciarem em endoderme extra-embrionárias (CHAMBERS et al, 2003). Sua hiper-expressão permite o crescimento em sistemas livres do co-cultivo e melhora a eficiência na produção de células clones (DARR et al. 2006). Tanto em humanos como em camundongos sua supressão induz a diferenciação para tecidos extra-embrionários (HYSLOP ET AL, 2005).

Os marcadores de superfície celular e moleculares também são importantes para definir o estado de diferenciação de uma linha celular. As CTE de camundongos e suínos alem de expressarem os fatores de transcrição Oct-4 e Nanog, expressam também o antígeno embrionário estágio específico 1 (SSEA1) e atividade de fosfatase alcalina (WOBUS *et al.*, 2005; BREVINI *et al.*, 2007).

Por meio da imunohistoquímica, a expressão do Oct4 foi estudada em blastocistos produzidos *in vitro* e *in vivo* nas espécies murina, suína e bovina. Em camundongos, a expressão do Oct4 foi restrita à MCI, enquanto em suínos (7 dias após a fertilização) e bovinos (8 dias após a fertilização) sua expressão foi observada tanto na MCI quanto no trofotoderma, não havendo diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (KIRCHHOF et al., 2000). Esses dados corroboram com os encontrados por He et al. (2006), segundo os quais houve expressão da proteína Oct4 na MCI e trofotoderma de blastocistos caprinos produzidos *in vivo*. Concluiu-se, portanto, que existe marcada diferença na regulação do Oct4 entre camundongos e animais domésticos (KIRCHHOF et al., 2000; HE et al., 2006).

Por outro lado, Veljsted et al. (2006) relataram a expressão de Oct4 exclusivamente no epiblasto de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* no dia 12 pós-inseminação e em embriões produzidos *in vivo* 14 dias pós-inseminação. É esperado que as células do epiblasto bovino mantenham-se pluripotentes até o início da gastrulação, por volta de 14 dias após a inseminação, entretanto a vimentina, filamento intermediário freqüentemente usado como marcador de mesoderme, apresentou expressão semelhante a Oct4, indicando que a diferenciação dentro do epiblasto tem início no dia 12. Portanto, no bovino, a perda inicial da pluripotência parece não estar sincronizada com diminuição da transcrição de Oct4.

O Sox-2 é um gene que é essencial para a manutenção de auto-renovação das células do embrião indiferenciado e de células estaminais. Este gene codifica um membro da família de fatores de transcrição envolvidos na regulação do desenvolvimento embrionário e na determinação do destino da célula. A proteína transcricional codificada pode atuar como um ativador após formar um complexo protéico com outras proteínas. O Sox-2 é um dos principais fatores de transcrição exigido em células tronco com pluripotência induzida. Aparentemente o principal papel da Sox-2 em células tronco pluripotentes é controlar a expressão de Oct-4, sendo que estes genes perpetuam a sua própria expressão, quando expressos simultaneamente. (MASUI et al., 2007).

O Stat 3 foi detectado em células tronco indiferenciadas, entretanto sua expressão foi 49% mais baixa durante as primeiras 18 horas após a remoção

do LIF. O mesmo aconteceu com a expressão do Akp2, gene codificador para fosfatase alcalina; com a transcrição dos gene codificadores das proteínas morfogenética do osso 4 (Bmp4) e específica do cérebro e gastrulação homeobox 2 (GBX2), as quais apresentaram significativa redução entre 18 e 72 horas. Nesse intervalo, também foram observados 90% de diminuição na expressão de Rex1/Zfp42 (zinc finger protein 42) e 60% na de Sox-2. Entretanto, o fator de transcrição Pou5f1 codificador do Oct4, muito utilizado como marcador de pluripotência, foi altamente expresso em células tronco indiferenciadas e não apresentou significativa alteração durante as primeiras 72 horas após a remoção do LIF (PALMQVIST et al., 2005).

Apesar de compartilharem similaridades quanto a morfologia e alguns marcadores de superfície celular e de expressão gênica, as CTE possuem características únicas em cada espécie. As CTE murinas apresentam colônias espessas com células sobrepostas e com bordas não definidas, enquanto as CTE humanas e equinas formam colônias de espessura fina e com bordas bem definidas (LI et al, 2006). A morfologia das células, assim como sua capacidade de formar corpos embrióides quando em cultivo têm sido utilizadas como critério para definir linhagens de CTE. Em bovinos, as CTE devem apresentar tamanho pequeno, aspecto arredondado e alta proporção núcleo:citoplasma (MUÑOZ et al., 2008). Esta classificação é particularmente importante, pois com frequência ocorre a contaminação do cultivo por células do trofo-ectoderma, bem como por células do endoderma visceral (hipoblasto). Sendo assim, a caracterização de linhagens de CTE de ungulados deve ser acompanhada pela expressão de marcadores específicos para os tipos celulares contaminantes do cultivo, ou seja, transferrina ou α -fetoproteína, para detecção de células da endoderme e interferon-tau para detecção de células do trofo-ectoderma de bovinos ou citoqueratina para detecção de células da ectoderme incluindo o trofoblasto (KEEFER et al., 2007.) A propagação continuada de linhas de CTE inapropriadamente caracterizadas podem induzir os pesquisadores ao erro e, dessa forma prejudicar a descoberta de condições de cultivo mais adequadas ao cultivo de verdadeiras CTE (KEEFER et al., 2007).

Possivelmente as condições de cultivo consideradas adequadas para a manutenção de células tronco de camundongos são diferentes das necessárias

para outras espécies de animais. É conhecido que alguns fatores necessários para a manutenção da pluripotência de CTE murinas são não só dispensáveis, mas até deletérios para o cultivo de CTE humanas. Por exemplo, a estimulação do fator STAT-3 pela LIF em CTE humanas parece não induzir a proliferação durante o cultivo, como ocorre em camundongos (MUÑOZ et al., 2008). A taxa de crescimento dessas células também difere entre as espécies: apesar de não haver dados na espécie equina, o tempo para que ocorra a duplicação no número de células em cultivo na espécie murina é de 12-15 horas e na espécie humana chega a 60-70 horas (COWAN et al, 2004).

Por causa do início da embriogênese diferir significativamente no camundongo, porco, vaca e humano (KEEFER et al., 2007), é razoável antecipar diferentes expressões para genes de pluripotência no cavalo (PARIS et al., 2008; PARIS e STOUT, 2010).

As CTE da espécie equina apresentam marcadores em sua superfície da célula como SSEA-1, além de serem caracterizadas por expressar o fator de transcrição STAT-3 e o Oct-4 (SAITO et al, 2002). Esse padrão de expressão difere do encontrado em camundongos e humanos, que, por sua vez também diferem entre si. Foi descrito que a proteína OCT4 foi expressa no citoplasma e núcleos de oócitos imaturos e que o nível de expressão diminuiu gradualmente durante os primeiros 4 dias do processo de cultivo *in vitro* de embriões produzidos por injeção intracitoplasmática de espermatozóides. Posteriormente observou-se um aumento novamente da expressão desta proteína no núcleo celular durante os dias 6 a 7, provavelmente como um resultado na ativação do genoma embrionário. No entanto a proteína foi encontrada em ambos a massa celular interna e no trofoderma em blastocistos com 7 a 10 dias (HINRICHS, 2008).

Um outro estudo sugere que a expressão do OCT4 mRNA diminui sucessivamente durante a mórula para o blastocisto inicial e a transição para blastocisto expandido. Neste caso foi reportado também uma baixa regulação do NANOG mRNA, mas somente no início da transição para blastocisto expandido (PARIS et al., 2008). Similar a situação do OCT4, proteínas de pluripotência associadas a marcadores de superfície celular SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81 foram encontradas tanto na MCI como no

trofoderma do blastocisto de 7 dias, levantando questionamentos quanto a sua adequação como marcador de pluripotência (GUEST e ALLEN, 2007).

Como os marcadores convencionais de pluripotência têm se demonstrado inespecíficos em ungulados (KEEFER et al., 2007; MUÑOZ et al., 2008), é importante a utilização de outros métodos que confirmem a origem embrionária das células em cultivo.

A pluripotência das CTE pode ser avaliada pela administração intraperitoneal ou subcutânea dessas células indiferenciadas em camundongos imunossuprimidos (SCID mice) gerando teratomas (CIBELLI *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2003). Teratomas foram pouco observados em suínos (BREVINI *et al.*, 2007). A formação de corpos embrióides, agregados de células tronco compostos pelos três tipos de camadas germinativas também é um indicador da pluripotência (SCHULDINER *et al.*, 2000).

Alem disso, pode ser induzida a diferenciação *in vitro* destas células visando a comprovação de suas características pluripotentes.

2.4 - Diferenciação das células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais também chamadas de células estromal da medula óssea são células de origem mesodérmica. As células tronco mesenquimais podem diferenciar em derivados mesenquimais, incluindo osteócitos, condrócitos, adipócitos (KRABBE et al, 2005).

Estudos *in vitro* envolvendo crescimento e diferenciação de células fetais e adultas têm se destacado na literatura, contribuindo, desta forma, com o conhecimento de mecanismos e fatores relacionados à auto-renovação e diferenciação destas células para seu emprego em terapias gênicas e celulares (MIMEAULT e BATRA., 2006). Avanços nesse sentido têm sido obtidos, podendo-se destacar novos tratamentos para o câncer e procedimentos para restauração de tecidos lesionados.

Estudos experimentais e pré-clínicos de terapia celular tem utilizado principalmente CTM obtidas de medula óssea e outras fontes alternativas, como cordão umbilical, tecido adiposo e poupa de dente. Embora os estudos clínicos sejam mais raros, os protocolos clínicos com utilização de CT obtidas de medula óssea para tratar algumas doenças cardíacas têm apresentado

resultados positivos (PERIN, 2004). Entretanto, as potenciais aplicações da terapia celular em doenças neurológicas ainda são relativamente pouco estudadas.

A plasticidade das células tronco adulta em se diferenciar em outras linhagens celulares de tecidos diferentes do qual estas residem, originando células de outras camadas germinativas, envolve a reprogramação genética com o desligamento de determinados genes e a ativação de outros genes (KRABBE, 2005). Neste sentido a diferenciação de CTM em tecido neural tem despertado um grande interesse na terapia de doenças neuro-degenerativas.

Woodbury et al. (2002) produziu uma população de MSCs expressando genes para tecidos do ectoderma, mesoderma e endoderma, conseguindo produzir condrocitos, adipocitos, tecido osteoblastico, cardiomiócitos, e células endoteliais vasculares (mesoderma), células neurais e pele (ectoderma) e hepatocitos, células pulmonares, e células do intestino (endoderma). As CTM se diferenciaram para tecido nervoso por meio da utilização de uma combinação de β -mercaptoethanol(BME), dimethylsulfoxide (DMSO) e butylated hydroxyanisole (BHA) (Woodbury et al., 2002).

Usando análises por citometria de fluxo, Western blots e RT-PCR, Tondreau et al., (2004) reportou que mais de 80% da cultura de CTM expressava proteínas nativas neurais imaturas, tal como Nestin (proteína filamento intermediário células nervosas) e β -tubulina III (proteína de microtubulo específico de neurônios), MAP-2(Proteína 2 microtubulo) e GFAP (proteína ácida glial fibrilar).

Sanchez-Ramos et al (2000) reportou que as CTM de camundongo e humanos podem ser induzidas a expressão de marcadores neurais para proteína nuclear neurônio-específico (NeuN), nestin, e GFAP com a cultura na presença de Fator de Crescimento Epidermal (EGF), ácido retinóico (RA) ou RA associado ao fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF).

Ankeny et al. (2004) cultivou CTM de ratos adultos por 2 semanas e transplantou em animais com lesões na coluna espinhal. As CTM transplantadas apresentavam baixa expressão de nestin e laminina, enquanto estas expressavam fibronectina e vimentina. Estas culturas não expressavam proteínas nuclear neurais Neu-N ou GFAP. Depois de 8 semanas foi realizada testes de imunohistoquímica e ambas marcações para GFAP e BrDU para

astrócitos foram negativos. As CTM se integraram com o parênquima do cordão espinhal, demonstrando que as células foram capazes de migrar curtas distâncias no tecido do hospedeiro. No entanto, não foi demonstrada evidências de diferenciação das células em neurônios.

Tondreau, et al. (2005), realizou a indução neurogênica de linhagens de células mesenquimais por um período de 10 dias com a adição de meio basal para células progenitoras neurais, suplementado com 5 μ M isobutylmethylxantine, 2,5 μ g/ml insulina, 5 μ M cAMP e 25ng/ml de fator crescimento de nervo. A confirmação da diferenciação foi realizada pela marcação das células por imunofluorescência, para os marcadores Nestin, Tuj-1, GFAP e MAP-2, e por RT-PCR.

Fu et al. (2008), descrevem a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em células-tronco neurais, capazes de formar neuroesferas. Expressando marcadores destas células (nestina e musashi-1), na presença de astrócitos e oligodendrócitos, estas células diferenciaram em neurônios. Os autores mostram ainda que apenas 8% das células-tronco mesenquimais foram capazes de originar células-tronco neurais. Embora a transdiferenciação seja possível, a frequência é baixa, o que sugere que, dependendo do tecido a ser tratado, as células deverão passar por processos de seleção específicos antes de serem injetadas, garantindo assim a eficácia do tratamento.

Estudos com CT provenientes de medula óssea verificaram atenuação de perdas funcionais em modelos experimentais de isquemia cerebral. Uma das hipóteses atualmente levantadas sugere que as células transplantadas induzem uma liberação de fatores tróficos e/ou fatores moduladores de fenômenos inflamatórios na região lesada, os quais podem compor um microambiente favorável para a regeneração do tecido lesado (CHOPP e LI, 2002). Nesse sentido, as CT podem ser empregadas não apenas visando à reposição de células danificadas, mas também às reposições biofarmacológicas.

Em modelos de estudo de isquemia cerebral foi observado que a injúria cerebral estimula a migração de células tronco de cordão umbilical humano para o local da lesão e que a recuperação é dose-dependente – quanto maior a concentração de células tronco melhor a recuperação. Sanberg, et al. (2005)

comparou o uso de células tronco de medula óssea com as células tronco de cordão umbilical humano, verificando que as células de cordão possuem maior capacidade proliferativa e maior quantidade de células CD34+ (mononucleares), necessitando de uma menor quantidade de células para produção do efeito desejado após o transplante feito, apesar deste ocorrer de forma mais lenta. O uso de células tronco CD34+, quarenta e oito horas após o AVC, levou ao aumento da vascularização cerebral local. Apesar da administração das células de cordão 24 horas após o AVC ter sido eficaz, o tempo ótimo para sua utilização após o acidente não foi estabelecido. Foi demonstrado o aumento da atividade migratória das células de cordão umbilical em direção aos extratos obtidos em 24 a 72 horas após o acidente vascular cerebral. Os extratos possuem níveis aumentados de certas citocinas e quimiocinas, sugerindo sua participação na migração das células levando a investigações sobre os mecanismos responsáveis pela migração das células do cordão *in vivo*, após a indução da lesão.

A administração intravenosa de células tronco do cordão umbilical após a oclusão da artéria média cerebral produz recuperação anatômica e comportamental e protege o tecido neural de mudança progressiva. Usando uma combinação de estudos *in vitro* e *in vivo*, foi mostrado que as células tronco de cordão umbilical diminuem a reação inflamatória no cérebro após o AVC, aumentando, portanto, a neuroproteção. Após o AVC e o transplante de células tronco, há uma diminuição de células CD45/CD11b e CD45/B220 positivas. Esse decréscimo é acompanhado por uma diminuição no RNAm e na expressão de proteínas pró-inflamatórias. Há ainda, um decréscimo na atividade de ligação ao DNA do fator nuclear B (NF-B) no cérebro dos animais com AVC tratados com células tronco. Além da modulação da resposta inflamatória, o grupo demonstrou que as células do cordão umbilical aumentam a sobrevivência neuronal por meio de mecanismos não-imunes (VENDRAME, 2005).

As pesquisas em Doença de Parkinson feitas com CT transplantadas no sítio da lesão usaram uma série de diferentes marcadores para rastrear as células transplantadas. Alguns desses trabalhos mostraram a migração específica de células não diferenciadas para o sítio específico das lesões. Os mecanismos pelos quais as CT são capazes de migrar para o sítio da lesão

parecem indicar a presença de moléculas (citoquinas) capazes de atuar como agentes de atração para essas células. A habilidade de tais fatores em direcionar a migração das células-tronco tem sido observada em experimentos *in vitro* (PARK, 2009).

Dentre os diferentes fatores liberados no sítio da lesão pelo processo inflamatório, o Fator Derivado das Células Estromais (SDF) cujo ligante CXCR4 foi demonstrado em grande parte das células-tronco, foi descrito como facilitador da migração das CT transplantadas em diferentes modelos de lesões neuronais, incluindo lesões na medula espinhal, AVC e outras desordens isquêmicas. Além dele, em estudos prévios os autores demonstraram que a infusão de CT do sangue de cordão umbilical em animais com AVC induzido, levava a migração dessas células para o sítio da lesão devido altas concentrações de citocinas tais como Proteína atrativa de monócitos- 1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 α). A presença das células no sítio da lesão ajudaria na diminuição do processo inflamatório, responsável pelo aumento do dano tecidual (PARK, 2009). A modificação do ambiente hostil causado pelo processo inflamatório seria uma ação indireta das CT, confirmada por estudos em Doença de Parkinson e AVC experimental. Existem numerosos estudos *in vitro* e em roedores que apontam para essa ação como o mais importante das CT. Estudos com as células-tronco do sangue de cordão umbilical demonstram a liberação de fatores com características imunomodulatórias. Segundo os autores, a migração celular para o local da lesão pode ser suficiente para diminuir e resolver a lesão e uma diferenciação celular não seria necessária (PARK, 2009).

2.5 - Diferenciação das células tronco embrionárias

No sistema nervoso central (SNC), as células tronco neurais (CTN) e os neuroprogenitores estão envolvidos na geração de neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, desempenhando um importante papel na maturação desse sistema nas fases fetal e pós-natal e na manutenção da sua integridade fisiológica na fase adulta. Assim como na fase embrionária, o cérebro na fase adulta também apresenta CTN e neuroprogenitores. Acredita-se que esses

neuroprogenitores desempenhem função relevante na homeostase do SNC. No hipocampo, CTN e neuroprogenitores podem ser isolados e mantidos *in vitro* por meio de cultivo primário. Sob condições específicas, diferentes células especializadas do SNC podem ser originadas a partir desses neuroprogenitores, incluindo neurônios piramidais (SUZUKI, 2008).

Em Neurologia, mais especificamente, a aplicação de CTN e de neuroprogenitores tem sido estudada com vistas ao tratamento de doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, câncer e traumas (DICTUS et al., 2007).

O potencial pluripotente das células tronco mesenquimais e embrionárias pode ser avaliado *in vitro* por meio da indução da diferenciação celular. Um método simples de se verificar a diferenciação espontânea é o cultivo por um período superior a sete dias sem que as células sejam replicadas (HEINS et al. 2004). No entanto, a melhor maneira de caracterizar a pluripotências de CTE é a indução de sua diferenciação para linhagens celulares com origem ectodermal, mesodermal e endodermal. Estratégias diferentes têm sido utilizadas para indução da diferenciação *in vitro* das CTE. As CTE se diferenciam espontaneamente em células derivadas das 3 camadas embrionárias por meio da formação de corpos embrióides. Ao cultivar as CTE em suspensão, ou através da retirada dos fatores de indução do estado indiferenciado do cultivo, as CTE devem formar agregados tridimensionais de células diferenciadas denominados corpos embrióides (SCHULDINER et al., 2000). A criação dos corpos embrióides é geralmente o primeiro passo para a obtenção de CTE diferenciadas. A maior parte dos métodos para diferenciação das CTE utiliza o plaqueamento dos corpos embrióides em placas cobertas de gelatina e sem a presença de monocamada de suporte e a suplementação com fatores de crescimento e/ou fatores indutores de diferenciação.

A habilidade das CTE para se diferenciarem em particular em uma linhagem neural definida, tal como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, é fundamental para o desenvolvimento de terapias para distúrbios neurodegenerativos e estudos dos mecanismos do desenvolvimento. Hong, et al. (2008) descreveram que as células precursoras neurais derivadas de CTE de camundongos mantinham o potencial para diferenciar em neurônios dopaminérgicos depois de uma expansão significativa *in vitro*. Durante uma

expansão de 12 semanas elas mantinham o potencial para gerar Tuj1 (classe β -III tubulina – neurônio específico), GFAP (astrócitos) e O4 (oligodendrócitos), bem como Tirosina hidroxilase-positiva (TH) neurônios dopaminérgicos.

Hong, et al. (2008) cultivou linhagem de CTE humanas em co-cultivo com fibroblastos de camundongos inativados (MEFs) contendo meio DMEM/F12 com 20% soro Knockout, e 4 ng/ml fator de crescimento de fibroblasto. Para manutenção das CTE indiferenciadas foi utilizada o mesmo meio de cultivo, e foi realizada uma passagem por semana das culturas por dissecação mecânica e tratamento enzimático e pequenos pedaços eram transferidos para uma nova camada MEF. As CTE humanas foram induzidas a diferenciação neural por co-cultura em células estromal MS5, por 7 dias, e após foram cultivados em uma nova placa de cultivo por mais 14 dias. No final do cultivo fragmentos das colônias foram transferidas para uma placa de cultivo tratada com poly-L-ornithine/fibronectina contendo meio N₂ suplementado com bFGF (fator crescimento fibroblastos básico), EGF (fator crescimento epidermal) e Aminoácidos (AA). Após congelação e descongelação a diferenciação neuronal foi induzida por meio da retirada bFGF e EGF do meio por 14 dias ou mais. As células foram então fixadas em 4% paraformaldeído e marcadas para Nestin, β III-tubulina, GFAP e O4, confirmando a diferenciação para tecido neural.

Abranches, et al. (2009), demonstraram células progenitoras neurais derivadas de CTE se organizam em estruturas semelhantes a rosetas e proteínas similares a descrita em células neuroepiteliais no tubo neural embrionário foram produzidas. Um controle seqüencial intrínseco na geração de células da glia e neurônios pôde ser preservados nas progenitoras neurais derivadas de CTE. Desta forma, os resultados demonstraram que a geração *in vitro* de células neurais de CTE usando monocamada imita o processo de desenvolvimento neural.

A manipulação das CTE para se diferenciarem em populações de células progenitoras neurais, neurônios motores e glia, com expressão de genes, ambos *in vitro* ou *in vivo* demonstra um potencial que as células tronco pluripotentes possuem para o tratamento de doenças neuro-degenerativas. No entanto, o progresso das terapias requer avaliação da contribuição de sinais

endógenos para diferenciação destas células *in vivo* ou *in vitro*, e a relativa eficiência da formação de neurônios derivados de CTE.

3 – Objetivos

O objetivo geral deste experimento foi validar uma metodologia adequada para o isolamento, cultivo e caracterização de CTE e mesenquimais de equinos.

4 – Hipóteses

1- As células tronco mesenquimais de equinos apresentam ampla capacidade para diferenciar *in vitro* nas linhagens ósteogênica, condrogênica, adipogênica, mas não na linhagem neurogênica.

2- As células tronco embrionárias de equinos apresentam comportamento semelhante as células tronco embrionárias de outras espécies de ungulados, incluindo a capacidade de diferenciação *in vitro* para células da linhagem neurogênica.

5. CAPÍTULO I: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

5.1. - Objetivos do Capítulo 1

- Isolar e cultivar as células tronco mesenquimais eqüinas e estabelecer protocolo padrão
- Caracterizar as células tronco mesenquimais eqüina com o auxílio de marcadores de superfície (CD)
- Diferenciar as células tronco mesenquimais eqüina em linhagem celular ósteogênica, condrogênica, adipogênica e neurogênica

5.2 - Material e Métodos

5.2.1. – Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de 11 animais, entre 8 e 15 anos de idade. O protocolo de punção da medula óssea consistiu na sedação dos animais com Xilazina 10% na dose de 0,5 mg/kg pela via intravenosa, seguida, da realização de tricotomia de 5 x 20 cm na área do osso esterno de cada equino, permitindo a execução do exame ultrasonográfico. Após a identificação da 5ª esternebra por meio da ultrasonografia, o bloqueio anestésico foi realizado com a aplicação de 15mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor no tecido subcutâneo, seguida da antisepsia do local com clorexidine tópico 0,5%. A punção da medula óssea foi realizada por meio da introdução de uma agulha modelo Komiyashiki de calibre 8 gauge e 15 cm de comprimento, no sentido ventro-dorsal perpendicular à pele. Uma vez bem fixada a agulha dentro do esterno (Figura 1), retirou-se o mandril e realizou-se a aspiração da medula óssea com auxílio de uma seringa heparinizada de 20mL, contendo 1mL de heparina diluída em 5mL de DPBS. Foram aspirados 14mL de conteúdo medular.

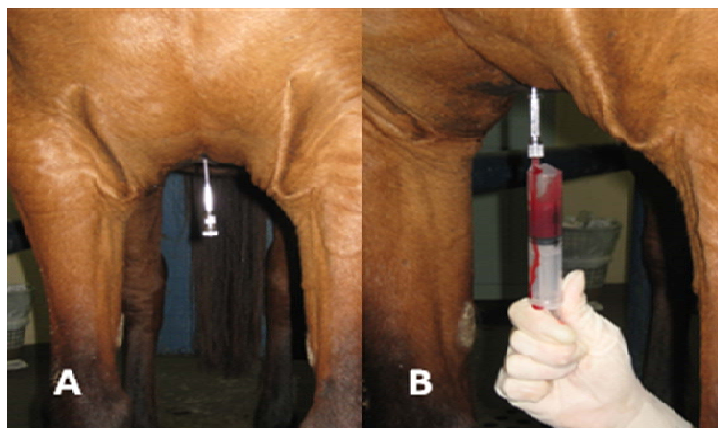


Figura1: Imagem da punção do esterno (A) e aspiração do sangue da medula óssea (B).

5.2.2. – Isolamento da fração Mononuclear

Após a coleta, o material foi filtrado com o auxílio de um filtro de equipo com bolsa de sangue para separação de possíveis coágulos, em seguida diluído na proporção de 1:1 de meio de cultivo DMEN(Gibco 11995-065) e adicionado lentamente à superfície do Ficoll (Ficoll Paque Plus – GE) contido em um tubo de centrifuga de 15ml sem que houvesse mistura dos materiais.

A amostra foi centrifugado por 40 minutos a 1250 rpm. Após a centrifugação foi coletado o alo formado na interface entre o Ficoll e o sangue do tubo (Figura 2). O material coletado foi lavado por 2 vezes em 1ml de DMEN alta glicose (sem adição de soro fetal bovino) para retirada do Ficoll, por meio de centrifugação por 10min a 2000 rpm. Em seguida o pellet foi ressuspendido em meio de cultivo completo contendo DMEN alta glicose (Gibco 11995-065) acrescido de 20% SFB (soro fetal bovino), 100UI/ml penicilina/100µg/ml streptomicina (Gibco 15140), 3µg/ml anfotericina B (Gibco 15290) e as células cultivadas.

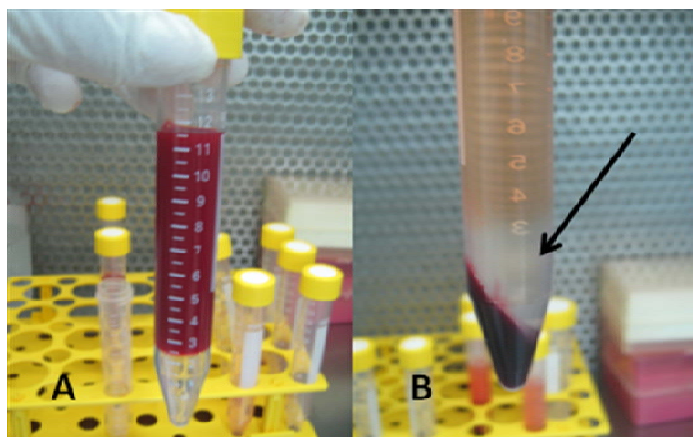


Figura 2: (A) Material aspirado da medula óssea depositado sobre a camada de Ficoll antes da centrifugação. (B) Após a centrifugação observou-se a separação das hemácias na porção inferior e do plasma na porção superior. A fração mononuclear foi localizada na região indicada pela seta.

5.2.3. – Cultivo das Células Tronco Mesenquimais

O cultivo foi realizado em garrafas para cultura de células com 25 cm^2 (Sarstedt – 83.1810.300) na presença de 5 ml de meio de cultivo. As células foram cultivadas em estufas de cultivo contendo 5% de CO_2 em ar, a 37°C em atmosfera úmida. O meio de cultivo utilizado consistiu de DMEM alta glicose (Gibco 11995-065) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina (Gibco 15140), 3 $\mu\text{g/mL}$ de Anfotericina B (Gibco 15290).

O meio de cultivo completo foi trocado a cada 5 dias, e o acompanhamento da aderência e o crescimento celular foi feito em microscópio invertido com um aumento de 100x.

O tempo médio de cultivo primário até o tapete celular chegasse em 70% de confluência foi em média 20 dias. Após este período, e com o cultivo celular estabelecido, foi realizada a primeira passagem das células com o objetivo de selecionar a linhagem e aumentar o número de células mesenquimais. Durante a primeira passagem o meio de cultivo foi trocado para

evitar a diferenciação espontânea devido a presença de alta glicose, passando a se utilizar DMEN baixa glicose (Gibco - 10567), contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/mL streptomicona(Gibco 15140), 3µg/mL de Anfotericina B(15290).

Para a realização da passagem, o meio de cultivo das garrafas descartado e em seguida foi adicionado 1mL de TrypLE Select (Invitrogen 12563-029) a 37°C para lavagem do fundo da garrafa e retirada total do meio de cultivo e do soro. Em seguida foi adicionado 5mL de TrypLE Select (Invitrogen 12563-029) a 37°C e as garrafas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C por 5min. As garrafas foram retiradas da estufa com as células em suspensão e adicionado 1ml de meio de cultivo completo contendo soro fetal bovino. As células em suspensão foram colocadas em um tubo de centrifuga de 15ml e centrifugados a 10min a 2000rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido.

Após a ressuspensão, uma alíquota das células foi corada com azul de trypan e realizada a contagem do número de células por ml na garrafa com o auxílio de uma câmara de “Neubauer”.

Após o estabelecimento do número de células por ml nas garrafas, foi realizada a primeira passagem, utilizando-se de uma concentração final de $2,0 \times 10^5$ células/ml, completando-se o meio da garrafa para 5ml de meio de cultivo completo. Foi utilizada esta concentração para todas as passagens. Foram realizadas 2 passagens de cada linhagem. (Figura 3).

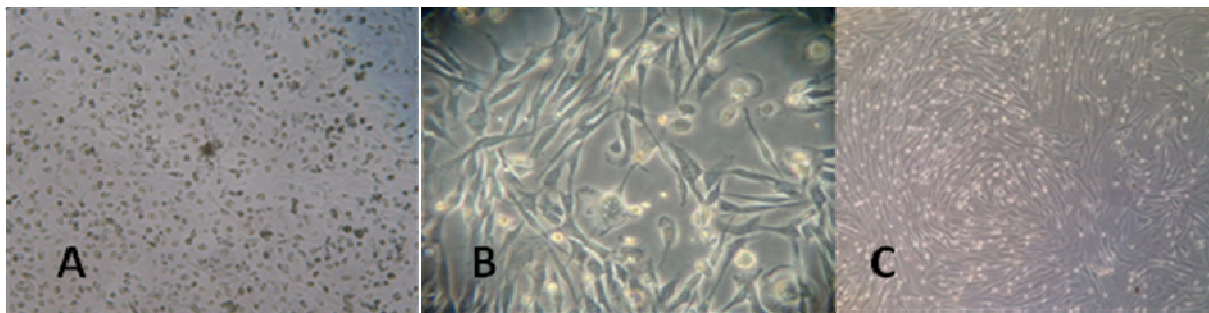


Figura 3: Aspecto das células mesenquimais eqüinas em cultivo.

(A) Logo após o plaqueamento. Note o aspecto arredondado das células (100x).

(B) Células aderidas com aspecto fibroblastoide após cinco dias de cultivo (200x).

(C) Tapete celular formado após quinze dias de cultivo (100x).

5.2.4. – Caracterização Celular

Caracterização de anticorpos de superfície CD34 (células hematopoiéticas) e CD44 (Células Mesenquimais) por Citometria de Fluxo

A caracterização imunofenotípica da superfície celular das células-tronco mesenquimais foi realizada no conteúdo da fração mononuclear e após o cultivo *in vitro*. Foi realizada marcação para o pool total de células isoladas após coleta da medula óssea (ID – Isolamento Direto), para as células em cultivo primário cultivadas após isolamento da fração celular (CP – Cultivo Primário), durante a primeira passagem (P1 – Primeira Passagem) e segunda passagem (P2 – Segunda Passagem) para se obter uma caracterização ainda mais detalhada das células, uma vez que desta maneira pode-se observar o comportamento de marcação durante as passagens.

Para a realização da marcação, foi realizado um ajuste para que a suspensão celular tivesse 1×10^6 cel/ml, e desta suspensão removeu-se uma amostra de 1×10^5 células para cada teste realizado e utilizando-se os seguintes marcadores; anticorpo primario de rato anti-cão conjugado com FITC - CD34 (Serotec MCA2411F) e o anticorpo primário rato anti-cão CD44

(MCA1041G). As células foram distribuídas em 4 tubos (Falcon BD® 352054) para serem lidos no citometro de fluxo BD®, onde um tubo continha somente células (controle), um tubo contendo células mais anticorpo secundário (controle), e os outros dois tubos contendo as células mais o CD44 e o CD34. Os anticorpos CD44 e CD34/FITC foram adicionados a uma diluição de 1:10 e era aguardado um tempo de 30min a temperatura ambiente. Após a adição dos anticorpos foi adicionado 1ml de PBS para lavagem das células as quais foram centrifugados a 200rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com 1ml de PBS. Como o marcador CD44 não é conjugado a um anticorpo secundário, foi então adicionado no tubo do CD44 um anticorpo secundário (coelho anti-rato RPE – Serotec STAR20A) e aguardado por 30min e em seguida o sobrenadante ser descartado e o pellet ressuspendido em 1ml de PBS. Em seguida os tubos foram lidos em Citometro de Fluxo FACS Calibur BD® - Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – (Figura 4).

O marcador CD34 é negativo para marcação de células tronco mesenquimal e positivo para marcação de células tronco hematopoiéticas, enquanto que o CD44 é positivo para marcação de CTM e negativo para CTH.

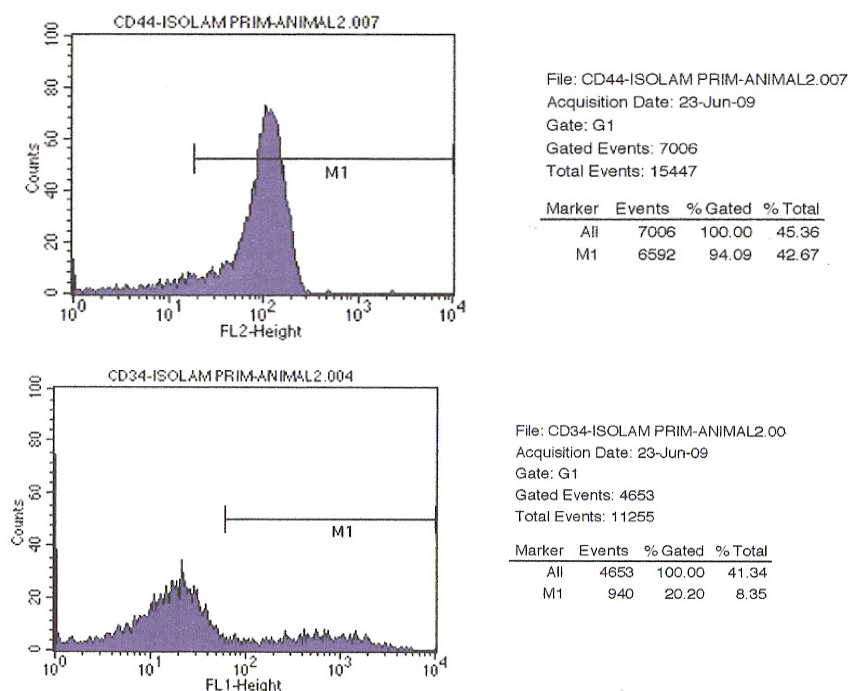


Figura 4: histograma de marcação para o CD44 e CD34

Imunocitoquímica - Marcação para anti-vimentina

O cultivo celular em segunda passagem foi ressuspendido e encaminhado a área de Patologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade e Zootecnia – Unesp, Botucatu – SP. As células foram fixadas em lâminas histológicas com o uso de álcool absoluto após serem centrifugas com o auxílio de uma cito-centrifuga (200g por 4 minutos).

As células mesenquimais isoladas a partir de sangue medular foram avaliadas por imunocitoquímica utilizando-se marcadores celulares específicos de filamentos intermediários do citoesqueleto. Os anticorpos primários empregados foram: anti-vimentina para células de origem mesenquimal (VIM3B4, Dakocytomation, m7020) e anti-citoqueratina para células epiteliais (AE1/AE3, Dakocytomation). A reação imunocitoquímica foi demonstrada a partir do uso do kit avidina-biotina-peroxidase (ABC, Dakocytomation, K0377). A marcação foi visualizada utilizando-se como cromógeno Diaminobenzidina (Liquid DAB, Dakocytomation, cod. K3466), e contra-corada com hematoxilina de Harris (Figura 5).

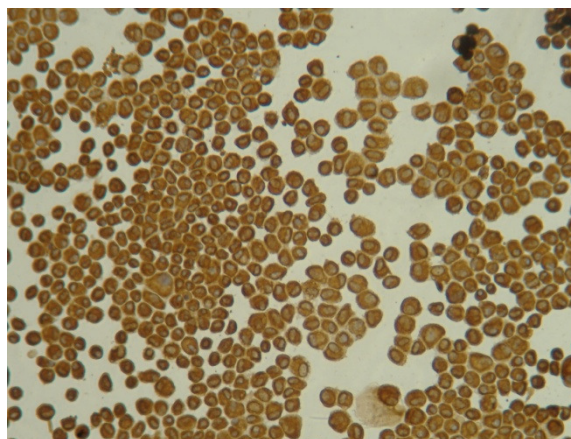


Figura 5: marcação do cultivo celular com anti-corpo anti-vimentina. Células coradas em marrom estão marcadas positivamente (200x)

5.2.5. – *Análise da Viabilidade Celular*

Para análise da viabilidade celular, o meio de cultivo da garrafa foi removido, e foi adicionado 0,5ml de PBS acrescida de 20µL de solução de Hoescht 33342 (10mg/ml), aguardando-se 30 minutos. Após este período foi adicionado 5µL de solução de Iodeto de Propídio (1,0mg/ml) e aguardado por 5 minutos antes de realizar a leitura. A leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490nm, com aumento de 400x). Células viáveis se apresentavam com o núcleo em uma coloração azul brilhante. Células com membrana lesada se apresentavam com o núcleo em uma refringência vermelha, devido a penetração do iodeto de propídio (Figura 6).

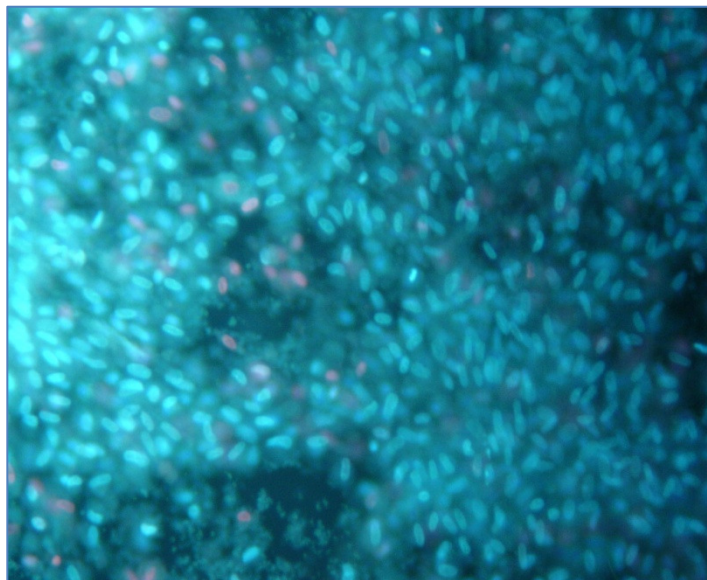


Figura 6: Coloração com Hoescht 33342 e iodeto de propídio para análise da viabilidade celular, onde núcleos azuis correspondem a células viáveis e núcleos vermelhos a células mortas. (aumento de 200X).

5.2.6. – Diferenciação Celular

Diferenciação de células tronco mesenquimais em linhagem de tecido ósseo

Para o teste de diferenciação das CTM em linhagem de tecido ósseo, utilizou-se o Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit (Chemicon – Cat. SCR028). Células tronco mesenquimais em garrafas de cultivo de 25cm² de cultivo em segunda passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 24 poços tratadas com fibronectina ou colagenase (Sartedt – 83.1836.300) à uma concentração de 1×10^5 cél/ml por poço, contendo meio de cultivo completo (DMEM baixa glicose (Gibco 10567) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/ml streptomomicina(Gibco 15140), 3µg/ml de Anfotericina B(Gibco - 15290)) e cultivadas em estufa com 5% de CO₂ em ar a 37°C em atmosfera úmida, aguardando até que essas atingissem 100% de confluência antes de se iniciar o teste.

Quando as células atingiram uma confluência de 100%, o meio de cultivo completo foi substituído por 1 ml de meio indutor de diferenciação constituído de: DMEM baixa glicose (Gibco 10567) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/ml streptomomicina(Gibco 15140), 3µg/ml de Anfotericina B(15290) suplementados com Solução de Dexametasona (0,1µM), Solução de Ácido Ascórbico (0,2mM) e Solução de Glicerol 2-Fosfato (10mM). O meio indutor foi trocado a cada 3 dias, durante os 14 dias de diferenciação, e após este período as células foram fixadas em álcool 70% refrigeradas por 1 hora e em seguida marcadas para confirmação da diferenciação das células em linhagem de osteócitos.

Análise citoquímica da diferenciação para linhagem óssea

Como Osteócitos formam depósitos de cálcio, a confirmação da diferenciação das células tronco mesenquimais para tecido ósseo constitui marcação das células fixadas com uma solução de “Alizarin Red “ que marca deposição do mineral no meio extracelular.

Para a realização da marcação da diferenciação, foi aspirado o álcool 70% das células fixadas as quais foram lavadas duas vezes com água

destilada, adicionando-se, em seguida, 500µL de “Alizarin Red”. As células foram então incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período removeu-se o corante e as células foram lavadas por 4 vezes com água. Em seguida adicionou-se 1ml de água por poço para evitar que as células secassem, e os resultados foram analisados, observando-se 5 campos diferentes com o auxílio de um microscópio invertido e aumento de 400x.

Diferenciação de células tronco mesenquimais em Linhagem Adipogênica

Para o teste de diferenciação das CTM em linhagem adipogênica, utilizou-se o Mesenchymal Stem Cell Adipogenesis Kit (Chemicon – Cat. SCR020). CTM em garrafas de cultivo de 25cm² em segunda passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 24 poços tratadas com fibronectina ou colagenase à uma concentração de 1x10⁵ cél/ml por poço, contendo meio de cultivo completo (DMEM baixa glicose) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/ml streptomycina, 3µg/ml de Anfotericina B e cultivadas em estufa com 5% em ar a 37°C e atmosfera úmida, aguardando-se até que essas atingissem 100% de confluência antes de iniciar o teste.

Quando as células atingiram uma confluência de 100%, o meio de cultivo completo foi substituído por 1ml de meio indutor de diferenciação constituído de: DMEM baixa glicose (Gibco 10567) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/ml streptomycina(Gibco 15140), 3µg/ml de Anfotericina B(15290) suplementados com Solução de Dexametasona (1µM), IBMX (0,5mM), Insulina (10ug/ml) e Indometacina (100µM). O meio indutor foi trocado a cada 3 dias, durante os 21 dias de diferenciação, e após este período as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 40 minutos e em seguida marcadas para confirmação da diferenciação das células em linhagem de adipogênica. Formação de gotículas de gordura foram observadas a partir de 5 dias após o início da diferenciação.

Análise citoquímica da diferenciação para linhagem adipogênica

Como adipócitos possuem gotículas de lipídios, a confirmação da diferenciação das CTM para tecido adiposo consistiu na marcação das células fixadas com uma solução de “Oil Red O “ que marca vacúolos lipídicos nas células.

Para a realização da marcação da diferenciação, foi aspirado o paraformaldeído a 4% das células fixadas e essas foram lavadas por três vezes com PBS e em seguida por duas vezes com água destilada. Adicionou-se então 500µL de “Oil Red O” e as células foram incubadas por 50 minutos em temperatura ambiente. Depois deste período removeu-se o “Oil Red O” e as células foram lavadas por 3 vezes com água destilada. Em seguida adicionou-se 0,5ml de Solução de Hematoxilina por 15 minutos para marcação do núcleo. Os poços foram lavados com 1ml de água destilada e os resultados foram analisados observando 5 campos diferentes com o auxílio de um microscópio invertido em aumento de 400x.

Diferenciação de células tronco mesenquimais em Linhagem Condrogênica

Para o teste de diferenciação das CTM em linhagem condrogênica, utilizou-se o STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (A10071-01). CTM em garrafas de cultivo de 25cm² em segunda passagem foram ressuspensas e transferidas para uma placa de cultivo de 24 poços tratadas com fibronectina ou à uma concentração de 1x10⁵ cél/ml por poço, contendo meio de cultivo completo (DMEM baixa glicose) contendo 20% de soro fetal bovino, 100UI de penicilina/100µg/ml streptomicina, 3µg/ml de Anfotericina B e cultivadas em estufa com 5% de CO₂ em ar a 37°C atmosfera úmida, aguardando-se até que essas atingissem 80% de confluência antes de iniciar o teste.

Quando as células atingiram uma confluência de 80%, o meio de cultivo completo foi substituído por 1ml de meio indutor de diferenciação constituído por: 90% de STEMPRO® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium e 10% de STEMPRO® Chondrogenesis Supplement e 100UI de penicilina/100µg/ml streptomicina. O meio indutor foi trocado a cada 3 dias,

durante os 14 dias de diferenciação, e após este período as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos e em seguida marcadas para confirmação da diferenciação das células em linhagem de condrogênica.

Análise citoquímica da diferenciação para linhagem condrogênica

Como condrócitos apresentam síntese de proteoglicanos, a confirmação da diferenciação das CTM para condrócitos consistiu de marcação das células fixadas com uma solução de “*Alcian Blue*” que marca em azul a presença de proteoglicanos.

Para a realização da marcação da diferenciação, foi aspirado o paraformaldeído a 4% das células fixadas e essas foram lavadas por três vezes com PBS. Após adicionou-se 500µL de solução 1% Alcian Blue preparada em 0,1N HCL e as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois deste período removeu-se o “Alcian Blue” e as células foram lavadas por 3 vezes com 0,1N HCL adicionando-se água destilada para neutralizar a acidez. Os resultados foram analisados observando 5 campos diferentes com o auxílio de um microscópio invertido em aumento de 400x.

Diferenciação de células tronco mesenquimais para linhagem neurogênica

Para o teste de diferenciação das CTM em linhagem neurogênica, utilizou-se o Astrocyte Differentiation Medium (Millipore cat. n. SCM010). Quando as células em segunda passagem atingiram uma confluência de 80%, o meio de cultivo completo foi substituído por 1ml de meio indutor de diferenciação constituído de: Astrocyte Differentiation Medium. O meio indutor foi trocado a cada 1 dia, durante os 6 dias de diferenciação, e após este período o meio de cultivo foi trocado pelo de diferenciação constituído de: Astrocyte Differentiation Medium e 20ng/ml FGF-2 e cultivado mais 3 dias. Após este período as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos e em seguida marcadas para confirmação da diferenciação das células em linhagem neurogênica.

Análise de Imunofluorescência da diferenciação para linhagem neurogênica

A confirmação da diferenciação das CTM para tecido neural consistiu da marcação das células fixadas com anticorpos específicos para linhagem neural.

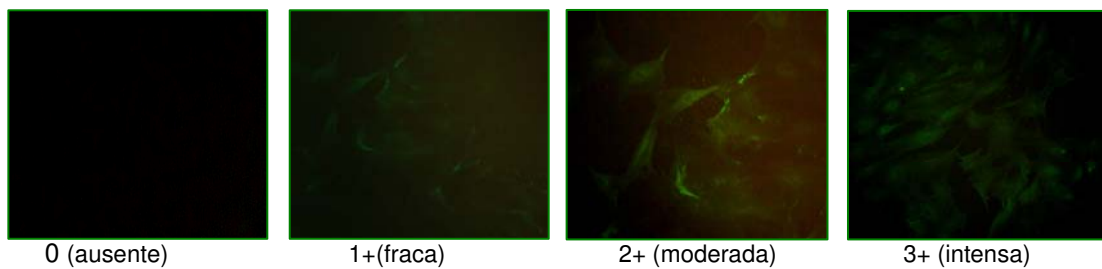
Para a realização da marcação da diferenciação, foi utilizado o neuron-glial cell marker sampler kit (Chemicon-NS130) composto pelos anticorpos: monoclonal para Beta III Tubulina, monoclonal para MAP2, monoclonal para Oligodendrocyte, polyclonal para GFAP, Mouse IgG Controle Negativo e Rabbit IgG Controle Negativo. Para cada anticorpo utilizado foi padronizado uma diluição de 1:50.

Foi aspirado o paraformaldeído a 4% das células fixadas e essas foram lavadas 1 vez com PBS. Após adicionou-se uma solução de bloqueio (0,1% Triton X-10, 1% SFB) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas 1 vez com PBS e adicionado o anticorpo primário na diluição padrão por 1 hora em temperatura ambiente. As células foram então lavadas por duas vezes em PBS e incubados por 1 hora com anticorpo secundário em uma diluição padrão de 1:100. Utilizou-se os anticorpos secundário conjugado com FITC (DKYxMS – FITC – Ap192F – Chemicon, DKYxRB – FITC- Ap182F- Chemicon).

Depois deste período as células lavadas por 3 vezes com PBS e os núcleos marcados com DAPI (D3571) em uma concentração de trabalho de 0,5ug/ml por 5 minutos, após os quais as células foram lavadas 1 vez com PBS. Os resultados foram analisados observando 5 campos diferentes com o auxílio de um microscópio de fluorescência invertido em aumento de 400x.

5.2.7. – Análise da Intensidade de Marcação

A intensidade da marcação para diferenciação foi classificada de acordo com a utilização de escores considerando a avaliação por microscopia de luz quando se utilizou marcação por imunocitoquímica, ou por microscopia de fluorescência quando se utilizou anticorpos marcados com sondas fluorescentes, da seguinte forma: 0 (ausente), 1+(fraca), 2+ (moderada), 3+ (intensa).



5.2.8. – Metodologia Estatística

No experimento de quantificação de anticorpos de superfície (CD) foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para comparar as diferenças entre duas médias em relação ao tratamento.

No experimento de diferenciação da linhagem mesenquimal para linhagem neurogênica, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para comparar os dados dos escores dos marcadores utilizados, e o teste exato de Fisher, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para análise do percentual de marcação.

5.3. - Resultados

5.3.1. - Caracterização Celular

Com aproximadamente 5 dias de cultivo já foi possível observar as células em crescimento com características fibroblastóides aderidas a garrafa, sendo que o tempo médio de cultivo primário até o tapete celular chegasse em 70% de confluência foi em média 20 dias.

Os resultados do teste de caracterização para os anticorpos de superfície CD34 (células mesenquimais) e CD44 (células hematopoiéticas) estão expressos na tabela 1, tabela 2 e tabela 3. Foram observadas diferenças significativas entre os momentos analisados (fração mononuclear, cultivo primário, primeira passagem e segunda passagem), havendo aumento nas taxas de CD44 e diminuição nas taxas de CD34. A partir da primeira passagem observou-se estabilização no aumento das taxas de CD44.

Tabela 1: Percentual de marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos isolamento direto e cultivo primário

	(%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
ID	CD44	89,15	94,09	30,96	54,03	60,74	58,03	48,31	39,46	32,37	63,49	32,04
	CD34	10,85	5,91	69,04	45,97	39,26	41,97	51,69	60,54	48,11	36,51	67,96
CP	CD44	61,58	99,22	73,51	73,69	84,18	48,04	43,99	97,07	77,07	78,21	96,75
	CD34	38,42	0,78	26,49	26,31	15,82	51,96	56,01	2,93	12,67	21,79	3,25

ID – isolamento direto / CP – cultivo primário

Tabela 2: Percentual de marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos cultivo primário e cultivo secundário

	(%)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
P1	CD44	99,14	85,96	90,07	92,03	90,30	86,61	87,58	95,25	92,85	89,94	91,51
	CD34	0,86	14,04	9,93	7,97	9,7	13,39	12,42	4,75	7,15	10,06	8,49
P2	CD44	99,64	96,53	91,03	95,78	94,54	92,74	90,14	96,47	94,81	91,53	94,80
	CD34	0,36	3,47	8,97	4,22	5,46	7,26	9,86	3,53	5,19	8,47	5,2

P1 – primeira passagem / P2 – segunda passagem

Tabela 3: Percentual comparativo entre os tratamentos pela marcação para anticorpos CD44 e CD34 para os grupos cultivo primário e cultivo secundário

	ID	CP	P1	P2	
CD44	54,79 ± 21,71 ^a	75,75 ± 18,74 ^{ab}	91,02 ± 3,85 ^b	94,36 ± 2,81 ^b	p<0,001
CD34	43,44 ± 20,45 ^b	23,31 ± 19,06 ^{ab}	8,98 ± 3,85 ^a	5,63 ± 2,81 ^a	P<0,001

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste Tukey (p<0,05).

5.3.2. – Diferenciação Celular

Diferenciação para linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica

Os resultados do teste de diferenciação para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica estão expressos na tabela 4, figura 7, figura 8 e figura 9. A média e desvio padrão demonstram que os valores se aproximam ao máximo da classificação de marcação 3+ (intensa).

Tabela 4: caracterização da Linhagem de células mesenquimais

Grupo/Teste	Diferenciação Linhagem Osseogênica	Diferenciação Linhagem Adipogênica	Diferenciação Linhagem Condrogênica
01	3	3	3
02	3	3	3
03	3	3	3
04	3	3	2
05	3	3	2
06	2	3	2
07	2	2	2
08	3	2	3
09	3	3	2
10	3	3	3
11	3	2	2
Total	2,818 ± 0,405	2,727 ± 0,467	2,455 ± 0,522

Diferenciação Linhagem Óssea 11/11 marcaram + (100% diferenciação segundo a marcação)

Diferenciação Linhagem Adipogênica 100%

Diferenciação Linhagem Condrogênica 100%

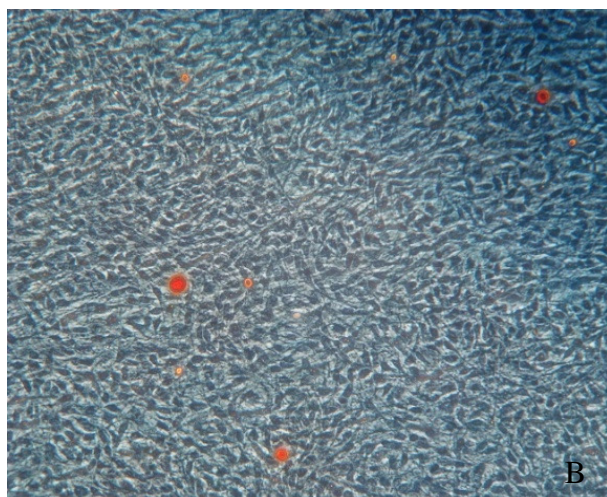
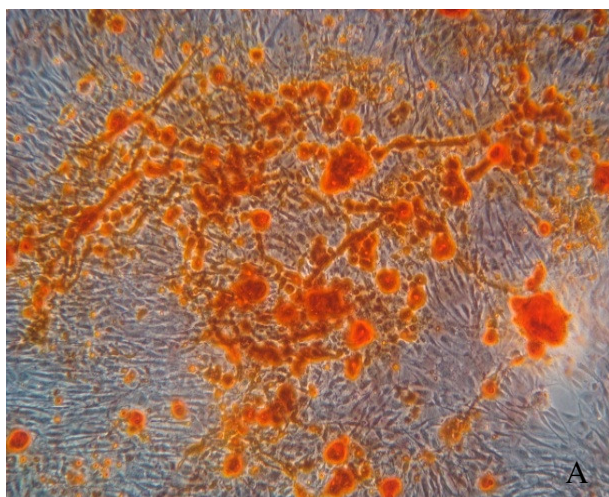


Figura 7: diferenciação em linhagem óssea 100x (A) e controle 100x (B)

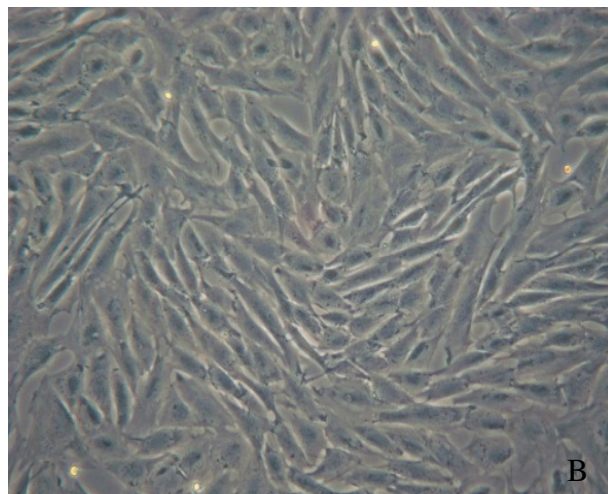
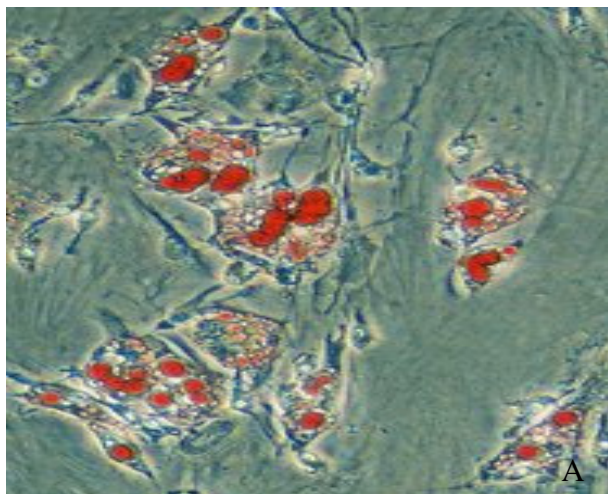


Figura 8: diferenciação em linhagem de adipócitos 200x (A) e controle 200x (B)

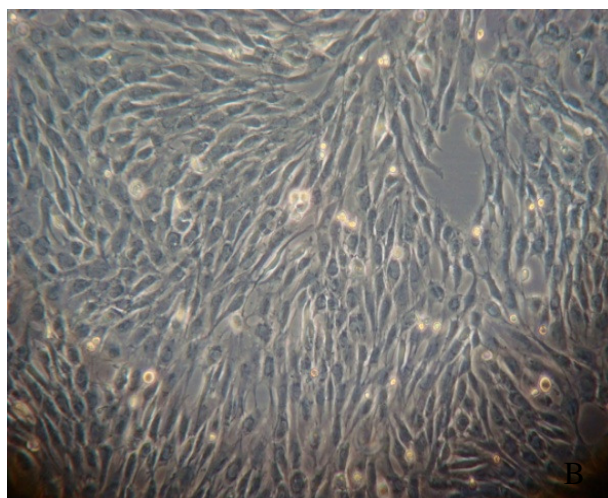
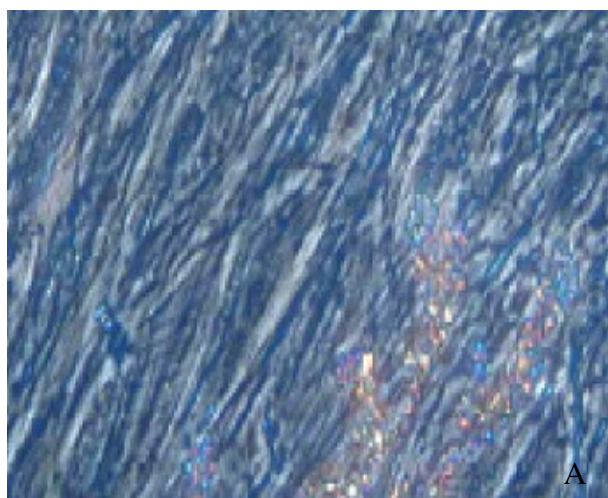


Figura 9: diferenciação em linhagem condrogênica 100x (A) e controle 100x (B)

Diferenciação para linhagem neurogênica

Os resultados do teste de diferenciação para linhagem neurogênica estão expressos na tabela 5, tabela 6, figura 10, figura 11, figura 12, figura 13. Foram observadas diferenças significativas entre os marcadores analisados, havendo maior expressão do GFAP e β III Itubulina, os quais apresentaram índices de marcação igual, quando comparada com MAP2 e Oligodendrócitos que apresentaram uma menor expressão. O GFAP foi expresso em todos dos grupos estudados.

Tabela 5: Diferenciação da linhagem mesenquimal em linhagem neurogênica

Grupo/Ac	β III TUBULINA	MAP2	OLIGODENDRÓCITO	GFAP	Mouse IgG Controle Negativo	Rabbit IgG Controle Negativo
01	2	2	2	3	0	0
02	2	2	2	3	0	0
03	2	2	1	3	0	0
04	1	1	0	1	0	0
05	2	1	0	3	0	0
06	1	0	1	2	0	0
07	0	1	0	1	0	0
08	0	1	1	2	0	0
09	1	0	0	1	0	0
10	2	1	2	3	0	0
11	0	0	1	1	0	0
Total	$1,18 \pm 0,87^a$	$1 \pm 0,77^b$	$0,91 \pm 0,83^b$	$2,09 \pm 0,83^a$		

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença no teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

Tabela 6: Porcentagem de células marcadas para confirmação da linhagem neurogênica

Grupo/Ac	β III TUBULINA	MAP2	OLIGODENDRÓCITOS	GFAP
%	72,7% (8/11)	72,7% (8/11)	63,6% (7/11) [*]	100% (11/11) [*]

^{*} tendência de diferença estatística pelo teste exato de Fisher ($p = 0,0902$)

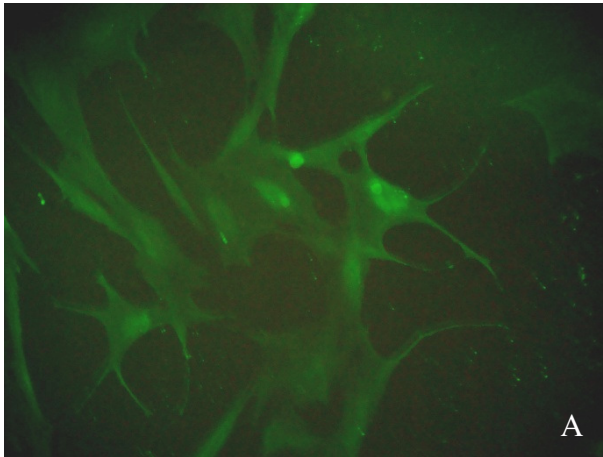


Figura 10 – marcação para GFAP 200x (A) e controle marcado com DAPI 200x (B)

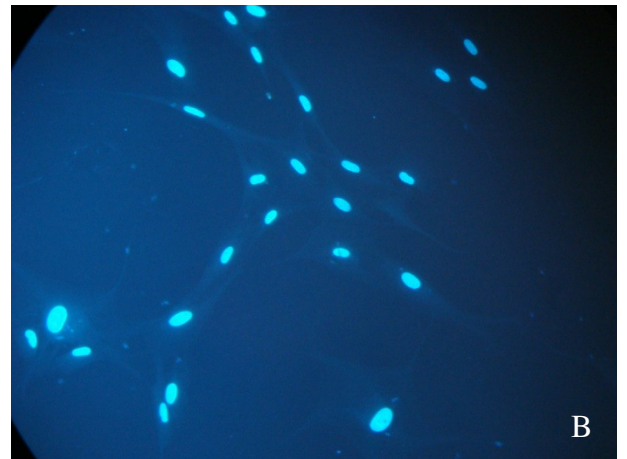
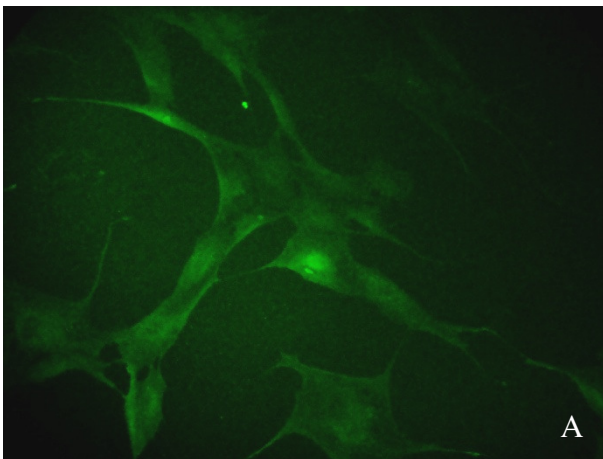


Figura 11 – marcação para BIII Tubulina 200x (A) e controle marcado com DAPI 200x (B)

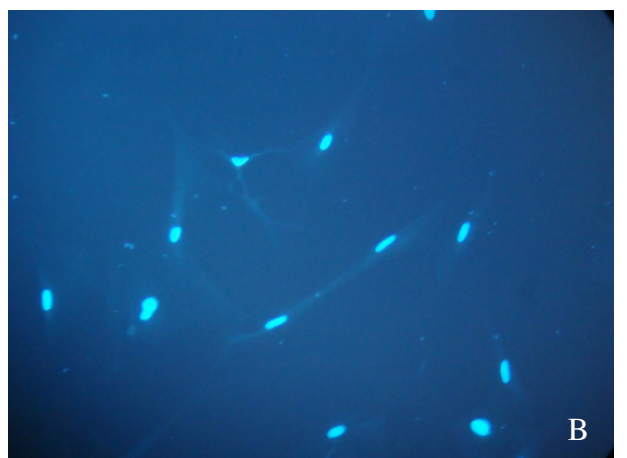
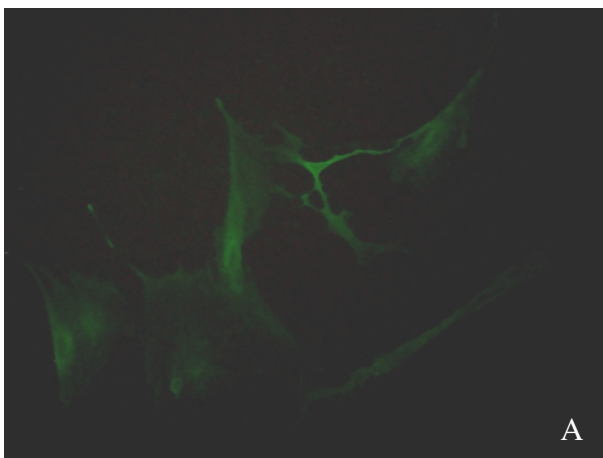


Figura 12 – marcação para MAP2 200x (A) e controle marcado com DAPI 200x (B)

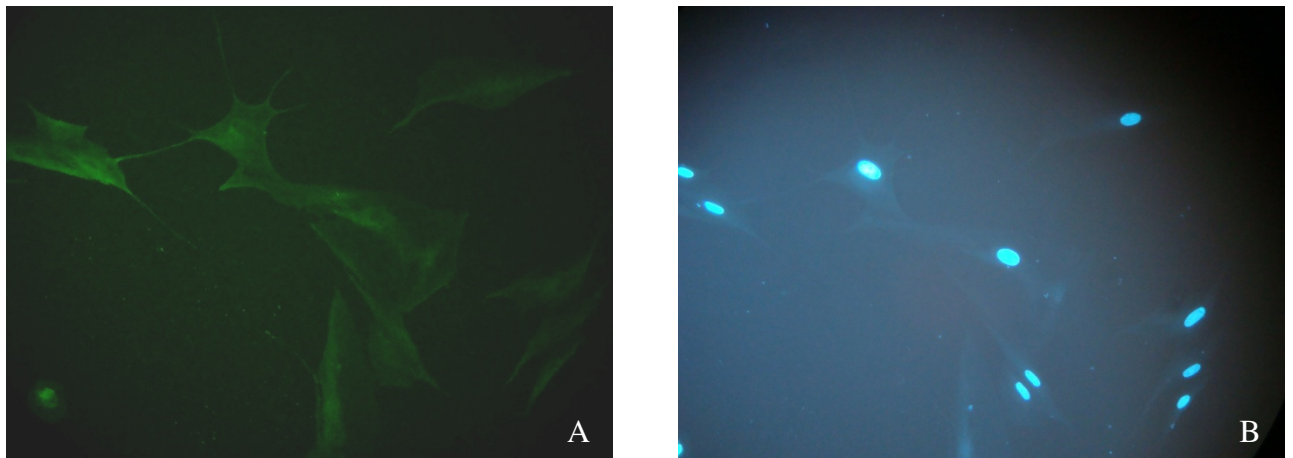


Figura 13 – marcação para oligodendrócito 200x (A) e controle marcado com DAPI 200x (B)

5. 4 - Discussão

As células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de adultos podem ser obtidas a partir da medula óssea, da gordura, do sangue do cordão umbilical, do músculo e de muitos outros tecidos, incluindo a cartilagem, o osso trabecular e a pele (CAPLAN e BRUDER 2001). No entanto, a fonte ideal de células-tronco para aplicação em terapias regenerativas é discutível e ainda não foi estabelecida (SCHNABEL et al., 2010). A definição/identificação de células-tronco evolui constantemente. O conceito segundo o qual uma célula-tronco de determinada linhagem pode se diferenciar ou trans-diferenciar em uma célula de linhagem tecidual completamente diferente recebe o nome de “plasticidade da célula-tronco”. Portanto, a identificação de células de uma determinada linhagem pode ser ambígua. No momento, não há um consenso quanto ao teste padrão para isolamento ou identificação de células-tronco (SCHNABEL et al., 2010). Desta forma ao se avaliar a expressão de marcadores de superfície celular, é importante lembrar que diversos marcadores são comuns a diversos tipos de células, principalmente células

sanguíneas brancas nucleadas. Uma vez que não há um marcador único para CTM, diversos marcadores têm que ser avaliados juntos.

É conhecido que uma célula-tronco mesenquimal, derivada da medula óssea ou do tecido adiposo deveria ser positiva para CD44, mas também negativa para o CD34, presente apenas nas células tronco hematopoiéticas (SCHNABEL et al., 2010). No presente experimento as Tabelas 1 e 2 mostram que a percentagem de células marcadas com os anticorpos CD44 e CD34 nos isolamentos diretos (fração mononuclear), nas culturas primárias, primeira passagem e segunda passagem, mantiveram-se equivalentes em cada momento estudado. Porém, quando comparados os diferentes momentos, observou-se um aumento na marcação com o CD44 e uma queda acentuada da marcação com o CD34. Foi observada diferença entre a fração mononuclear e a primeira e segunda passagem, com um aumento acentuado das células marcadas com CD44 e uma diminuição das marcadas com DC34 ao longo do cultivo. Estes achados demonstram claramente que à medida que as células foram expandidas a partir do cultivo primário em passagens subseqüentes, ocorreu um isolamento das CTM e uma diminuição das células mononucleares no cultivo. No entanto, a partir da primeira passagem não foi observado aumento significativo da porcentagem de células caracterizadas como mesenquimais, uma vez que, não foram observadas diferenças entre a primeira e segunda passagem quanto ao número de células CD44 positivas (Tabela 3). É importante lembrar que o cultivo seleciona e multiplica a população de células com características de CTM, mas esta população ainda é heterogênea, uma vez que linhagens com potencial pluripotente diferente estão presentes na medula óssea, mas todas terão comportamento semelhante durante o cultivo.

Frente a dificuldade em se caracterizar adequadamente as CTM a diferenciação *in vitro* para tecidos de origem mesodermal tem auxiliado a confirmação da origem mesenquimal das células. No presente experimento, partindo de cultivo de segunda passagem dos isolados de CTM, foi possível diferenciar, em condições específicas, as culturas em células de linhagens osseogênica, adipogênica e condrogênica (Tabela 4). Além disso, em todas as rotinas realizadas observou-se uma alta intensidade de marcação. Estes resultados além de confirmarem a origem mesenquimal das células cultivadas mostrou que os isolados de CTM apresentam grande potencial de

multipotência se diferenciando em células de diversos tipos de tecidos. Estes achados corroboram com o descrito por Woodbury et al (2002) e Bianco and Robey (2000) para CTM de outras espécies. O mesmo foi observado em isolados de cordão umbilical de humanos por Giorgetti et al, (2010) e Goodwin et al, (2001).

Segundo Eckfeldt et al (2006), as CTM possuem a capacidade auto-regenerativa e de diferenciação, que gera e regenera tecidos nos quais são influenciados por sinalizações convergentes em microambientes intrínsecos e extrínsecos ao redor destas células. Desta forma elas representam uma grande promessa para a medicina regenerativa, para a reparação tecidual, bem como para o melhor entendimento da biologia de diversas doenças e formação de tumores (MA et al., 2007). Entretanto, o futuro da terapia com células-tronco, assim como seu desenvolvimento atual, depende em parte do tipo de célula (embrionária ou mesenquimal) destinado à aplicação clínica.

Apesar das células CTM terem origem mesodermal, o potencial de desenvolvimento das células obtidas da medula óssea, aparentemente, não é restrito a células originadas nesta camada germinativa, uma vez que já foi demonstrada que células caracterizadas como CTM podem povoar tecidos originados tanto da endoderme como da ectoderme (DIREKZE et al., 2003). Entretanto a frequência de colonização é pequena e muitos dos experimentos que comprovam esta diferenciação não foram reproduzidos por outros grupos (HOMBACH-KLONISCH et al., 2008). Sendo assim, a trans-diferenciação de CTM em células com origem diferente da mesodermal nunca foi confirmada de forma conclusiva.

Neste experimento foi avaliado o potencial das CTM obtidas da medula óssea de eqüinos em se diferenciar em células neuronais. Como as células foram mantidas em cultura durante todo o experimento a possibilidade de fusão com células de origem neural foi eliminada. Apesar disso foi constatada a expressão de proteínas neuronais de forma bastante evidente (Tabela 5), quando as CTM foram submetidas à diferenciação para linhagem neurogênica. Este resultado concorda com Tondreau et al., (2004) e com Corti et al., (2004) que também observaram a expressão de proteínas neuronais imaturas em mais de 80% das CTM estudadas, sendo estas proteínas consideradas como constituintes naturais das CTM. Entretanto, o fato das células que foram

diferenciadas para linhagem neurogênica a partir de CTM estarem expressando as proteínas, β III tubulina, MAP2, oligodendrócitos e GFAP não quer dizer que estas células se transformaram em verdadeiramente células neurais, pois como acreditam Ankeny et al (2004), Woodbury et al (2002) e Azizi et al (1998), estas células foram apenas capazes de ativar os genes que expressam estas proteínas, mas esta expressão pode não ser acompanhada de uma mudança na função celular.

Neuhuber et al. (2004) e Lu et al., (2004) relatam que a transformação de CTM em cultivo em células com morfologia semelhante a neurônios é provocada pelo encolhimento das células submetidas a agentes químicos indutores de diferenciação. Esta mudança de morfologia seria resultante da despolimerização de filamentos de actina e a marcação positiva para marcadores neuronais apareceria devido a concentração destas substâncias na célula encolhida. Resultados semelhantes não foram observados no presente experimento uma vez que não foi notada mudança significativa do formato celular nas células que expressaram os marcadores. Este fato provavelmente está relacionado ao tipo de indutor utilizado, uma vez que ambos os autores induziram a diferenciação neural com DMSO e neste experimento ela foi induzida com ácido retinóico e FGF-2, substâncias potencialmente menos tóxicas do que o DMSO.

Para Ankeny et al (2004) e Azizi et al (1998), as CTM não possuem capacidade de se diferenciarem em neurônio em enxertos de células, apesar de expressarem proteínas neurogênicas. Estes dados contrastam com o sugerido por Krabbe et al (2005), Tondreau et al (2004) e Jiang et al. (2002), que relatam a presença, na medula óssea, de uma população rara de células mesenquimais primitivas, as quais têm um alto potencial pluripotente podendo se diferenciar em células originadas das diversas camadas germinativas. Estas células foram chamadas de células progenitoras adultas multipotentes (MAPC – Multipotent adult progenitor cells). Potencialmente parte das células que expressaram marcadores neurais no presente experimento podem pertencer a esta população especial de células tronco, mas esta origem não foi confirmada. Além disso espera-se que esta população ocorra em uma frequência muito pequena, o que seria incompatível com o número de células que aderiram ao

plástico, bem como com a velocidade de multiplicação celular observada neste experimento.

Tem se observado na literatura grande número de pesquisas relacionadas a terapias com CTM mostrando suas vantagens e desvantagens em relação a outros tratamentos padrão ou mais conservadores. Entretanto, nas mesmas linhas de pesquisas com CTM há divergências na real função endógena destas células quando enxertadas em pacientes que são submetidos a estas terapias. Krabbe et al (2005) acreditam que as CTM diferenciadas *in vitro* e inoculadas nos pacientes, por si só já refazem a perda do tecido no qual se deseja o reparo do dano ou injúria. Por outro lado, trabalhos mais criteriosos e conservadores (UCCELLI et al., 2008; ANKENY et al., 2004; AZIZI et al., 1998), adotam o pensamento de que a presença das CTM diferenciadas apresentam vantagens locais em virtude de sinalizarem diversos mecanismos fisiológicos de diferenciação, sendo as células de reparação advindas estas do próprio paciente ou da ativação de mecanismos da resposta imune inata e adquirida, o que torna o microambiente local propício para uma regeneração tecidual. Estes autores não acreditam que as CTM transferidas se diferenciem e reconstruam o tecido ou mesmo sejam incorporadas de fato como novas células de reparo.

De fato, mesmo KRABBE et al, 2005 em estudo de diferenciação de CTM em células neurais, demonstrou a presença de AMPc e fatores de quimiotaxia local que estimulam a migração de células do próprio tecido e auxiliam a sua diferenciação. No presente experimento, as células cultivadas não foram transferidas para receptores devido a dificuldade de se acompanhar a migração celular em um animal de grande porte. No entanto, em experimentos futuros serão realizadas transferências e colheita de material para clarificar o destino de tais células após a realização de terapia celular.

5.5 – Conclusão

- O protocolo utilizado neste experimento no isolamento e cultivo das CTM obtidas do sangue da medula óssea de equinos foi eficiente.
- O protocolo adotado no processo de caracterização das células tronco mesenquimais, com utilização de marcadores de membrana associada a diferenciação para linhagem óssea, condrogênica e adipogênica foi eficiente.
- Apesar das células terem expressado marcadores para células neurais, não é possível concluir que estas células se diferenciaram em células funcionais da linhagem neurogênica.

6. CAPITULO II: CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS

6.1. - Objetivos do Capítulo 2

- Padronizar metodologia para isolamento e cultivo das células tronco embrionárias equinas
- Caracterizar as células tronco embrionárias eqüinas com o auxílio de marcadores de Pluripotência
- Diferenciar as células tronco embrionárias eqüinas em linhagem celular neurogênica

6.2. – Material e Métodos

6.2.1. Produção das Células de Sustentação (Monocamada) Eqüinas

Fragmentos de aproximadamente 1mm^3 de tecido epitelial de equinos adultos, foram retirados por biópsia de pele realizada na região do flanco . Os animais receberam anestesia local infiltrativa com 10mL de lidocaína. Os fragmentos foram lavados em solução fisiológica por duas vezes, e colocadas em frasco de transporte com PBS em temperatura ambiente.

A amostra coletada foi processada em placas de Petri (60mm de diâmetro) com PBS. O tecido foi fragmentado (média de $0,1\text{ mm}^2$ cada pedaço) com o auxílio de duas lâminas 11 de bisturi tipo Bard-Paker. Os fragmentos foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato sem cálcio e magnésio (PBSA), com pH 7,4.

Os fragmentos foram semeados em quatro frascos de cultivo de 25cm^2 previamente banhados com SFB e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO_2 , para favorecer sua aderência à superfície. Após esse tempo, foi adicionado meio cultivo Completo composto por DMEN alta glicose (Gibco 11995-065) contendo 10% SFB, 100UI/mL penicilina/100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina (Gibco 15140), 3 $\mu\text{g/mL}$

anfotericina B (Gibco 15290). Em cada frasco foi colocado cerca de 5 mL de meio, o suficiente para recobrir os fragmentos.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas em microscópio invertido. Após 10 a 15 dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo dos frascos. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos explantes, o meio de cultivo foi renovado a cada três dias. Quando 70% do frasco de cultura se encontrava coberto por células (subconfluência), foi realizada a passagem (Figura 1).

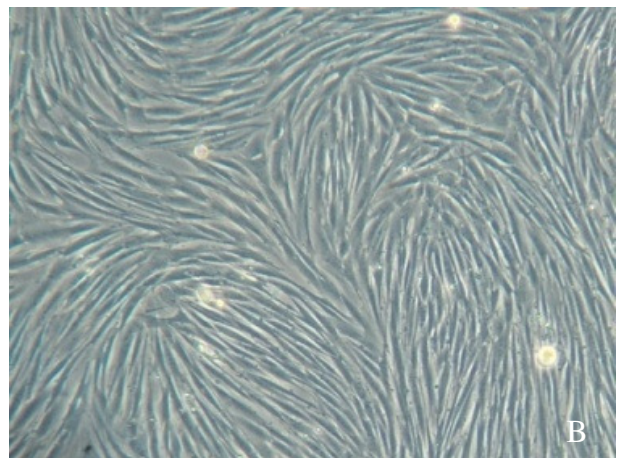


Figura 1: (A) Placa contendo fragmento de pele de equino. (B) Monocamada de fibroblastos em confluência (microscópio invertido com contraste de fase Ph 1, aumento de 200x).

6.2.2. – Manutenção do Cultivo

Para tripsinização, depois de retirado todo meio de cultivo das garrafas, estas foram lavadas com solução de PBS, e adicionados de 1mL de TrypLE Select (Invitrogen 12563-029) a 37 °C. As garrafas foram mantidas em estufa a 38,5° C por no máximo 10 minutos até que todas as células se soltassem do fundo.

Realizou-se então a neutralização com meio DMEM acrescido de 20% de SFB e Penicilina/Estreptomicina. Uma amostra de 50 µL meio foi retirada e adicionada a 50 µl do corante Tripán Blue, com esta solução foi preenchida a Câmara de Neubauer e contadas as células translúcidas dos quatro quadrantes mais externos. As células azuis que permitem a passagem do corante estão mortas e as células translúcidas estão vivas.

O valor encontrado foi colocado na fórmula abaixo para obter o resultado do número de células/mL:

$$\frac{\text{Nº células contadas} \times 2 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (quadrantes lidos)}}$$

O resultado obtido é a concentração inicial (Ci), e foi colocado na fórmula seguinte para identificar o quanto do volume inicial (Vi) das garrafas deve ser dividido para cada nova garrafa de cultivo celular: $C_i \times V_i = C_f$ (concentração final, 2×10^6) $\times V_f$ (volume final de meio na garrafa).

6.2.3. - Preparo das Camadas de Sustentação

Foram preparados placas de 6 poços (83.1839.300 – Sarstedt) identificadas, adicionando-se uma concentração de 5×10^4 células por poço e aguardado por 24 horas para aderência, estabilização do cultivo e formação da monocamada.

Os fibroblastos em crescimento na placa de cultivo foram bloqueadas quanto ao crescimento celular, para que estes não atrapalhem o crescimento das células tronco embrionária. Para tanto foi utilizada a Mitomicina C (M4287 – Sigma). A mitomicina C é um agente alquilante inibidor da síntese de DNA dependente do RNA e da síntese protéica em células de crescimento rápido atuando na proliferação fibroblástica.

Após 24 horas na estufa os fibroblastos presentes nas placas com 6 poços passaram por um processo de inativação. O meio de cultivo foi trocado por um novo meio contendo DMEN alta glicose (Gibco 11995-065) contendo 10% SFB(soro fetal bovino), 100UI/mL penicilina/100µg/ml streptomicina (Gibco 15140), 3µg/ml anfotericina B (Gibco – 15290) e 10µg/ml de Mitomicina C (e as células foram incubadas por 4 horas). Em seguida, foram lavadas três vezes com PBS e adicionado novo meio de cultivo contendo 1/1 de DMEN alta glicose (Gibco 11995-065) / F/12 (Gibco - 11765-054), contendo 20% SFB(soro fetal bovino), 1% aminoácidos essenciais (Sigma – B6766), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco – 11140), 0,1mM β-Mercaptoetanol (Sigma – M6250), 100UI/ml penicilina/100µg/ml streptomicina (Gibco 15140), 3µg/ml anfotericina B (Gibco – 15290).

6.2.4. - Obtenção Dos Embriões

Acompanhamento folicular e inseminação artificial

Foram utilizadas 15 éguas, em bom estado geral de saúde, com idades variando de 5 a 10 anos, massa corpórea entre 300 a 400Kg e com bom histórico reprodutivo. Esses animais foram mantidos em piquete com livre acesso a bebedouro coletivo, na fazenda experimental Edgárdia da UNESP, Campus Botucatu, bem como no departamento de Reprodução Animal da FMVZ da Unesp – Campus Botucatu.

Os animais tiveram a dinâmica folicular avaliada todo dia por palpação retal e ultrasonografia até o folículo dominante atingir 35mm de diâmetro; sendo neste momento administradas 2000 UI de hCG por via intravenosa, para indução da ovulação. Depois de detectado o momento próximo da ovulação e depois de ocorrida a ovulação, as fêmeas foram inseminadas duas vezes com dose refrigerada de 800×10^6 espermatozóides viáveis, em intervalos de 24 horas.

Coleta dos embriões

Os embriões foram coletados no oitavo dia após a segunda inseminação artificial das doadoras pela técnica não cirúrgica.

Após a identificação dos embriões com o auxílio de uma lupa estereoscópica, eles foram lavados 3 vezes em meio Vigro antes do isolamento da massa celular interna. Foram obtidos 30 embriões no estágio de blastocisto e blastocisto expandido.

6.2.5. - Isolamento da Massa Celular Interna

Os embriões foram colocados em uma gota contendo solução de Vigro para isolamento da massa celular interna (MCI), a qual foi isolada por microcirurgia, com auxílio de uma agulha de insulina (12,7 x 0,33 mm) ou de uma lâmina de bisturi tipo oftálmica, com o auxílio de um estereomicroscópio (aumento 10x), (Figura 2).

Após o isolamento, a MCI foi transferida para a placa com 6 poços previamente preparada com monocamada de fibroblastos e contendo meio de cultivo composto por: 1/1 de DMEN alta glicose (Gibco 11995-065) / F/12 (Gibco - 11765-054), contendo 20% SFB(soro fetal bovino), 1% aminoácidos essenciais (Sigma – B6766), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco – 11140), 0,1mM β -Mercaptoetanol (Sigma – M6250), 100UI/ml penicilina/100 μ g/ml streptomicina, 3 μ g/ml anfotericina B e 10ng/ml de LIF (L5158 – Sigma) e levadas para cultivo em estufa com 5% CO₂ em ar a 37°C e atmosfera úmida.

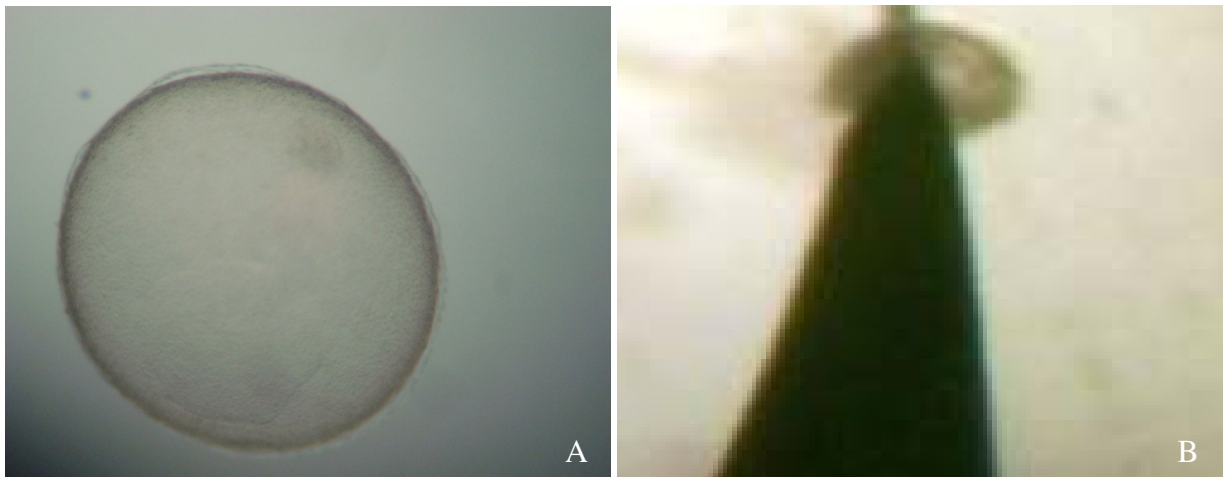


Figura 2 – Embrião equino com evidente botão embrionário (A), Separação da massa celular interna (B)

6.2.6. - Cultivo da Massa Celular Interna

O cultivo foi realizado em monocamada de suporte com fibroblastos equino (20×10^4 cels/ 1.9cm^2), utilizando meio de cultivo DMEM/F12 (Gibco®), suplementado contendo 20% SFB(soro fetal bovino), 1% aminoácidos essenciais (Sigma – B6766), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco – 11140), 0,1mM β -Mercaptoetanol (Sigma – M6250), 100UI/mL penicilina/100 $\mu\text{g/mL}$ streptomicina, 3 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B e 10ng/mL de LIF (L5158 – Sigma) em estufa com 5% CO_2 em ar a 37°C e atmosfera úmida.

O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias, e concomitantemente foi realizada a análise do cultivo avaliando-se a aderência da MCI, o crescimento e o aspectos morfológicos das células, utilizando-se o microscópio invertido com lentes objetivas de aumento 100, 200 e 400X (Figura 3).

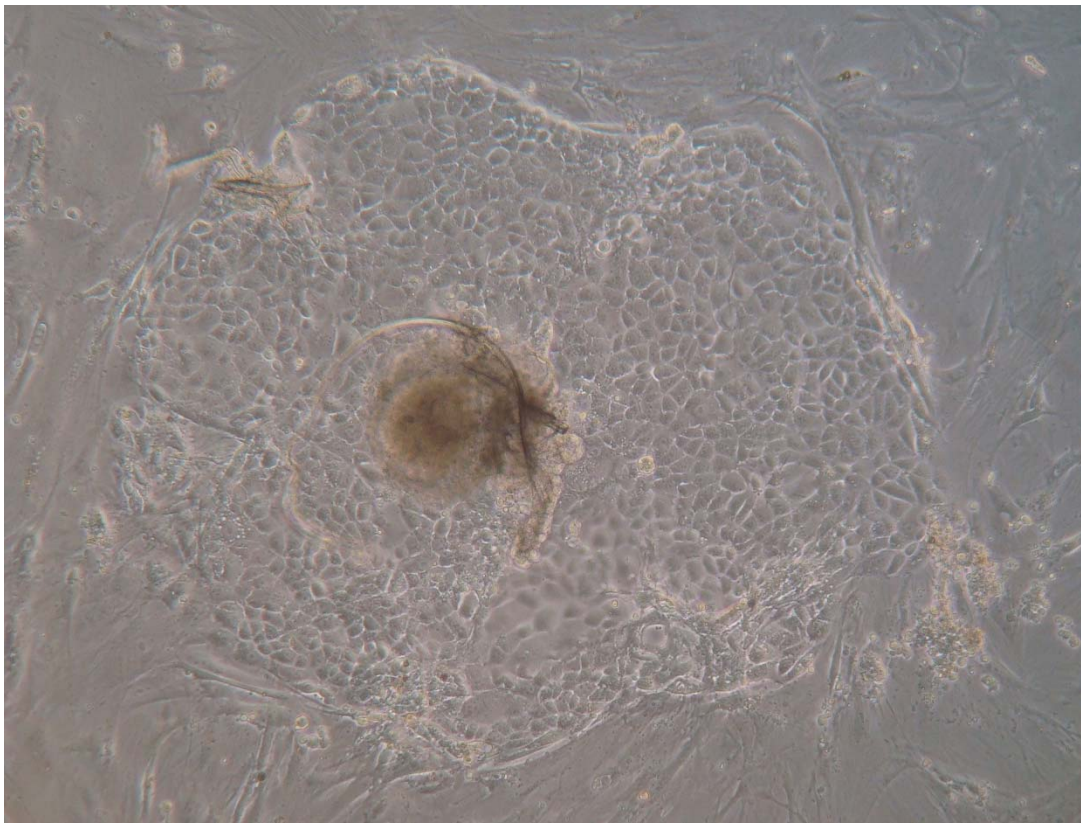


Figura 3 – crescimento da massa celular interna sobre camada de sustentação de fibroblasto equino bloqueada com mitomicina C (200x)

6.2.7. - Repique das Células-Tronco Embrionárias

Os botões embrionários que aderiram à placa de 6 poços e apresentaram multiplicação celular e desenvolvimento de colônias foram repicados mecanicamente com o auxílio de pipetas de vidro estéreis, lamina de bisturi oftálmica ou com auxílio de agulha de insulina sob o estereomicroscópio (aumento de 10X) em fluxo laminar. Cada colônia foi dividida em pequenos fragmentos os quais foram adicionados a novos poços, contendo meio de cultivo composto por DMEM/F12 (Gibco®), suplementado com 20% SFB, 1% aminoácidos essenciais (Sigma – B6766), 1% aminoácidos não essenciais (Gibco – 11140), 0,1mM β -Mercaptoetanol (Sigma – M6250), 100UI/mL penicilina/100 μ g/mL streptomina, 3 μ g/mL anfotericina B e 10ng/mL de LIF

(L5158 – Sigma), na concentração de 3 fragmentos por poço para formação de novas colônias (Figura 4).

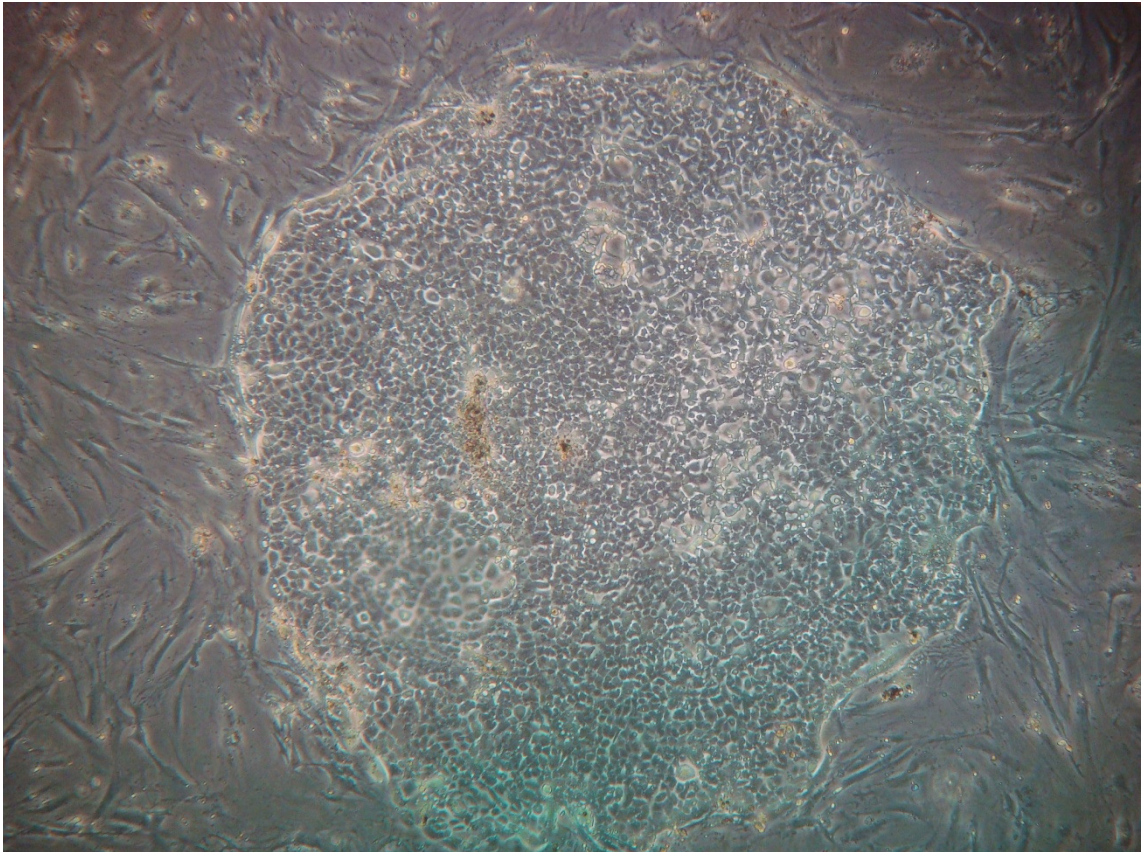


Figura 4 – colônia formada após repique (200x)

6.2.8. Caracterização das Células Tronco Embrionárias

A caracterização das células tronco embrionária foi constituída de marcação das células fixadas com anticorpos específicos para marcadores de pluripotência em células indiferenciadas.

Para a realização da marcação de caracterização foi utilizado o ES Cell Marker Kit (Chemicon – SCR002) composto pelos anticorpos: SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Oct-4 e o Nanog (AB-9220 – Chemicon). Para cada anticorpo foi padronizado a diluição de 1:50.

O paraformaldeído a 4% das células fixadas foi removido e essas lavadas 1 vez com PBS. Após este passo adicionou-se uma solução de permeabilização (0,1% Triton X-100, 1% SFB) por 10 minutos em temperatura ambiente, lavando as células 1 vez com PBS.

Após adicionada a solução de bloqueio (4% soro fetal bovino/PBS) por 30 minutos foram adicionados os anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As células foram então lavadas por três vezes em PBS e incubadas com o anticorpo secundário em uma diluição padrão de 1:100. Utilizou-se anticorpos secundário conjugado com FITC (DKYxMS – FITC – AP192F – Chemicon, GTxRAT – FITC – AP183F- Chemicon, DKYxRB – FITC-AP182F-Chemicon).

Depois deste período as células foram lavadas por 3 vezes com PBS e adicionado 500ul de PBS. Os resultados foram analisados observando 5 campos diferentes com o auxílio de microscópio de fluorescência invertido em aumento de 200x.

Tabela 1: Comparação (CTE Humano e Camundongo) de Especificidade dos Anticorpos - (Chemicon)

	SSEA-1	SSEA-3	SSEA-4	TRA-1-60	TRA-1-81	Oct-4
Hu ESC	–	+	+	+	+	+
Cam ESC	+	–	–	–	–	+

Legendas: + = positivo para imunomarcacão para o anticorpo

- = negativo para imunomarcacão para o anticorpo

6.2.9 - Diferenciação Celular

Diferenciação das Células Tronco Embrionárias em Linhagem Neurogênica

Para o teste de diferenciação das CTE em linhagem neurogênica, utilizou-se o Rodent Neuron Differentiation Kit (Chemicon – Cat. SCR035). CTE em placas com 6 poços (Sarstedt –83.1839.300) de cada cultivo em primeira e segunda passagem tiveram o meio de cultivo substituído por 1ml de meio indutor constituído por: DMEM/F12, suplementado com 20% SFB, 1% aminoácidos essenciais), 1% aminoácidos não essenciais, 0,1mM β -Mercaptoetanol, 100UI/mL penicilina/100 μ g/mL estreptomicina, 3 μ g/mL anfotericina B, 1 μ M/mL Ácido Retinóico (Solução Neural Indutor A - 500 μ M), 5 μ M/ml Forksolin (Neural Indutor B – 5mM) e 20ng/ml FGF-2.

O meio indutor foi trocado a cada dia, durante os 6 dias de diferenciação, e após este período as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% por 1 hora em temperatura ambiente.

Análise de Imunofluorescência da diferenciação para linhagem neurogênica

A confirmação da diferenciação das CTE para tecido neural consistiu de marcação das células fixadas com anticorpos específicos para linhagem neural.

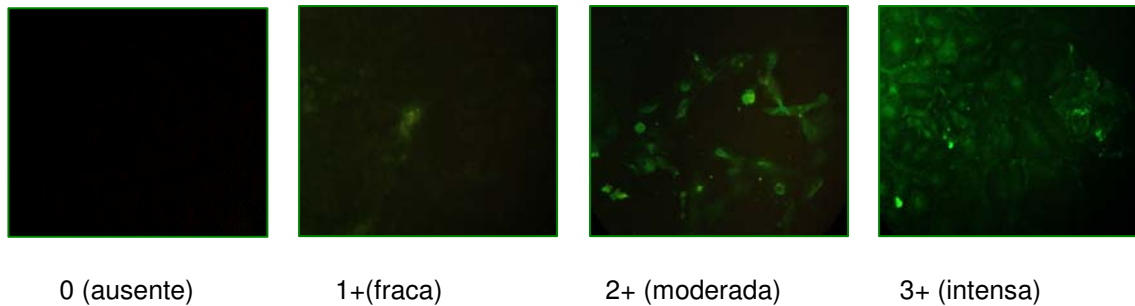
Para a realização da marcação da diferenciação, foi utilizado anticorpos: Mouse monoclonal anti-Beta III Tubulin, e Rabbit policlonal anti-GFAP, presentes no Rodent Neuron Differentiation Kit (Chemicon – Cat. SCR035). Para cada anticorpo utilizado foi padronizado uma diluição de 1:50.

Foi aspirado o paraformaldeído a 4% das células fixadas e essas foram lavadas 1 vez com PBS. Após a lavagem adicionou-se uma solução de bloqueio (0,1% Triton X-10, 1% SFB) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas 1 vez com PBS e adicionado o anticorpo primário na diluição padrão por 1 hora em temperatura ambiente. As células foram então lavadas por duas vezes em PBS e incubados por 1 hora com anticorpo secundário em uma diluição padrão de 1:100. Utilizou-se anticorpos secundário conjugado com FITC (DKYxMS – FITC – Ap192F – Chemicon, DKYxRB – FITC- Ap182F- Chemicon).

Depois deste período as células lavadas por 3 vezes com PBS e adicionado 500ul de PBS. Os resultados foram analisados observando 5 campos diferentes com o auxílio de um microscópio de fluorescência invertido em aumento de 200x.

6.2.10 - Análise da Intensidade de Marcação

A intensidade da marcação da expressão dos marcadores utilizados foi classificada pela utilização de escores considerando a emissão fluorescente avaliada sob microscopia de fluorescência com filtros de 450 a 490nm da seguinte forma: 0 (ausente), 1+(fraca), 2+ (moderada), 3+ (intensa).



6.2.11 - Metodologia estatística

No experimento para caracterização das CTE foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para análise do percentual de marcação.

No experimento de diferenciação das CTE para linhagem neurogênica foi utilizados o teste de Kruskal Wallis, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para comparar os dados dos escores dos marcadores utilizados, e o teste exato de Fisher, com nível de significância $\alpha = 0,05$ para análise do percentual de marcação.

6.3 - Resultados

6.3.1. - Caracterização das células tronco embrionárias

Os resultados do teste de caracterização das células tronco estão expressos na Tabela 2, Tabela 3, Figuras 5, 6, 7 e 8. A média e desvio padrão demonstra que os valores se aproximaram ao máximo da classificação de marcação 3+(intensa). Não houve diferenças nos valores percentuais de

marcação nos grupos que expressaram o marcador. Os marcadores Nanog, SSEA-3 e SSEA-4 não foram expressos.

Tabela 2: caracterização das células tronco embrionária

Analises Grupo	MCI Aderência/ Crescimento	Subcultivo Corpos Embríoides	Oct4	Nanog	SSEA-1	SSEA-3	SSEA- 4	TRA-1-60	TRA-1-81
01	3	3	3	0	3	0	0	3	3
02	3	3	3	0	3	0	0	3	3
03	3	3	3	0	3	0	0	3	3
04	3	0	3	0	3	0	0	3	3
05	3	3	2	0	3	0	0	2	3
06	3	3	3	0	3	0	0	2	3
07	3	3	3	0	3	0	0	3	2
08	3	0	3	0	3	0	0	3	3
09	3	3	2	0	3	0	0	3	3
10	3	0	2	0	3	0	0	2	2
11	3	3	3	0	3	0	0	3	2
12	3	3	3	0	3	0	0	2	2
13	3	3	3	0	3	0	0	2	3
14	3	0	3	0	3	0	0	2	3
15	3	0	3	0	3	0	0	2	2
16	3	3	3	0	3	0	0	3	2
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	3	3	2	0	3	0	0	3	3
19	3	3	3	0	3	0	0	2	2
20	3	0	2	0	3	0	0	2	2
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	3	3	3	0	3	0	0	2	3
23	3	3	3	0	3	0	0	3	3
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	3	3	3	0	3	0	0	3	2
26	3	3	2	0	3	0	0	2	2
27	3	0	3	0	3	0	0	2	3
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	3	3	3	0	3	0	0	3	2
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	2,5 ± 1,14	1,8 ± 1,49	2,3 ± 1,12	0	2,5 ± 1,137	0	0	2,1 ± 1,06	2,13 ± 1,07

Tabela 3: Porcentagem de colônias que aderiram a placa de cultivo e exibiram crescimento, bem como de células exibindo a marcação

Analises Grupo	MCI Aderência/ Crescimento	Subcultivo Corpos Embríoides	Aderência/ passagem	Oct4	SSEA-1	TRA-1-60	TRA-1-81
	83,33%(25/30)	60% (18/25)	72% (18/25)	25/30	25/30	25/30	25/30

Não foi encontrada diferença estatística pelo teste exato de Fisher (p>0,05).

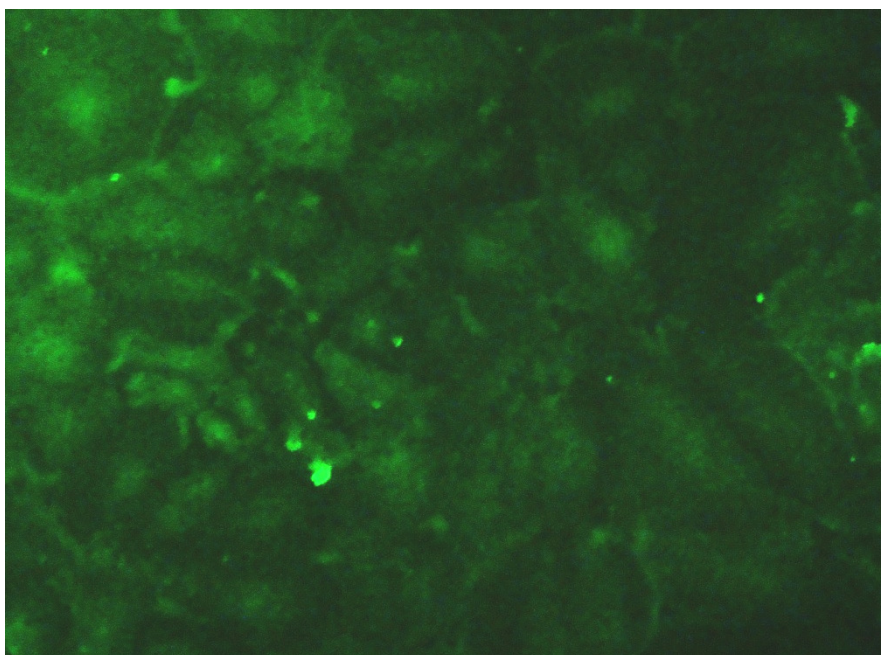


Figura 5 – marcação para o gene Oct4 (200x)

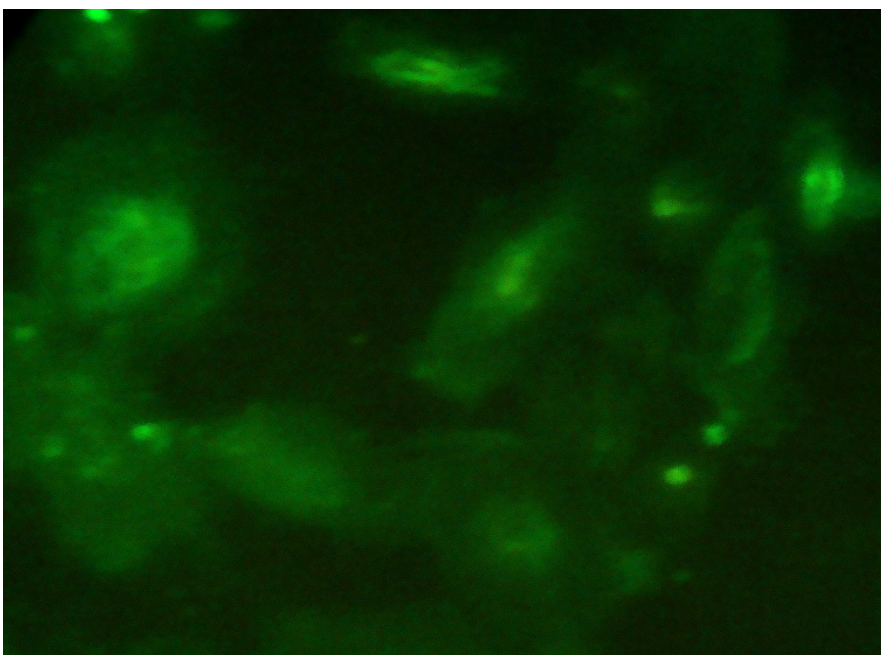


Figura 6 – marcação para o gene SSEA-1 (200x)

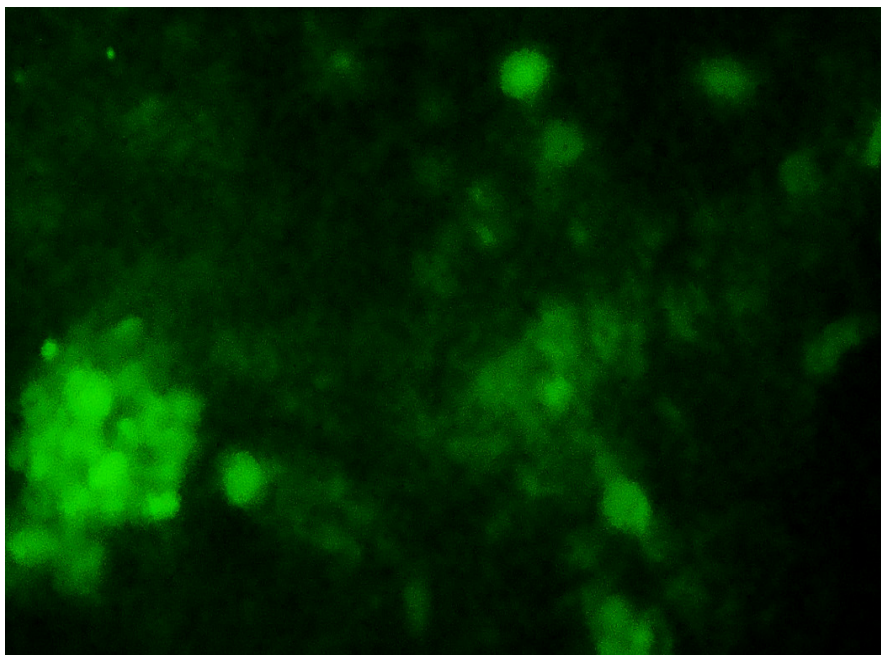


Figura 7 – marcação para o gene TRA-1-60 (200x)

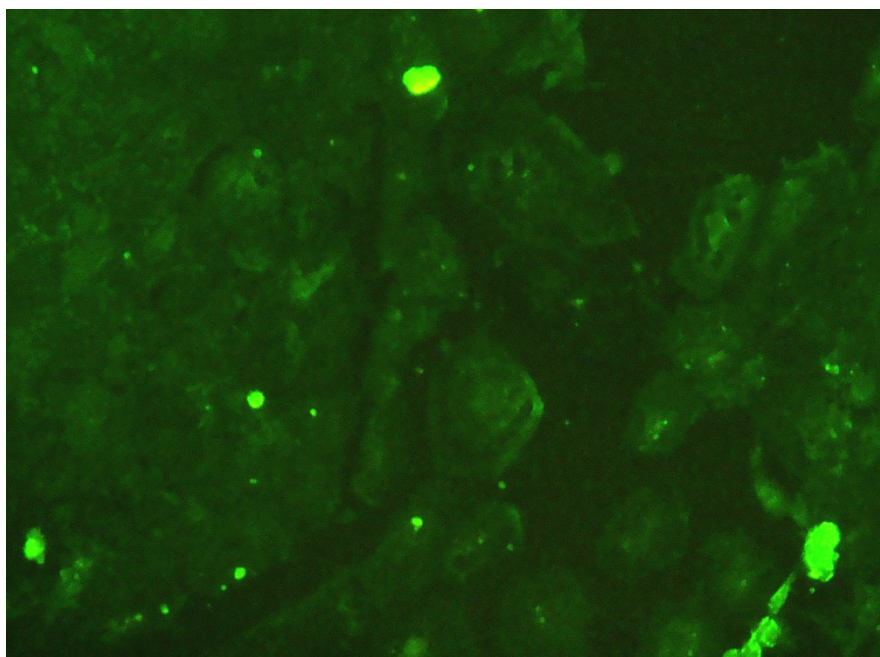


Figura 8 – marcação para o gene TRA-1-81 (200x)

6.3.2. - Diferenciação das Células Tronco Embrionárias

Os resultados da diferenciação das células tronco embrionária em linhagem neurogênica estão expressos na tabela 4, figura 9 e figura 10. Foram observadas diferenças significativas entre os momentos analisados, havendo uma alta expressão para o marcador β III-Tubulina quando comparados ao GFAP o qual não apresentou marcação significativa.

Tabela 4: Anticorpos utilizados na marcação da diferenciação celular em linhagem neurogênica

Grupo	Anticorpo	β III – Tubulina	GFAP
1		3	0
2		3	0
3		3	0
4		0	0
5		3	0
6		3	0
7		1	0
8		2	1
9		2	1
10		2	0
11		3	0
12		2	0
13		2	0
14		3	0
15		3	0
16		2	1
18		0	0
19		0	0
20		2	1
22		3	0
23		3	0
25		3	1
26		3	0
27		0	0
29		2	1
Total		$2,12 \pm 1,09^a$	$0,24 \pm 0,44^b$

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística no teste de Kruskal Wallis ($p < 0,001$).

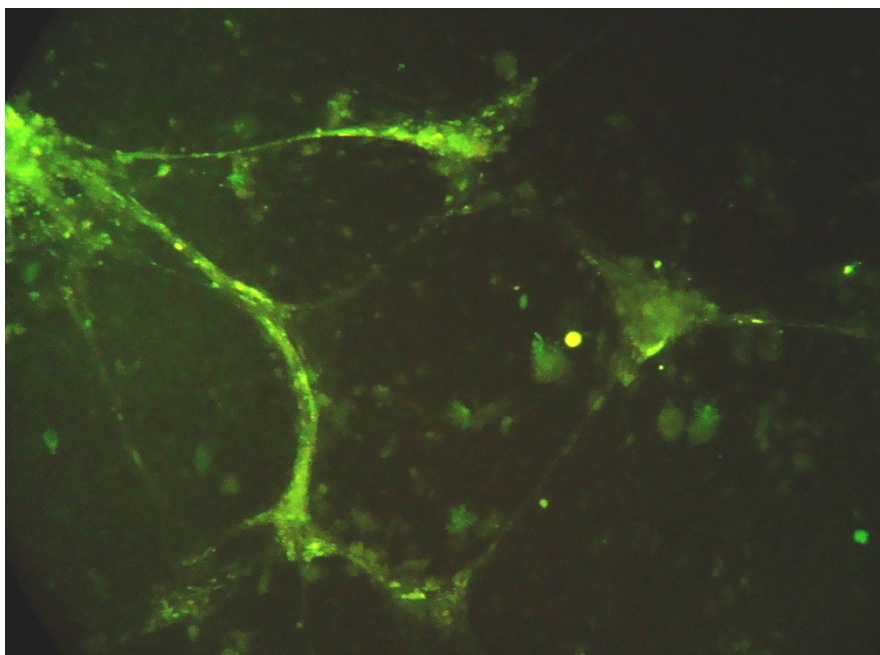


Figura 9 – marcação para o gene BIII-Tubulina (200x)

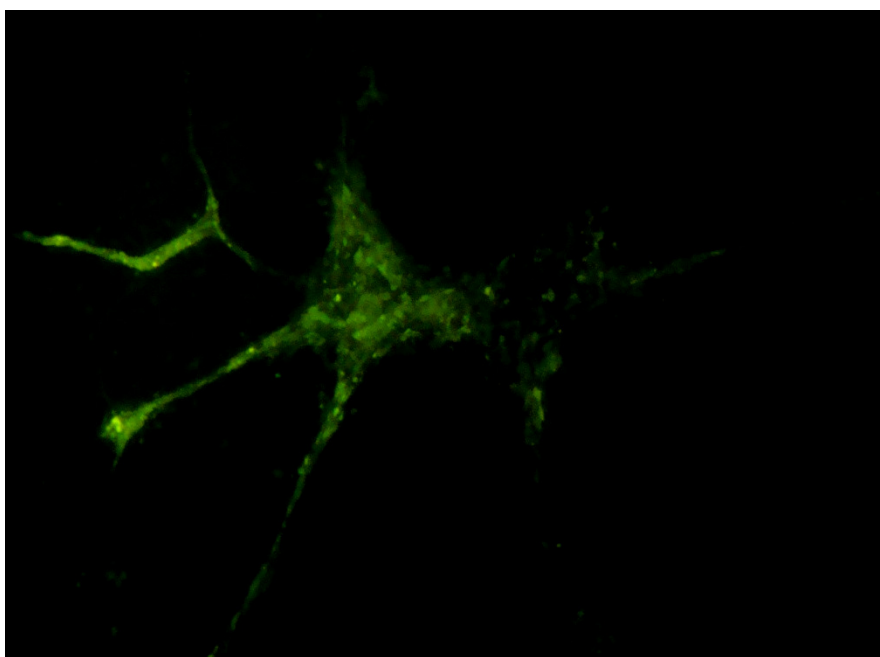


Figura 10 – marcação para o gene GFAP (200x)

6.4. - Discussão

Células tronco pluripotentes foram originalmente isoladas da massa celular interna de embriões de camundongos (EVANS e KAUFMAN, 1981) e humanos (THOMSON et al., 1998). Nos anos seguintes, têm se tornado cada vez mais evidente que os requisitos necessários para a caracterização, proliferação e manutenção de linhagens de CTE em outras espécies animais são diferentes daqueles necessários para camundongos e humanos.

Até hoje, já foram descritos na literatura o isolamento e caracterização parcial de 6 possíveis linhagens de CTE em eqüinos. Saito et al. (2002) dissecou microcirurgicamente MCI de embriões obtidos nos dias 6-7 após a ovulação, as quais foram cultivadas em meio α MEM suplementado com SFB e LIF. Duas das três (67%) MCI cultivadas proliferaram *in vitro* e apresentaram positividade para diversos marcadores de pluripotência incluindo o Oct4, o STAT-3, a fosfatase alcalina e o SSEA1. No estudo de Li et al. (2006) blastocistos obtidos no dia 8 após a ovulação foram dissecados por meio de imunocirurgia e cultivados em DMEM/F12 suplementado com SFB e LIF. Aproximadamente 33% (3/9) das MCI cultivadas originaram colônias semelhantes a CTE, sendo uma 4^o linhagem isolada em um estudo subsequente (Guest & Allen, 2007). No presente experimento um elevado número de embriões foi utilizado (n = 30) sendo que 60% (n = 18) das MCI isoladas aderiram ao fundo das placas de cultivo e resultaram na formação de colônias com características de CTE, as quais foram utilizadas para a marcação da pluripotência e indução da diferenciação.

O cultivo e padronização e uma linhagem nova de células tronco embrionária apresenta vários problemas e desafios. A maioria dos procedimentos utilizados no estabelecimento de linhagens de CTE de ungulados segue a metodologia desenvolvida para camundongos e humanos (MUÑOZ et al., 2008). No entanto, a extrapolação de dados obtidos para estas espécies tem com freqüência levado a produção de resultados insatisfatórios e atrasado os pesquisadores no estabelecimento dos mecanismos de controle da pluripotência nas espécies domésticas (MUÑOZ et al., 2008). Além disso, fatores relacionados ao tipo de meio, condições de cultivo, tempo para

aderência da massa celular, entre outros, bem como qualidade e características da monocamada de suporte precisam ser estabelecidos para cada uma das espécies estudadas. Neste experimento a MCI de embriões de eqüinos obtidos no 8º dia após a ovulação foram dissecadas microcirurgicamente e transferidas para placas de cultivo contendo fibroblastos eqüinos. A utilização da Mitomicina C para o bloqueio do ciclo celular foi um método eficaz e econômico se mostrando adequado para a preparação das células de sustentação. Apesar de alguns trabalhos (NIETO et al., 2007) demonstrarem que a Mitomicina C pode diminuir o tempo de vida das células de sustentação, não houve alterações nas características morfológicas da camada de sustentação e nem diminuição na adesão das células durante o período de cultivo.

Da mesma forma, a utilização do método mecânico no isolamento da massa celular interna foi eficaz. No entanto, este método apresenta a desvantagem do isolamento conjuntos de outros tipos celulares. No presente experimento foram utilizados embriões D8 para isolamento da MCI. Nesta fase de desenvolvimento o embrião eqüino já iniciou a formação da endoderme primitiva, portanto o cultivo das CTE pode estar contaminado tanto com células do trofoblasto como com células desta camada germinativa. Este fato tem sido descrito para outros ungulados, estando presente tanto em cultivos obtidos através de microcirurgia da MCI, como após o tratamento para imunocirurgia (KEEFER et al., 2007). É importante ressaltar que esta contaminação é mais evidente no cultivo primário uma vez que com a realização das passagens as células da massa celular interna acabam sendo selecionadas.

Os repiques realizados mecanicamente foram eficazes para a separação de células morfológicamente diferenciadas e linhagens uniformes semelhantes às CTE, como alta proporção núcleo/citoplasma, formato circular, células pequenas agregadas umas às outras. Em um experimento desenvolvido no mesmo laboratório foi realizada a comparação do repique mecânico com a digestão enzimática, sendo que a última se mostrou inadequada por desagregar excessivamente as colônias, as quais demoravam muito tempo para reiniciar o crescimento (LIMA NETO et al., 2009). Após o repique mecânico foi observada a formação de corpos embrióides nas novas placas bem como o aumento da multiplicação celular, atingindo a frequência de

um repique por semana. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura, tendo sido observado também por Saito et al. (2002) e por Li et al. (2006).

Neste experimento não foi realizado o teste para formação de teratomas, o que confirmaria a pluripotência das células cultivadas. Nos experimentos descritos anteriormente na literatura não foi observado a formação de teratomas quando as CTE de equinos foram injetados em camundongos imunossuprimidos (Saito et al., 2002 e Li et al., 2006). Segundo Paris e Stout (2010) este fato pode estar relacionado a condições sub-ótimas de cultivo, as quais levariam a perda da pluripotência nas linhagens cultivadas por longos períodos como nos experimento de Saito et al. (2002) e Li et al. (2006) que transferiram as CTE após 14 e 26 passagens. No presente experimento não foi realizado testes para obtenção de imortalidade da linhagem, limitando-se a somente duas passagens, sendo interessante, em um momento futuro, a realização do teste de formação de teratomas com CTE cultivadas por períodos mais curtos.

A presença da LIF (Fator inibidor de Leucemia) e da monocamada de fibroblastos durante o cultivo das células favoreceu a aderência da massa celular interna bem como a manutenção da pluripotência das CTE. Segundo a literatura CTE de camundongos são capazes de se manter indiferenciadas na ausência da LIF desde que cultivadas em presença da monocamada (BREVINI et al., 2008; GRIVENNIKOV, 2008). Por outro lado, nesta mesma espécie a pluripotência também pode ser mantida na ausência da monocamada de cultivo desde que seja adicionado ao cultivo celular a LIF e a BMP4 (GRIVENNIKOV, 2008). Já em humanos a pluripotência só pôde ser mantida nas CTE em presença de LIF, mesmo quando a monocamada de cultivo é utilizada, sendo que na ausência desta, é necessária também a adição de FGF2 e ativina (BREVINI et al., 2008). No presente experimento a adição de LIF foi utilizada a partir da aderência das MCI à monocamada de cultivo e sua retirada favoreceu a diferenciação para tecido neural. Estes dados estão de acordo com o revisado por Paris e Stout (2010) que relatam que a remoção da LIF e da monocamada do cultivo *in vitro* resulta na diferenciação espontânea das células com características de CTE eqüinas para células com

características de tecido neural (ectodermal), visceral (endoderma) e hematopoiético (mesoderma).

Uma das regras para caracterização de linhagens de CTE é que seu comportamento deve simular o que acontece naturalmente *in vivo* (KELLER, 2005). Desta forma a presença de marcadores de pluripotência expressos exclusivamente por células da MCI auxilia no processo de caracterização e estabelecimento de novas linhagens. Os marcadores SSEA1, SSEA3 e SSEA4 são marcadores de superfície associados com a pluripotência das células tronco, mas sua função precisa na manutenção da pluripotência ainda é desconhecida. O TRA-1-60 e o TRA-1-81 também são antígenos de superfície característicos de CTE, os quais não apresentam função exata conhecida (Paris et al., 2008). Por outro lado, o Oct4 e o Nanog, os quais têm uma função na manutenção da pluripotência já bastante conhecida, apresentam expressão restrita às células da MCI de embriões de camundongos, mas uma expressão variável em outras espécies animais (KIRCHHOF et al., 2000)

Os marcadores de pluripotência utilizados neste experimento na maior parte são reativos para humanos, ratos e camundongos, e devido à falta de marcadores específicos para a espécie eqüina, foram utilizados como indicadores de pluripotência na possibilidade de ocorrência de reação cruzada. As colônias cultivadas foram positivas para a expressão do SSEA-1, o qual é caracteristicamente expresso em CTE de camundongos. No entanto as CTE eqüinas cultivadas neste experimento foram negativas para a expressão do SSEA-3 e o SSEA-4, os quais são marcadores característicos de CTE humanas. Estes resultados estão de acordo com Saito et al.(2002) que conseguiram a expressão somente do SSEA-1, mas contrastam com Li et al.(2006) que obtiveram a expressão do SSEA-1 e do SSEA-4.

Ambos os antígenos marcadores de pluripotência TRA-1-60 e TRA-1-81 foram expressos pelas CTE em cultivo neste experimento, o que ocorreu de acordo com os resultados de Li et al.(2006) e Guest e Allen (2007) que conseguiu expressar os genes em estudos *in vitro*. O TRA-1-60 e TRA-1-81 são antígenos de superfície que reconhecem diferentes epitopes de uma glicoproteína comum, sendo expressos em CTE de humanos.

No presente experimento as células cultivadas foram positivas também para a expressão do gene Oct- 4, mas negativas na análise do gene Nanog.

Estes resultados diferem parcialmente dos obtidos anteriormente na literatura uma vez que de acordo com Guest e Allen (2007) células semelhantes à CTE eqüinas exibiram marcação positiva tanto para o Oct4 como para o Nanog. No entanto, no presente experimento não é possível afirmar que o material analisado realmente não expressou o gene Nanog, pois o marcador utilizado era específico para células tronco humanas, tendo sido possível a não ocorrência de reação cruzada.

Apesar de a literatura confirmar a expressão destes marcadores em linhagens semelhantes a CTE, existe uma discordância com relação ao sítio de expressão de cada um dos marcadores. Além disso a expressão dos genes podem variar entre as espécies, em camundongo o Oct4 e o Nanog é específico como marcador de pluripotência da massa celular interna, enquanto que a proteína Oct4 é expressa em ambas massa celular interna e trofotoderme em humanos, primatas, bovinos, caprinos e de suínos (KUIJK et al., 2008.; HARVEY et al., 2009).

A expressão diferente do Oct4 e do Nanog em ungulados parece estar relacionada a diferenças entre as espécies na regulação da pluripotência no início da segregação da linhagem, ao qual refletem diferenças no desenvolvimento embrionário. Em suínos e vacas, a expressão prolongada do Oct-4 no trofotoderma é importante durante o período de rápida proliferação deste durante o alongamento do trofoblasto nos dias 11 a 12 depois da fertilização (KUIJK et al., 2008). No eqüino o genoma do embrião é ativado por volta do estágio de 4 a 8 células durante o trânsito no oviduto (GRONDAHL e CYTTEL, 1996). Quando o embrião entra no útero, ao redor do D6, já existem sinais claros da separação entre MCI e trofoblasto, ocorrendo, ao redor do D8, a formação da endoderme primitiva (PARIS e STOUT, 2010). Embora o embrião eqüino não se alongue por estar contido dentro da capsula acelular, também nesta espécie acontece uma rápida proliferação do trofoblasto a partir do D7 (BETTERIDGE, 2007). De acordo com Hinrichs et al. (2008) em embriões eqüinos com idade entre 7 e 10 dias, produzidos *in vivo*, a expressão da Oct4 é mais forte na massa celular interna e fraca no trofoblasto. No presente experimento 85% das colônias cultivadas apresentaram marcação positiva para a Oct4. No entanto, este resultado não garante a pluripotência do material cultivado uma vez que em experimento prévio se observou a

marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-Oct4 tanto no trofoblasto como na MCI (Lima Neto et al., 2009). Situação similar a da Oct4, foi observada para as proteínas de pluripotência associados a marcadores de superfície SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 as quais foram expressas tanto na massa celular interna como no trofotoderma em blastocisto de 7 dias (Guest e Allen, 2007).

Paris et al. (2008) reportaram que, no eqüino, a expressão do mRNA para Oct4 diminui progresivamente durante a progressão de mórula para o blastocisto inicial, e deste para blastocisto expandido. Durante o desenvolvimento do blastocisto expandido no cavalo há um rápido aumento no numero de células de 160, na mórula, para mais que 2900, no blastocisto expandido, que ocorre predominantemente no trofotoderma. De acordo com Hinrichs et al. (2008) a expressão mais prolongada da Oct4 no trofotoderma em embriões eqüinos produzidos *in vitro* pode refletir um retardo no desenvolvimento que parece ocorrer em condições de cultivo. De acordo com os autores a proteína Oct4 foi encontrada em embriões eqüinos produzidos através de ICSI e cultivados *in vitro* com idade entre 7 e 10 dias. O interessante é que quando estes embriões foram transferidos para o útero de receptoras e coletados novamente a expressão do Oct4 desapareceu das células do trofoblasto (HINRICHS et al., 2008.; KIM et al., 2008). Estes resultados reforçam a hipótese de que o Oct4 não seria um bom marcador de pluripotencia na espécie eqüina, entretanto todos os marcadores utilizados até o momento, pelos diversos grupos de pesquisa, para pluripotência em células eqüinas são inadequados o que faz com que as células tronco embrionária eqüina ainda não tenham sido completamente caracterizadas (PARIS e STOUT, 2010).

No presente experimento não foi observada marcação para o gene Nanog. No entanto a ausência na literatura de trabalhos relacionados com a marcação das CTE eqüinas para o gene Nanog, bem como a ausência de marcadores específicos para o gene impossibilita uma conclusão a respeito da não expressão deste gene neste experimento.

Os resultados obtidos no presente experimento demonstraram que as células tronco embrionária eqüinas foram capazes de se diferenciar em tecido neural, além de expressarem o marcador quando expostas a condições

adequadas para diferenciação. Estes resultados demonstram a plasticidade que as células semelhantes a células tronco embrionária eqüinas possuem.

Muitos laboratórios e trabalhos reportam a capacidade que as CTE possuem em se diferenciarem em populações de células progenitoras neurais e células neurais. Segundo Hong et al. (2008) as CTE demonstram a capacidade de gerar precursoras neurais que podem se diferenciar em neurônios dopaminérgicos e motores quando são utilizados, como promotores, condições de cultura apropriadas ou manipulações genética.

A utilização do FGF-2 foi importante tanto na adesão e manutenção bem como na diferenciação das células tronco embrionária em linhagem neural. Pankratz et al. (2007) demonstraram que o FGF-2 é necessário para a formação das células neurais, sendo que a utilização de 20 ng/ml de FGF-2 durante 21 dias de experimento levaram as células a expressarem marcadores para células progenitoras neuroepiteliais e a continuação da diferenciação resultou em formação células com identidade de neurônios. Qi-long et al. (2003) também relataram que o processo de diferenciação das CTE em progenitoras neurais requer a utilização de FGF-2 e que, após a diferenciação, as progenitoras neurais podem ser purificadas para obtenção de uma população homogênea utilizando o sistema de separação por citometria de fluxo.

Os resultados do presente experimento demonstram maior expressão do marcador BIII-tubulina (neurônio) e menor expressão para o marcador GFAP (astrócitos), o que está de acordo Hong et al (2008) que demonstram que as CTE diferenciadas em progenitoras neurais, após adicionado promotores e fatores de crescimento, apresentam maior expressão para o marcador BIII-Tubulina e baixa expressão para o marcador GFAP e O4 (oligodendrócitos). Este resultado sugere que os componentes presentes no meio direcionam para o tipo de linhagem neural que se quer obter (astrócitos, oligodendrócitos ou neurônios), mas a resposta a eles é diferente para cada linhagem celular. O potencial que as CTE possuem em se diferenciar para linhagem neural também foi demonstrada por Roxana et al. (2006), que observou que as células além de se diferenciarem e expressarem marcadores para células neurais, se proliferaram sobre superfície de um material chamada "scaffolds", que serve como base para transplante.

CTE derivadas em progenitoras neurais e que expressam os marcadores genéticos neuroepiteliais possuem um potencial para diferenciação tanto *in vitro* como *in vivo* na geração de ambos os neurônios bem como células da glia. Neste experimento foi utilizado o ácido retinóico presente no kit indutor para diferenciação linhagem neural. Segundo Lang et al. (2004) o papel do ácido retinóico (AR) no processo de diferenciação neural não está estabelecido. A eficiência da diferenciação induzida pelo AR chega a 50-70% de células exibindo propriedades de células neurais ou gliais. Rathjen & Rathjen (2002) relataram que corpos embrióides tratados com AR formam populações neurais com características de células do tubo neural no embrião. Já Lang et al. (2004) relatam que neurônios formado via tratamento com AR podem ser funcionalmente competente e adquirir propriedades eletrofísicas e imunocitoquímicas. Transplantes em modelos animais de injúrias espinhal de CTE cultivadas por 4 dias sem AR seguidas por 4 dias com AR promoveu recuperações fenotípicas, indicando a capacidade para sobrevivência, integração e função *in vivo*.

O grande potencial das CTE equinas é oferecer tanto oportunidades para estudo de processos do desenvolvimento básico *in vitro*, bem como o desenvolvimento de novas drogas, modelos de doenças e uma possível terapia celular futura. Os protocolos para geração de células progenitoras neurais e neurônios representa um importante pré-requisito nestes estudos. Neste experimento demonstramos que as células tronco estudadas possuem capacidade necessária para diferenciação em linhagens neural, no entanto o conhecimento em relação a biologia básica do comportamento de ambas células tronco bem como das neurais, se faz de vital importância para que se possa entender melhor os mecanismos moleculares e celulares de diferenciação e de interação que as células possuem entre si, bem como a relação aos promotores utilizados, levando, em consequência, a um maior domínio sobre o potencial terapêutico que essas células possuem.

6.5. – Conclusão

- O protocolo adotado para o isolamento e cultivo foi eficaz na produção de colônias de células semelhantes a CTE em eqüinos.
- O padrão de expressão de marcadores de pluripotencia para CTE em equinos difere daqueles já estabelecidos para CTE humanas e de camundongo.
- O protocolo utilizado na diferenciação das células tronco embrionária foi eficaz na diferenciação para linhagem neurogênica, demonstrando o potencial de plasticidade que estas células possuem.
- Os marcadores utilizados na caracterização da diferenciação para linhagem neurogênica foram eficazes na identificação das linhagens celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUELFETOUH, A.; KONDOH, T.; EHARA, K.; KOHMURA, E. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after coculture with hippocampal slice. **Brain Res**, v.1029, p.114-119, 2004.

Abranches, et al. (2009

ALLEGRUCCI, C. AND YOUNG L.E. Differences between human embryonic stem cell lines **Human Reproduction Update**, Vol.13, p. 103–120, 2007.

ANKENY, D.P.; McTIGUE, D.M.; JAKEMAN, L.B. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, v.190, p.17-31, 2004.

AZIZI, S.A.; STOKES, D.; AUGELLI, B.J.; DIGIROLAMO, C.; PROCKOP, D.J. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. **Proc. Natl. Acad.**, v.95, p.3908-3913, 1998.

BENJAMIN E. R., MARTIN F. P., CHUI-YEE FONG, A. T., BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, **Nature Biotechnology**, v.18, p.398-404, 2000.

BETTERIDGE, K.J. Equine embryology: an inventory of unanswered questions. **Theriogenology**, v.68, p.9-21, 2007.

BIANCO, P; ROBEY, P.G. Marrow stromal stem cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v.105, p.1663-1668, 2000.

BOO, J.S.; YAMADA, Y.; OKAZAKI, Y.; HIBINO, Y.; OKADA, K.; HATA, K.; YOSHIKAWA, T.; SUGIURA, Y.; UEDA, M. Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells and a Biodegradable Scaffold. **Journal of Craniofacial Surgery**, v.13, p.231-239, 2002.

BREVINI, T. A. L.; TOSETTI, V.; CRESTAN, M.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v.67, p.54-63, 2007.

BREVINI, TAL.; ANTONINI, S.; PENNAROSSA, G.; GANDOLFI, F. Recent progress in embryonic stem cell research and its application in domestic species. **Reprod Domest Anim**, v.43, p.193-199, 2008.

CAPLAN, A.I. ; BRUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **Trends in Molecular Medicine**, v.7, p.259-264, 2001.

CAUFFMAN G, VAN DE VELDE H, LIEBAERS I, VAN STEIRTEGHEM A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development **Molecular Human Reproduction** v.11(3),p.173-81, 2005.

CHAMBERS I, COLBY D, ROBERTSON M, NICHOLS J, LEE S, TWEEDIE S, SMITH A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.**Cell**. v.30, p.643-55. 2003.

CHOPP, M. and LI, Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. **Lancet Neurol.**, v.1, p.92-100, 2002.

CIBELLI, J.B.; GRANT, K.A.; CHAPMAN, K.B.; CUNNIF, K.; WORST, T.; GREEN, H.L.; WALKER, S.J.; GUTIN, P.H.; VILNER, L.; TABAR, V.; DOMINKO, J.K.; WETTSTEIN, P.J.; LANZA, R.P.; STUDER, L.; VRANA, K.E.; WEST, M.D. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. **Development**, v.295, p.819, 2002

COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.; LIU, P.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. **Experimental Hematology**, v. 36, p. 93-103, 2008.

CORTEZ J.L., L. SÁNCHEZ, P. CATALINA, F. COBO, C. BUENO, A. MARTÍNEZ-RAMIREZ, A. NIETO; P. MENENDEZ. Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. **Stem Cells And Development** v.17, p.255–267, 2008.

CORTI, S.; LOCATELLI, F.; PAPADIMITRIOU, D.; STRAZZER, S.; COMI, G.P. Somatic stem cell research for neural repair: current evidence and emerging perspectives. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.8, p.329-337, 2004.

COWAN, C A; KLIMANSKAYA, I; MCMAHON, J; ATIENZA, J; WITMYER, J; ZUCKER, J P; WANG, S P; MORTON, C C; MCMAHON, A P; POWERS, D; MELTON, D.A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts **Journal. New England Journal of Medicine**, v.350 (13):p.1353-1356, 2004.

DAHERON, L.; OPITZ, S.L.; ZAEHRES, H.; LENSCH, W.M.; ANDREWS, P.W.; ELDOR-ITSKOVITZ, J.; DALEY, G.Q. LIF/STAT3 Signaling Fails to Maintain Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. **STEM CELLS**, v.22, p.770-778, 2004.

DARR H, MAYSHAR Y, BENVENISTY N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. **Development**. V.133(6): p.1193-201, 2006.

DICTUS, C.; TRONNIER, V.; UNTERBERG, A.; HEROLD-MENDE, C. Comparative analysis of in vitro conditions for rat adult neural progenitors cells. **J. Neurosci Methods**, v.161, p.205-258, 2007.

DIREKZE, N.C. ; FORBES, S.J. ; BRITTAN, M. ; HUNT, T. ; JEFFERY, R. ; PRESTON, S.L. ; POULSON, R. ; HODIVALA-DILKE, K. ; ALISON, M.R. ; WRIGHT, N.A. Multiple organ engraftment by bone marrow derived

myofibroblasts and fibroblasts in bone marrow transplanted mice. **Stem Cells**, v.21, p.514-520, 2003.

DONOVAN, J.P. and GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, p. 399-405, 2001.

ECKFELDT, C.E.; MENDENHALL, E.M.; VERFAILLIE, C.M. The molecular repertoire of the "almighty" stem cell. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.6, p.726-737, 2006.

ELLERSTRÖM C; STREHL R; MOYA K; ANDERSSON K; BERGH C; LUNDIN K; HYLLNER J; SEMB H. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. **Stem Cells**. v: 24(10),p. 2170-6, 2006.

EVANS, M.J. ; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v.292, p.154-6, 1981.

FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary surgery**, v. 34, p. 415-423, 2005.

FORTIER, L.A.; SMITH, R.K. Evidence for stem cells in cartilage regeneration. **Proc. 53th AAEP**, Orlando, v. 53, p. 329-334, 2007.

FRIEL, E.; SAR, S.; MEE, J.P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Advanced Drug Delivered Reviews**, Vol 57, 1894-1903, 2005.

FU, L.; ZHU, L.; HUANG, Y.; LEE, T.D.; FORMAN, S.J.; SHIH, C.C. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. **Stem Cells Dev.**, v.17, p.1109-1121, 2008.

GIORGETTI, A.; MONTSERRAT, N.; RODRIGUEZ-PIZA, I.; AZQUETA, C.; VEIGA, A.; IZPIS, J.C. Generation of induced pluripotent stem cells from human Cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2. **Nature Protocols**, v.5, p.811-820, 2010.

GOODWIN, H.S.; BICKNESE, A.R.; CHIEN, S-N.; BOGUCKI, B.D.; OLIVER, D.A.; QUINN, C.O.; WALL, D.A. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat and neural markers. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.7, p.581-588, 2001.

Grivennikov, I.A. Embryonic stem cells and the problem of directed differentiation. **Biochemistry**, v.73, p.1438-1452, 2008.

GRONDAHL, C. and CYTTEL, P. Nucleogenesis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos. **Biol Reprod**, v.55, p.769-774, 1996.

GUARITA-SOUZA, L.C.; CARVALHO, K.A.T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J.L.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, R.; FARIA-NETO, J.R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio **Braz. J. Cardiovasc. Surg.**, v.20 (3), p. 270-278, 2005.

GUEST, D.J. and ALLEN, W.R. Expression of cell-surface antigens and embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells Dev**, v.16, p.789-796, 2007.

GUILLOT, P.V.; GOTHERSTROM, C.; CHAN, J.; KURATA, H.; FISK, N.M. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. **Stem Cells**, v.25, p.646-654, 2007.

HARVEY, A.J.; ARMANT, D.R.; BAVISTER, B.D.; BRENNER, C.A. Inner cell mass localization of NANOG precedes OCT3/4 in rhesus monkey blastocysts. **Stem Cells Dev.**, v.18, p.1451-1458, 2009.

HATANO, S.; TADA, M.; KIMURA, H.; YAMAGUCHI, S.; KONO, T.; NAKANO, T.; SUEMORI, H.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Pluripotential competence of cells

associated with Nanog activity. **Mechanisms of Development**, v. 122, p. 67-79, 2005.

HE, S.; PANT, D.; SCHIFFMACHER, A.; BISCHOFF, S.; MELICAN, D.; GAVIN, W.; KEEFER, C. Developmental expression of pluripotency determining factors in caprine embryos: novel pattern of nanog protein localization in the nucleolus **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 1512-1522, 2006.

HEIDERSBACH, A.; GASPAR-MAIA, A; MCMANUS1, MT; RAMALHO-SANTOS M. RNA interference in embryonic stem cells and the prospects for future therapies. **Gene Therapy**, 13, 478–486,2006.

HEINS, N; ENGLUND, MCO; SJOBLUM, C; DAHL, U; TONNING, A; BERGH, C; LINDAHL, A; HANSON, C; SEMB, H Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells **Stem Cells**, v. 22 (3):p. 367-376, 2004.

HINRICHS, K.; CHOI, H.D.; HARDING, H.D.; OBERMILLER, A.D.; HARTMAN, D.L. OCT-4 expression in vivo and in vitro produced equine blastocysts. **In: Abstract Book for the Havemeyer Foundation 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge**, p.46, 2008.

HOFFMAN, L.M.; CARPENTER, M.K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 23,p.699–708, 2005.

HOMBACH-KLONISCH, S. ; PANIGRAHI, S. ; RASHEDI, I. ; SCIFERT, A. ; ALBERTI, E. POCAR, P. ; KURPISZ, M. ; SCHULZE-OSTHOFF. ; MACKIEWICZ, A. ; LOS, M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential – perspectives and therapeutic applications. **J. Mol. Med.**, v.86, p.1301-1314, 2008.

HONG, S.; KANG, U.J. ISACSON, O.; KIM, KS. Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v.104, p.316-324, 2008.

HYSLOP, L., STOJKOVIC, M., ARMSTRONG, L., WALTER, T., STOJKOVIC,P., PRZYBORSKI, S., HERBERT, M., MURDOCH, A., STRACHAN, T., AND LAKO, M.. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. **Stem Cells**, v. 23: 1035–1043. 2005.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N; REINHARDT, R.L.; SCHWARTZ, R.E.; DEENE, D.; ORTIZ-GONZALEZ, X.R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW. W.C.; LARGAESPADA, D.A.; VERFAILLIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v.418, p.41-49, 2002.

KATHELEEN, P.F. Bone marrow evaluation.. In. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Shalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lippencott Williams and Wilkins, cap. 5, p. 29-32, 2000.

KEEFER, C.L.; PANT, D.; BLOMBERG, L.; TALBOT, N.C. Challenges and prospects for the establishment of embryonic stem cell lines of domesticated ungulates. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.147-168, 2007.

KELLER, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. **GENES & DEV.**, v.19, p.1129-1155, 2005.

KIM, D.W.; CHUNG, S.; HWANG,M.; FERREE, A.; TSAI, H.C.; PARK, J.J.; NAM, T.S. KANG, U.J.; ISACSON, O.; KIM, K.S. Stromal cell derived inducing activity, Nurr1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v.24, p.557-567, 2006.

KIM, J.; CHU, J.; SHEN, X.; XANG, J.; ORKN, SH. An extended treanscriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. **Cell**, v.132, v.1049-1061, 2008.

KIRCHHOF, N., J.W. CARNWATH, E. LEMME, K. ANASTASSIADIS, H. SCHÖLER AND H. NIEMANN. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction** v.63(6), p.1698-1705, 2000.

KOCH, T.G., HEERKENS, T., THOMSEN, P.D., BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **BMC Biotechnology**. V.7, p.26, 2007.

KOERNER, J., NESIC, D., ROMERO, J. D., BREHM, W., MAINIL-VARLE, P., GROGAN, S. P. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, V. 24, p.1613 - 1619, 2006.

KRABBE, C.; ZIMMER, J.; MEYER, M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells – a critical review. **APMIS**, v.113, p.831-844, 2005.

KUIJK, E.W.; DU, PUY L.; VAN, TOL HTA.; OEI, CHY, HAAGSMAN HP.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, BAJ. Differences in early lineage segregation between mammals. **Dev Dyn**, v.237, p.918-927, 2008.

LANG, K.J.D.; RATHJEN, J.; VASSILIEVA, S.; RATHJEN, P.D. Differentiation of embryonic stem cells to a neural fate: a route to re-building the nervous system? **Journal of Neuroscience Research**, v.76, p.184-192, 2004.

LI ,X; ZHOU, S.G; IMREH, M.P, ALLEN, W.R . Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells Development** v.15, p. 523–53.2006.

LIMA-NETO, J.F. ; DORES, C.B. ; ARAUJO, G.H.M. ; WODEWOTZKY, T.I. ; MOYA-ARAJO, C.F. ; RASCADO, T.S. ; MACEDO, C.C. ; ALVARENGA, M.A. ; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Comparison of two subculturing methods for equine embryonic stem cells. **7th Annual Meeting – International Society for Stem Cell Research (ISSCR)**, p.199-200, 2009.

LIN, T. ; CHAO, C. ; SAITO, S. ; MAZUR, S. ; MURPHY, M. ; APPELLA, E. ; XU, Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. **Nature Cell Biology**, v.7, p.165-171, 2004.

LU, P. ; BLESCH, A. ; TUSZYNSKI, M.H. Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons : Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact ? **Journal of Neuroscience Research**, v.77, p.174-191, 2004.

MA, LI.; SUN, B.; HOOD, L.; TIAN, Q. Molecular profiling of stem cells. **Clinica Chimica Acta**, v.378, p.24-32, 2007.

MALINOWSKI, K.; PULLIS, C.; RAISBECK, A.P.; RAPAPORT, F.T. Modulation of human lymphocyte marker expression by gamma irradiation and mitomycin C. **Cellular Immunology**, v. 143, p. 368-377, 1992

MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; YAGI, R. TAKAHASHI, K. Pluripotency governed by *Sox2* via regulation of *Oct3/4* expression in mouse embryonic stem cells. **NATURE CELL BIOLOGY**, Vol. 6, no. 6, 2007.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MIMEAULT, M. and BATRA, S.K. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells**, v.24, p.2319-2345, 2006.

MINAMI, M.; INOUE, M.; WEI, S.; TAKEDA, K.; MATSUMOTO, M.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. STAT 3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid leukemia cell line. **Prooc. Nat. Acad. Sc. USA**, v. 93, p. 3963-3966, 1996.

MINGRONI-NETTO, R.C.; DESSEN E.M.B. Células-tronco: o que são e o que serão? **Genética na Escola**. Revista on line. Sociedade Brasileira de Genetica, v. 1, 2006.

MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ, C.; DE FRUTOS, C.; CAAMAÑO, J.N.; DÍEZ, C.; FACAL, N.; GÓMEZ, E. Conventional pluripotency markers are unspecific for bovine embryonic-derived cell-lines. **Theriogenology**, v. 69, p. 1159-1164, 2008.

NEUHUBER, B.; GALLO, G.; HOWARD, L.; KOSTURA, L.; MACKAY, A.; FISCHER, I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of action cytoskeleton induces rapi morphological changes and mimics neuronal phenotype. **Jornal of Neuroscience Research**, v.77, p.192-204, 2004.

NIETO A., CABRERA C.M., CATALINA P., COBO F., BARNIE A., CORTÉS J.L, BARROSO DEL JESUS A., MONTES R.AND CONCHA A. Effect of mitomycin-C on human foreskin fibroblasts used as feeders in human embryonic stem cells: Immunocytochemistry MIB1 score and DNA ploidy and apoptosis evaluated by flow cytometry **Cell Biology International**, V. 31, p. 269-278,2007.

NIWA, H., BURDON, T., CHAMBERS, I., AND SMITH, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Development** v.12, p.2048–2060,1998.

NIWA, H., MIYAZAKI, J., AND SMITH, A.G.. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**. 24, 372–376, 2000.

OLIVEIRA, G.K. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 62, p.72-79, 2010.

PALMQVIST, L.; GLOVER, C. H.; HSU, L.; LU, M.; BOSSEN, B.; PIRET, J.M.; HUMPHRIES, R. K.; HELGASON, C. D. **Stem cells**, v. 23, p. 663-680, 2005.

PANKRATZ, M.; JUN LI, X.; LAVAUTE, T.M.; LYONS, E.A.; CHEN, X.; ZHANG, SU-CHUM. Directed neural differentiation of human embryonic stem cells via an obligated primitive anterior stage. **Stem Cells**, v.25, p.1511-1520, 2007.

PARIS, D.B.B.P.; KUIJK, E.W.; ROELEN, B.A.J.; STOUT, T.A.E. Developmental changes in expression of pluripotent genes in early equine embryos. **Reprod Ferti Dev**, v.21, p.239, 2008.

PARIS, D.B.B.P.; STOUT, T.A.E. Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency. **Theriogenology**, v.74, p.516-524, 2010.

PARK, J.H.; KIM, S.J.; OH, E.J.; MOON, S. Y.; ROH, S. I.; KIM, C.G.; YOON, H.S. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 2007-2014, 2003.

PARK, I.H., ZHAO, R., WEST, J.A., YABUUCHI, A., HUO, H., INCE, T.A., LEROU, P.H., LENSCH, M.W., AND DALEY, G.Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**. v.451, p.141–146, 2008.

PARK, DH.; EVE, D.J.; MUSSO, J. KLASKO, S.K.; CRUZ, E.; BORLONGAN, C.V.; SANBERG, P.R. Inflammation and Stem Cell Migration to the Injured Brain in Higher Organisms. **Stem Cells and Development.**, v.18, 2009.

PEDERSEN, R.A. Feeding hungry stem cells. **Nature**, v. 20, p. 882-883, 2002.

PERIN, E.C.; DOHMANN, H.F.R.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S.A.; SILVA, G.V.; et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v.119, p.213-218, 2004.

PITTENGER, M.F. ; MACKAY, A.M. ; BECK, S.C. ; JAISWAL. R.K. ; DOUGLAS, R. ; MOSCA, J.D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-7, 1999.

QI-LONG, YING.; MARIOS STAVRIDIS.; DEAN GRIFFITHS.; MENG LI.; AUSTIN SMITH. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. **Nature Biotechnology**, v.21, p.183-186, 2003.

RATHJEN, J.; RATHJEN, P.D. Formation of neural precursor cell populations by differentiation of embryonic stem cells in vitro. **Scientific World J.**, v.2, p.690-700, 2002.

RICHARDSON, L.E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P.D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends Biotechnol**, v.25, p.409-416, 2008.

ROXANA, N.; NILBRATT, M.; NARKILAHTI, S.; WINBLAD, B.; HOVATTA, O.; NORDBERG, A. Neurogenic neuroepithelial and radial glial cells generated from six human embryonic stem cell lines in serum-free suspension and adherent cultures. **Glia**, v.55, p.385-399, 2006.

ROY A, KRZYKWA E, LEMIEUX R, NÉRON S. Increased efficiency of gamma-irradiated versus mitomycin C-treated feeder cells for the expansion of normal human cells in long-term cultures. **Journal Hematotherapy and Stem Cell Research**, v.10(6), p.873-80, 2001.

SAITO, S., UGAI,H.; SAWAI,K., YAMAMOTO, Y., Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **FEEBS Letters**, v.531, p. 389-396, 2002.

SAITO, S.; SAWAI, K.; UGAI, H.; MORIYASU, S.; MINAMIHASHI, A.; YANAMOTO, Y.; HIRAYAMA, H.; KAGEYAMA, S. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 104-113, 2003.

SANBERG, P.R.; et al. Umbilical cord blood derived stem cells and brain repair. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v.1049, p.67-83, 2005.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S.; CARDOZO-PELAEZ, F.; HAZZI, C.; STEDEFORD, T.; WILLING, A. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. **Exp Neurol**, v.164, p.247-256, 2000.

SCHNABEL L.V. AND FORTIER L.A. Células tronco, teoria e aplicações práticas em tendões e articulações. **Anais da XI Conferencia Anual da ABRAVEQ (São Paulo, SP, Brasil)**, v. 29, p: 34-37. 2010.

SCHOLER, H.R., Octamania: the POU factors in murine development. **Trends Genetics** v.7, p. 323–329, 2001.

SCHULDINER M.; YANUKA O.; ITSKOVITZ-ELDOR,J.; MELTON D. A.; BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **PNAS** , vol. 97, no. 21, 11307–11312, 2000.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? **Br. J. Sports Med.** v. 39 (9), p. 582-584, 2005.

SOLTER, D AND KNOWLES, B.B. Immunosurgery of mouse blastocyst. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.72 (12):p.5099-102,1975.

SUZUKI, D.E.; PEREIRA, M.C.L.; JANJOPPI, L.; OKAMOTO, O.K. Stem and progenitor cells from the central nervous system: basic aspects and clinical relevance. **Einstein**, v.6, p.93-96, 2008.

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

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J. ; SHAPIRO, S.S. ; WAKNITZ, M.A. ; SWIERGIEL, J.J. ; MARSHALL, V.S. ; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, p.1145-7, 1998.

TOMASZ, M.; LIPMAN, R.; CHOWDARY, D.; PAWLAK, J.; VERDINE, G.L.; NAKANISHI, K. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. **Science**, v. 235, p. 7212-7220, 1987.

TONDREAU, T.; LAGNEAUX, L.; DEJENEFFE, M.; MASSY, M.; MORTIER, C.; DELFORGE, A. Bone marrow derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. **Differentiation**, v.72, p.319-326, 2004.

TONDREAU, T.; MEULEMAN, N.; DELFORGE, A.; DEJENEFFE, M.; LEROV, R.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. Mesenchymal Stem Cells Derived from CD-133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and cord Blood: Proliferation, Oct-4 Expression, and Plasticity. **Stem Cells**, v.23, p.1105-1112, 2005.

UCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.726-736, 2008.

UNGER, C.; SKOTTMAN, H.; BLOMBERG, P.; SIRAC DILBER, M.; HOVATTA, O. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. **Human Molecular Genetics**, v.17, p.48-53, 2008.

VELJSTED, M. DU, Y.; VATJA, G.; MADDOX-HYTTEL, P. Post-hatching development of the porcine and bovine embryos-defining criteria for expected development in vivo and in vitro. **Theriogenology**, v. 65, p. 153-165, 2006.

VENDRAME, M. Anti-inflammatory Effects of Human Cord Blood Cells in a Rat Model of Stroke. **Stem Cells and Development**, v.14, p.595-604, 2005.

VIDAL, M.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. **Veterinary Surgery**, v.7, p.613-622, 2007.

WANG, L.; LI, L.; MENENDEZ, P.; CERDAN, C.; BHATIA, M. Human embryonic stem cells maintained in the absence of mouse embryonic fibroblasts or conditioned media are capable of hematopoietic development. **Blood**, v. 105, p. 4598-4603, 2005.

WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. Embryonic stem cells: prospects for development biology and cell therapy. **Physiological Review**, v. 85, p. 635-678, 2005.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I.B. Adult Bone Marrow Stem Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis. **Journal of Neuroscience Research**, v.96. p.908-917, 2002.

YUAN, H., CORBI, N., BASILICO, C., AND DAILEY, L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the syneraction of Sox2 and Oct-3. **Genes Development**, v.9, p. 2635–2645, 1996.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-Tronco: a Nova Fronteira da Medicina. 1.ed. Atheneu, 2006. 245p.