

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/07/2018.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO INDUZIDO E
ESPONTÂNEO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
ORIUNDAS DE TECIDO ADIPOSEO E MEDULA ÓSSEA DE
EQUINOS (*Equus caballus*)

ELAINE CRISTINA GALHARDO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2016**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO INDUZIDO E ESPONTÂNEO
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ORIUNDAS DE
TECIDO ADIPOSEO E MEDULA ÓSSEA DE EQUINOS
(*Equus caballus*)

ELAINE CRISTINA GALHARDO

ORIENTADORA: Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

CO-ORIENTADOR: Dr. Leandro Maia

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Estrutural e Funcional.

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

**BOTUCATU – SP
2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Galhardo, Elaine Cristina.

Potencial de diferenciação induzido e espontâneo de células tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo e medula óssea de equinos (*Equus caballus*) / Elaine Cristina Galhardo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Coorientador: Leandro Maia

Capes: 20601000

1. Terapia celular. 2. Morfologia. 3. Células-tronco. 4. Células da medula óssea. 5. Tecido adiposo.

Palavras-chave: Morfologia; Stem cells; Terapia Celular.

“Se as coisas são inatingíveis...ora! Não é motivo para não querê-las...

Que tristes os caminhos, se não fora

A presença distante das estrelas!”

(Mário Quintana)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha amadíssima avó Malvína Maria da Conceição, que nos deixou há alguns dias. Dedico também à minha família, em especial ao meu pai, José Benedito Galhardo, à minha mãe, Teresinha Francisco Galhardo e irmã Érika, meus maiores apoiadores e incentivadores durante toda a vida. À minha amada avó paterna, Joaquina Guedes Galhardo (in memoriam), e ao meio tio Jair Galhardo, que me auxiliou a dar um importante passo na vida, e à todos os antepassados que construíram minha história.

Minha vitória é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente...

Eterna gratidão à minha orientadora, Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim, pela confiança em mim depositada, por todo apoio, disponibilidade e atenção;

A toda equipe do Laboratório LANÇA, em especial às colegas e amigas Carolina Serrano, Isadora Arruda, Bruna De Vita e ao co-orientador, Dr. Leandro Maia;

Ao Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, em especial aos técnicos Edvaldo, Felipe e Evandro, e ao secretário Edilson;

Ao Departamento de Clínica Veterinária, em especial à querida colega Danielle Jaqueta Barberini, por todo suporte prestado, e ao Prof. Dr. Rogério Amorim, por ceder os animais deste estudo;

À cara colega Josiane Lourenção e à Prof. Noeme Rocha do Departamento de Patologia Veterinária, pelo equipamento emprestado e disponibilidade em ajudar;

A equipe do Departamento de Genética do IBB, em especial à Prof. Dra. Lígia Mota e à Técnica Valquíria Santilóni, que tanta força me deram para o ingresso na Pós-Graduação e por todo apoio e parceria prestados ao longo do experimento;

À equipe do Departamento de Morfologia do IBB, em especial ao Prof. Dr. Robson Carvalho e ao doutorando Juarez Ferreira, parceiros fundamentais neste projeto;

Ao Prof. Dr. Rogério Oliveira do Departamento de Bioestatística do IBB, prestativo colaborador deste estudo;

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima e ao Núcleo de Microscopia Eletrônica da ESALQ - USP, por possibilitarem as análises de microscopia;

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, em especial à funcionária Claudete, pelo processamento das amostras para análise;

Aos membros constituintes das Bancas examinadoras de Defesa e Qualificação, Prof. Dr. Robson Carvalho, Prof. Dra. Fernanda Landim, Dra. Bruna De Vita, Prof. Dra. Flávia Delela e Prof. Dr. Rogério Amorim;

Ao IBB, pela oportunidade de ingresso no Programa de Pós-Graduação, em especial aos funcionários da PG;

À FMVZ, por ceder as instalações e animais para realização do experimento;

À CAPES, pela bolsa concedida para o desenvolvimento do projeto;

Aos colegas, colaboradores e funcionários não mencionados e que colaboraram na pesquisa e me acompanharam durante o mestrado;

À minha família, sem a qual eu jamais teria a oportunidade de me dedicar aos estudos e conquistar o título de Mestre;

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
01. INTRODUÇÃO.....	14
02. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
02.1 Células-tronco Mesenquimais.....	15
02.2 Tecido adiposo como fonte de CTMs.....	17
02.3 Medula óssea como fonte de CTMs.....	17
02.4 Potencial de aplicação das CTMs em Medicina Veterinária.....	18
02.5 Diferenciação das CTMs.....	18
03. HIPÓTESES.....	21
04. OBJETIVOS GERAIS.....	22
04.1 Objetivos específicos.....	22
05. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	23
06. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
06.1 Animais.....	24
06.2 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO.....	24
06.3 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-TA.....	25
06.4 Contagem e plaqueamento das CTMs.....	25
06.5 Caracterização de CTMs-TA.....	26
06.5.1 Caracterização Imunofenotípica.....	26
06.5.2 Diferenciação condrogênica.....	26
06.5.3 Análise citogenética.....	26
06.6 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFCF).....	26
06.7 Indução à diferenciação.....	27
06.8 Diferenciação não induzida.....	27
06.9 Avaliação citológica.....	27
06.10 Análise de ultraestrutura.....	28
06.11 Avaliação de expressão gênica.....	28
06.11.1 Genes.....	28
06.11.2 Extração de RNA total.....	29
06.11.3 RT-qPCR.....	29
06.12 Análise estatística.....	30
07. RESULTADOS.....	30
07.1 Coleta, isolamento e cultivo de CTMs-MO.....	30
07.2 Coleta, isolamento e cultivo do CTMs-TA.....	30
07.3 Caracterização de CTMs-TA.....	31
07.3.1 Caracterização imunofenotípica.....	31
07.3.2 Diferenciação condrogênica.....	31
07.3.3 Análise citogenética.....	31
07.4 Ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas.....	32

07.5	Indução à diferenciação	33
07.6	Diferenciação não induzida	33
07.7	Análise de ultraestrutura	37
07.8	Avaliação de expressão gênica	34
08.	DISCUSSÃO	42
09.	CONCLUSÕES	45
10.	PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSO ORIGINADAS DESTE TRABALHO	46
11.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
12.	ARTIGO CIENTÍFICO - Manuscrito	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelo esquemático da diferenciação das CTMs.....	19
Figura 2 - Representação esquemática de fatores mecânicos e alterações morfológicas das CTMs.....	20
Figura 3 - Boxplot: Marcadores imunofenotípicos expressos em porcentagem.	31
Figura 4 - Análise cromossômica. Cromossomos em euploidia ($2n=64$) para <i>E. caballus</i>	32
Figura 5 - Variação de eficiência de UFCF dos grupos CTMs-MO e CTMs-TA em 10 e 20% SFB.....	32
Figura 6 - Diferenciação condrogênica	33
Figura 7 - Diferenciação adipogênica induzida e não induzida	34
Figura 8 - Diferenciação osteogênica induzida e não induzida.....	35
Figura 9 - Amostras avaliadas por eletroforese.....	35
Figura 10 - Representação da expressão gênica nos grupos cultivados em 10 e 20% de SFB ...	36
Figura 11 - Gráficos representativos da expressão gênica	37
Figura 12 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10 e TA20.....	39
Figura 13 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos MO10 e MO20.....	40
Figura 14 - Microscopia eletrônica das CTMs dos grupos TA10a, TA20a TA10b e TA20b.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Divisão dos grupos induzidos e não induzidos à diferenciação.	24
Tabela 2 - Genes investigados, descrição, ID no genbank e seus respectivos primers.	29

RESUMO

A medula óssea (MO) e o tecido adiposo (TA) são fontes viáveis e amplamente estudadas de células tronco mesenquimais (CTMs), cujo alto potencial de multiplicação e diferenciação, aliado à característica imunomoduladora, permitem ampla aplicação em Medicina Veterinária com resultados satisfatórios na reconstrução de tecidos danificados. Diversos protocolos são descritos para isolamento e cultivo de CTMs, com divergência na porcentagem de suplementação de soro fetal bovino (SFB), componente xenogênico que é indicado como possível facilitador do processo de diferenciação *in vitro*. Este estudo analisou a proliferação e diferenciação induzida e não induzida de CTMs-TA e MO cultivadas em 10 ou 20% de SFB, e demonstrou que CTMs cultivadas em 20% de SFB apresentam maior eficiência de proliferação *in vitro*, e que a proliferação *in vitro* das CTMs-TA são superiores em comparação à CTMs-MO. O potencial de diferenciação das CTMs-TA e MO foi caracterizado por análise citológica e ultraestrutural após ensaio de diferenciação induzido por meios comerciais específicos e ensaio não induzido, onde as CTMs foram mantidas apenas nos meios basais. Esses ensaios foram também submetidos a avaliação de expressão gênica por qRT-PCR, porém estes dados não foram conclusivos. Aparente formação de matriz extracelular nas CTMs-TA cultivadas em 10% de SFB e não induzidas a diferenciação sugere possível ocorrência de diferenciação espontânea nesse grupo, o que foi evidenciado pela análise ultraestrutural. Adicionalmente, foi realizada caracterização imunofenotípica das CTMs-TA, com o objetivo de construir um banco de células aplicáveis *in vivo*. Em conclusão, a importância do SFB para o cultivo de CTMs foi demonstrada pelos resultados de proliferação superiores em células cultivadas em 20% de SFB, bem como a superior proliferação das CTMs-TA. A concentração de 10% de SFB no meio de cultivo pode favorecer a ocorrência de diferenciação espontânea das CTMs-TA, conforme demonstrado pela análise ultraestrutural. O isolamento, cultivo e caracterização de CTMs-TA foram eficientes e possibilitaram a formação de um banco de células viáveis para aplicação *in vivo*.

Palavras-chave: terapia celular, diferenciação celular, ultraestrutura, soro fetal bovino.

ABSTRACT

Bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) are viable sources of mesenchymal stem cells (mSCs), which high potential for proliferation and differentiation, in addition to immunomodulatory property allows wide application in Veterinary Medicine, obtaining satisfactory results in reconstruction of damaged tissues. Several protocols are described for isolation and culture of mSCs, although with divergences in percentage of fetal calf serum supplementation (FCS), a xenogenic component indicated as a possible factor for *in vitro* differentiation process. This study examined the proliferation, induced and non-induced differentiation of mSCs from AT and BM cultured in 10 or 20% FBS, and demonstrated that mSCs cultured in 20% FBS show higher *in vitro* proliferation efficiency, and proliferation *in vitro* of MSC-AT are higher compared to mSCs-BM. The differentiation potential of mSCs-AT and BM were characterized by cytological and ultrastructural analysis after differentiation assay induced by specific commercial media and not induced assay, where mSCs were maintained only in the basal media. These assays were submitted also to gene expression analysis by qRT-PCR, but these data were not concluded. Apparent formation of extracellular matrix in mSCs-AT cultured in 10% FBS and non-induced to differentiation were observed, which suggests possible occurrence of spontaneous differentiation in this group. Additionally, immunophenotypic characterization was performed of MSCs-AT, with the aim of maintain a cell bank to *in vivo* application. During the process of induced differentiation into adipogenic and osteogenic lineages, the mSCs-AT and BM presented morphological and physiological changes; acquire characteristics similar to the pre-adipocytes and osteoblasts, which did not occur when mSCs were not exposed to the inducing differentiation media. The concentration of 10% FBS in the culture medium may induce the occurrence of spontaneous differentiation of mSCs-AT, as demonstrated by ultrastructural analysis, the concentration of 20% FBS in the culture medium promotes cell proliferation of mSCs from both sources. Isolation, culture and characterization of mSCs-AT were efficient and allowed the construction of a cell bank viable for *in vivo* application.

Keywords: cell therapy, cell differentiation, ultrastructure, fetal bovine serum.

01. INTRODUÇÃO

Estudos com células tronco (CT) têm contribuído de forma efetiva para o avanço das possibilidades de terapia celular, devido ao alto potencial dessas células em regenerar tecidos e órgãos lesados. As CT podem ser classificadas, de acordo com seu potencial de diferenciação, em totipotentes, quando são capazes de se diferenciar em todos os tecidos de um indivíduo; pluripotentes, quando podem se diferenciar em todos os tecidos exceto os anexos fetais; multipotentes ou CT adultas, quando se diferenciam em mais de um tipo celular da mesma linhagem; e unipotentes, quando são capazes de se diferenciar em um só tipo celular (WODEWOTZKY, 2008). Conforme o tecido de onde se originam, as CT podem ser classificadas em embrionárias (CTE) ou somáticas. As CTE podem se diferenciar de forma desordenada, constituindo teratomas, além de serem foco de inúmeras discussões éticas. Sendo assim, as pesquisas com CT somáticas, que incluem as CT hematopoiéticas (CTH) e CT mesenquimais (CTMs) têm crescido e revelado grande variedade e potencial de aplicação terapêutica (PEREIRA, 2008).

A medula óssea (MO), é a principal fonte de CTMs estudada e permite a coleta de células com grande capacidade de diferenciação (PEREIRA, 2008), porém o número de CTMs isoladas a partir da MO decresce ao longo da vida dos indivíduos. O tecido adiposo (TA) também tem sido estudado como fonte alternativa de CTMs, da qual é possível obter células semelhantes às da MO, em maior quantidade e com potencial de diferenciação pluripotente ou multipotente (KERN et al., 2006; ZUK et al., 2002).

O potencial de diferenciação das CTMs é demonstrado *in vitro* quando utilizados meios de indução específicos (PITTENGER et al., 1999), porém, foi observado por Polchow et al. (2012), em experimento de cultivo de células de cordão umbilical humano, a presença de vacúolos lipídicos corados por *Oil Red* em CTMs não induzidas a diferenciação. As concentrações de soro fetal bovino (SFB) de 5 e 10% utilizadas pelos autores pode ter influenciado a diferenciação espontânea, porém outros fatores como densidade e contato entre as células também podem influenciar tais diferenciações, conforme observado por Peng et al. (2012) em experimento de cultivo induzido. Além de ser um possível indutor da diferenciação *in vitro*, o SFB, por ser um elemento xenogênico, representa um desafio no contexto da aplicação das CTMs *in vivo*, uma vez que pode influenciar na resposta imunológica do indivíduo receptor (MACKENSEN et al., 2000) e carrear vírus ou prions (MANNELLO & TONTI, 2007). Nesse contexto, este estudo objetivou analisar e comparar o processo de cultivo e diferenciação de CTMs obtidas de TA e MO de equinos, cultivadas em meios suplementados com 10 ou 20% de SFB, e em meio indutório de

diferenciação osteogênica e adipogênica. A eficiência de formação de colônias foi analisada por ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFCE), e após ensaios de diferenciação induzida e não induzida, as CTMs de ambos os grupos foram submetidas à análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de expressão gênica para os genes envolvidos na osteogênese e adipogênese. Adicionalmente, foi realizada caracterização de CTMs-TA, por meio de análise imunofenotípica dos marcadores positivos CD29, CD44, CD90 e Vimentina, e negativos MHC-II e CD34, além de diferenciação induzida na linhagem condrogênica.

09. CONCLUSÕES

- Durante o processo de diferenciação induzido nas linhagens adipogênica e osteogênica, as CTMs-TA e MO apresentam modificações morfológicas e fisiológicas; adquirem características semelhantes aos pré-adipócitos e osteoblastos, e o mesmo não ocorre quando as CTMs não recebem o meio indutor da diferenciação.

- A concentração de 10% de SFB no meio de cultivo pode favorecer a ocorrência de diferenciação espontânea das CTMs-TA em linhagem de células que produzem matriz extracelular fibrosa, conforme demonstrado pela análise ultraestrutural.

- A concentração de 20% de SFB no meio de cultivo favorece a proliferação celular das CTMs-TA e MO, e é mais indicado para otimização de culturas celulares em comparação ao meio suplementado com 10% SFB.

- Os protocolos empregados no isolamento, cultivo e caracterização de CTMs-TA foram eficientes e possibilitaram a formação de um banco de células viáveis para aplicação *in vivo*, porém é recomendável a realização de monitoramento da expressão de MHC-II na próxima passagem das células criopreservadas, com a finalidade de minimizar o risco de resposta imunológica do organismo receptor.

10. PUBLICAÇÕES EM ANAIS DE CONGRESSO ORIGINADAS DESTE TRABALHO

1. GALHARDO, E.C. et al. Isolation and characterization of Stem Cell from Equine adipose tissue. In: XVI Workshop de Genética, 2016 – Botucatu, Anais do Workshop de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, abril de 2016.
2. GALHARDO, E.C. et al. Comparative study of self-renewal capacity of Stem Cell from equine bone marrow cultured in 10 and 20% fetal bovine serum. In: XVI Workshop de Genética, 2016 – Botucatu, Anais do Workshop de Genética, Instituto de Biociências de Botucatu, abril de 2016. Premiação de segundo lugar na categoria apresentação oral.
3. GALHARDO, E.C. et al. Comparação ultra estrutural de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo e medula óssea equina antes e após diferenciação adipogênica. In: XVII Conferência Anual ABRAVEQ, 2016 – Campos do Jordão-SP, abril de 2016.
4. GALHARDO, E.C. et al. Ultra-estrutura de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo equino e cultivadas com diferentes concentrações de soro fetal bovino. In: XVII Conferência Anual ABRAVEQ, 2016 – Campos do Jordão-SP, abril de 2016.
5. GALHARDO, E.C. et al. Mesenchymal Stem Cell isolation from equine bone marrow. In: IX Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – Botucatu-SP, maio de 2016.
6. GALHARDO, E.C. et al. Comparação ultra-estrutural da diferenciação adipogênica induzida de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e medula óssea equina. In: XXX Encontro anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE, 2016 – Foz do Iguaçu-PR, agosto de 2016.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Transplantation**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 2009.

ALFARO, L. A. S. et al. CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration. **Stem Cells**, v. 29, n. 12, p. 2030–2041, 2011.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 301–316, jul. 2004.

BARBERINI, D. J. et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem cell research & therapy**, v. 5, p. 25, 2014.

BIEBACK, K. et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, v. 27, n. 9, p. 2331–2341, 2009.

BLACK, L. L. et al. Effect of Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Lameness in Dogs with Chronic Osteoarthritis of the Coxofemoral Joints : **A Randomized , Double-Blinded , Multicenter , Controlled Trial ***. v. 8, n. 4, p. 272–284, 2007.

BOSNAKOVSKI, Darko et al. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell and tissue research**, v. 319, n. 2, p. 243-253, 2005.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A; CASTEILLA, L.; et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–8, 2013.

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

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076–84, 2006.

CARREIRA, A. C. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, n. November 2014, p. 64–73, 2014.

CHAMBERLAIN, Giselle et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 1005–1011, 2001.

CHEN, L.; TREDGET, E. E.; WU, P. Y. G.; WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PloS one**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008.

CHEN, Y.; SHAO, J.-Z.; XIANG, L.-X.; DONG, X.-J.; ZHANG, G.-R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 5, p. 815–20, 2008b.

CHENG, K. et al. Transplantation of bone marrow-derived MSCs improves cisplatin-induced renal injury through paracrine mechanisms. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 94, n. 3, p. 466–473, 2013.

CHENG, Su-Li et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, n. 1, p. 277-286, 1994.

COLOSIMO, Alessia et al. Prolonged in vitro expansion partially affects phenotypic features and osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. **Cytherapy**, v. 15, n. 8, p. 930-950, 2013.

COSGROVE, D. et al. Mice lacking MHC class II molecules. **Cell**, v. 66, p. 1051–1066, 1991.

CROVACE, A. et al. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. **Veterinary medicine international**, v. 2010, p. 250978, 2010.

DE MATTOS CARVALHO, A. et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2-4, p. 303–306, 2009.

DE SCHAUWER, C. et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 81 A, n. 4, p. 312–323, 2012.

DE SCHAUWER, C. et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1431–1443, 2011.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, jan. 2006.

ENGLER, A. J. et al. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677–689, 2006.

ERICKSON, G. R. et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, p. 763–769, 2002.

ESLAMINEJAD, M. B. et al. Rat marrow-derived mesenchymal stem cells developed in a medium supplemented with the autologous versus bovine serum. **Cell Biology International**, v. 33, n. 5, p. 607–616, 2009.

FAN, Z. et al. The arginine methyltransferase PRMT5 regulates CIITA-dependent MHC II transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 5, p. 687–696, 2016.

FERNYHOUGH, M. E.; BUCCI, L. R.; HAUSMAN, G. J.; et al. Gaining a solid grip on adipogenesis. **Tissue & cell**, v. 37, n. 4, p. 335–8, 2005.

FERNYHOUGH, M. E.; OKINE, E.; HAUSMAN, G.; VIERCK, J. L.; DODSON, M. V. PPAR γ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. **Domestic animal endocrinology**, v. 33, n. 4, p. 367–78, 2007.

FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, p. 1528–1530, 1998.

FERRIS, R. A; FRISBIE, D. D.; MCCUE, P. M. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. **Theriogenology**, v. 82, n. 1, p. 36–42, 2014.

FORNI, M. F. et al. Murine Mesenchymal Stem Cell Commitment to Differentiation Is Regulated by Mitochondrial Dynamics. **Stem Cells**, p. 743–755, 2015.

GADE, N. E.; PRATHEESH, M. D.; NATH, A; et al. Molecular and cellular characterization of buffalo bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, v. 48, n. 3, p. 358–67, 2013a.

GUILAK, F. et al. Control of Stem Cell Fate by Physical Interactions with the Extracellular Matrix. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 17–26, 2009.

HORWITZ, E. M. et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature medicine**, v. 5, n. 3, p. 309–313, 1999.

HWA CHO, Hyun; BAE, Yong Chan; JUNG, Jin Sup. Role of Toll-Like Receptors on Human Adipose-Derived Stromal Cells. **Stem cells**, v. 24, n. 12, p. 2744-2752, 2006.

HWANG, Nathaniel S. et al. Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 284-291, 2006.

KAWAGUCHI, Nobuko et al. ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating β 1 integrin function. **J Cell Sci**, v. 116, n. 19, p. 3893-3904, 2003.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 5, p. 1294–301, maio 2006.

KIM, Eung-Kyun et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 4, p. 1680-1687, 2012.

KODAIRA, K. et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1224–1231, 2006.

KODAIRA, K. et al. Purification and identification of a BMP-like factor from bovine serum. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 1224–1231, 2006.

KOKAI, L. E.; MARRA, K.; RUBIN, J. P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 163, n. 4, p. 399–408, 2014.

KUMAR, A. et al. Multiple roles of CD90 in cancer. **Tumor Biology**, 2016.

LETTRY, V. et al. Coculture of equine mesenchymal stem cells and mature equine articular chondrocytes results in improved chondrogenic differentiation of the stem cells. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 1, p. 5–15, 2010.

LIM, Chae-Young et al. Evaluation of autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells on renal regeneration after experimentally induced acute kidney injury in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 208-217, 2016.

LIU, G. et al. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2655–2664, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

LOVATI, A. B. et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 2, p. 103–121, 2011.

MACKENSEN, A et al. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 49, p. 152–156, 2000.

MAIA, L. et al. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 6, p. 618–24, jun. 2013.

MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No Breakthroughs for Human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell Culture: Conditioned Medium, Feeder Layer, nor Feeder-Free; Medium with Fetal Calf Serum, Human Serum, or Enriched Plasma; Serum-Free, Serum Replacement Nonconditioned Medium. p. 1603–1609, 2007.

MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 9, p. S36–S40, 2001.

MAUMUS, M.; GUÉRIT, D.; TOUPET, K.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: applications in rheumatology. **Stem cell research & therapy**, v. 2, n. 2, p. 14, 2011.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; et al. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. **BMC veterinary research**, v. 7, p. 42, 2011.

MUELLER, S. M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of cellular biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 583–90, jan. 2001.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J.; HAM, S. M. VAN; KNIPPENBERG, M.; et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v. 8, n. 2, p. 166–77, 2006.

PALUMBO, C. et al. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. **Acta anatomica**, v. 137, n. 4, p. 350–358, 1990.

PASCUCCI, L. et al. Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1277–1285, 2010.

PEREIRA, Lygia da Veiga. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciênc. saúde coletiva**, v. 13, n. 1, p. 07-14, 2008.

PHAM, P. V et al. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: promising differentiation therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 209, 2011.

PHINNEY, Donald G.; PROCKOP, Darwin J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.

PITTENGER, Mark F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLCHOW, B. et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. **Journal of translational medicine**, v. 10, p. 98, jan. 2012.

RATAJCZAK, J. et al. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.**, v. 20, n. 9, p. 1487–95, 2006.

ROCCA, G. LA; ANZALONE, R.; CORRAO, S.; et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. **Histochemistry and cell biology**, v. 131, n. 2, p. 267–82, 2009.

SAALBACH, A. et al. Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin alphavbeta3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4710–4720, 2005.

SCHMITT-GRÄFF, A; DESMOULIÈRE, A; GABBIANI, G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 425, n. 1, p. 3–24, 1994.

SIEMERINK, M. J. et al. CD34 Promotes Pathological Epi-Retinal Neovascularization in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. e0157902, 2016.

SILVA, G. V. et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. **Circulation**, v. 111, p. 150–156, 2005.

SINGH, J.; MANN, A.; KUMAR, D.; DUHAN, J. S.; YADAV, P. S. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. **In vitro cellular & developmental biology**. Animal, v. 49, n. 6, p. 408–16, 2013.

SMITH, R. K. W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99–102, 2010.

SMITH, R. K. W. et al. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal

stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 99–102, 2010.

STOLZING, A. et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 163–173, 2008.

STOLZING, A. et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, p. 163–173, 2008.

SUNDIN, M. et al. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. **Haematologica**, v. 92, n. 9, p. 1208–1215, 2007.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. The Veterinary clinics of North America. **Equine practice**, v. 27, n. 2, p. 263–74, 2011.

UCCELLI, Antonio; MORETTA, Lorenzo; PISTOIA, Vito. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. **European journal of immunology**, v. 36, n. 10, p. 2566–2573, 2006.

VIOLINI, S. et al. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC cell biology**, v. 10, p. 29, jan. 2009.

WILLIAMS, K. et al. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 238, p. 324–38, 2013.

WODEWOTZKY, T. I. CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR: Suporte didático para o Ensino Fundamental e Médio, 2008. Universidade Estadual Paulista.

WYLES, C. C. et al. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Are Phenotypically Superior for Regeneration in the Setting of Osteonecrosis of the Femoral Head. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 473, n. 10, p. 3080–3090, 2015.

YADAV, P. S.; MANN, A.; SINGH, J.; et al. Buffalo (*Bubalus bubalis*) Fetal Skin Derived Fibroblast Cells Exhibit Characteristics of Stem Cells. **Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 175–182, 2012.

YU, S.; MATSUSUE, K.; KASHIREDDY, P.; et al. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 1, p. 498–505, 2003.

ZHAO, J. et al. Uterine Infusion With Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Endometrium Thickness in a Rat Model of Thin Endometrium. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 2, p. 181–188, 2015.

ZHENG, W.; JIANG, C.; LI, R. Integrin and gene network analysis reveals that ITGA5 and ITGB1 are prognostic in non-small-cell lung cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2317–2327, 2016.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells □. v. 13, n. December, p. 4279–4295, 2002.

ZUK, P. A.; PH, D.; ZHU, M. I. N.; et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. , v. 7, n. 2, p. 211–228, 2001.