RENATA AVANCINI FERNANDES

Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos

São Paulo

2009

RENATA AVANCINI FERNANDES

Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Doméstico e Silvestres

Orientador:

Profª Drª Irina Kerkis

SÃO PAULO

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2215
FMVZ

Fernandes, Renata Avancini
Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos / Renata Avancini Fernandes. -- 2009.
62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Irina Kerkis.

1. Células tronco mesenquimal. 2. Líquido amniótico. 3. Líquido alantóide. 4. Conteúdo vitelino I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise intra-uterina de mutações genéticas e caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico e conteúdo vitelino", protocolado sob o nº1505/2008, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade das Profas. Dras. Maria Angélica Miglino e Irina Kerkis (Instituto Butantan), está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01 de outubro de 2008.

We certify that the Research "Intra-uterine analyze of genetics mutations and characterization to mesenchymal stem cells from amniotic fluid and yolk sac fluid", protocol number 1505/2008, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Profas. Dras. Maria Angélica Miglino e Irina Kerkis (Instituto Butantan), agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/01/08.

São Paulo, 02 de outubro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERNANDES, Renata Avancini
Título: Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____Instituição_____
Assinatuta: _____Julgamento:_____

Prof. Dr._____Instituição: _____
Assinatuta:_____Julgamento: _____

Prof.Dr._____Instituição:_____
Assinatuta:_____Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Marco e Magaly, pelo apoio, pela força, paciência, pelas conversas, pelo ombro, pelos conselhos, pelo incentivo, pelas caronas e pelas marmitas... vocês dois são a fonte de amor na minha vida... minha essência.

Ao meu irmão Bruno, pelas piadas sem graça, pelas risadas, pela amizade e por ser incrivelmente especial.

A minha irmã Carolzinha, que me ajudou e me escutou, mesmo estando do outro lado do mundo, pelo interesse, pela ajuda nas traduções... Aproveito para dizer o mesmo ao Bruno, meu cunhado e ao Lucas, meu sobrinho que eu amo.

Vovô Toninho, minha inspiração no que se diz a trabalho, dedicação, honestidade e justiça, me esforço para ser um dia, algo parecido com o que o senhor representa para mim. Vovô Mauro, por ensinar que tudo nessa vida pode ser vista de outra maneira, e que o importante é sorrir, Senhor Palhaço!

Vovó Nicinha e vovó Guigui, pelo amor incondicional, pelas comidas maravilhosas, pela preocupação, pelas orações...

Tios, tias, primos, prima, os momentos de descontração não seriam os mesmos sem vocês.

Carol, Letícia, Pinga, desde sempre, para sempre... tudo fica mais divertido quando estão comigo!Amo muito! Isabel e Mariazinha, obrigada pelas risadas, mesmo fora de hora! Obrigada!

Ao meu anjo da guarda, Hélio, simplesmente por ser exatamente como você é, pela paciência infinita, pelo carinho, pelo apoio, por você... Meu companheiro.

Agradecimentos

A Deus, pelos meus apelos de paciência e sabedoria, para lidar com as diferentes situações vividas até hoje.

Prof.ª Maria Angélica Miglino, pela confiança, oportunidade, pelo aprendizado, meu carinho e admiração.

À Irina Kerkis, por ser uma mulher extremamente bondosa, compreensiva e amiga. Obrigada pela paciência, tenho muito orgulho de levar seu nome junto ao meu nessa defesa.

Amigos novos e queridos da pós... Vocês se estenderão para sempre, Cris (Wences), Ana Lu, Marininha, Sarmentinho, Lisley, Nelson, Lê (ic), Dré (Bebel), Má(theus), Diogro, Joaninha, Márcio, Di (Abreu), Fabi, Isa, Ju Passos, Dani, Cajú, Drica, João, Rose, Rô (pós doc), Fê (lipinho), Ana, Thaís... enfim, impossível colocar todos... obrigada!

Novamente à Cris (Wences), Sarmentinho, Carol, Letícia, André e Márcio, pela ajuda essencial nessa dissertação.

A equipe do canil GRMD, por tudo, troca de plantões, risadas, aprendizado...

Aos funcionários e técnicos da anatomia, da FMVZ e do Butantan, Índio, Ronaldo, tia Bernadete, Augusto, Vera, Fátima, Tati, Maicon, Jaque, Elza, Helena...

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos cães do canil, meus pequenos que ficaram... Agradeço demais, pois estar com vocês, é sempre uma oportunidade boa para relaxar e trocar uma energia, sempre positiva. Aos pequenos se levaram... Para sempre em meus pensamentos...

RESUMO

FERNANDES, R. A. **Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos**. [Characterization to mesenchymal stem cells from amnioitc fluid, alantoic fluid and yolk sac fluid from canine foetus]. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O cão é um excelente modelo pré-clínico para o estudo de doenças, testes farmacológicos e novas terapias para futura aplicação em humanos. Desta forma, estudamos o modelo canino como fonte de células tronco de anexos fetais, o líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino. Uma vez que hoje, as células tronco apresentam uma esperança na cura de diversas doenças tanto nos cães, como no ser humano. Sendo assim, caracterizamos e estudamos o potencial de diferenciação dessas células, isoladas após a técnica de ovário salpingo histerectomia, de cadelas em campanhas de castração. Após o isolamento e a caracterização, somente foi estabelecida a cultura do líquido amniótico e alantóide. Para caracterizar as células, isoladas no intuito de comprovar que são células tronco verdadeiras, os seguintes Imunomarcadores foram usados, vimentina, nestina, citoqueratina-18 e oct-4, sendo os três primeiros positivos para células do líquido amniótico e alantóide. Induzimos a diferenciação dessas células para osso, cartilagem e gordura, utilizando protocolos previamente estabelecidos. As células tronco do líquido amniótico limitaram-se à diferenciação condrogênica e osteogênica enquanto que as células tronco do alantóide, limitaram-se a diferenciação condrogênica. Ao mesmo tempo, ambos os tipos celulares, não prosseguiram à diferenciação adipogênica. Surpreendentemente, o meio de diferenciação para gordura, induziu a mudança morfológica nestas células que passaram a apresentar a morfologia típica de células neuronais. Podemos concluir que provavelmente para diferenciação adipogênica, é preciso desenvolver outro meio de cultura, por outro lado, esse resultado sugere que devemos explorar o potencial neurogênico desses tipos celulares.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimal. Líquido amniótico. Líquido alantóide. Conteúdo vitelino.

ABSTRACT

FERNANDES, R. A. **Characterization to mesenchymal stem cells from amnioitc fluid, alantois fluid and yolk sac fluid from canine foetus**. [Caracterização de células tronco mesenquimais oriundas de líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino de fetos caninos]. 2009. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The dog is an excellent preclinical model for the study of diseases, pharmacological tests and new therapies for future application in humans. Thus, we studied the canine model as a source of stem cells from fetal membranes, amniotic fluid, allantois and fluid yolk. Since today, stem cells have a hope in curing various diseases in both dogs and humans. Therefore, we characterize and study the differentiation potential of these cells, isolated after the technique of ovarian salpingo hysterectomy. After the isolation and characterization, was only established the culture of amniotic and allantois fluid. To characterize the cells isolated in order to demonstrate that they are true stem cells, the following were used antibodies, vimentin, nestin, cytokeratin-18 and oct-4. The cells were reactive positively to vimentin, nestin, cytokeratin. We induced the differentiation of these cells osteogenic, chondrogenic, adipogenic, using previously established protocols. Stem cells from amniotic fluid were restricted to chondrogenic and osteogenic differentiation while the stem cells of the allantois, limited to chondrogenic differentiation. At the same time, both cell types, were not able to adipogenic differentiation. Surprisingly, the means of adipogenic differentiation, induced the typical morphology of neuronal cells. We can conclude that probably for adipogenic differentiation, we must develop other culture media, on the other hand, this result suggests that we should explore the neurogenic potential these cell types.

Key-words: Mesenchymal stem cells. Amniotic fluid. Alantois fluid. Yolk sac fluid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **9**
2 REVISÃO DE LITERATURA **10**
2.1 Formação dos tecidos placentários, embrionários e fetais **10**
2.2 Células tronco **12**
2.3 Células tronco mesenquimais **13**
2.4 Líquido amniótico **14**
2.5 Líquido alantóide **17**
2.6 Saco vitelino **18**
3 OBJETIVO **21**
4 MATERIAL E MÉTODO **22**
4.1 Animais **22**
4.2 Coleta do material **23**
4.3 Processamento do material **25**
4.4 Protocolo de imunofluorescência **26**
4.5 Protocolos de diferenciação **27**
4.5.1 Diferenciação osteogênica 27
4.5.2 Diferenciação adipogênica 28
4.5.3 Diferenciação condrogênica 28
4.6 Protocolo de curva de crescimento **29**
5 RESULTADOS **30**
5.1 Isolamento dos tecidos para obtenção das células **30**
5.2 Características de isolamento com diferentes meios de cultivo **32**
5.3 Conteúdo vitelino **34**
5.3.1 Características de isolamento com diferentes meios de cultivo 35
5.4 Líquido amniótico **36**
5.4.2 Características imunofenótipicas (imunofluorescência) 37
5.4.3 Potencial de diferenciação 39
5.5 Líquido alantóide **43**
5.5.1 Curva de crescimento 44
5.5.2 Características imunofenótipicas (imunofluorescência) 44
5.5.3 Potencial de diferenciação 46
6 DISCUSSÃO **49**
7 CONCLUSÕES **51**
REFERÊNCIAS **53**

1 INTRODUÇÃO

As células tronco são definidas por três propriedades fisiológicas: I- capacidade de auto-renovação (habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares as da célula mãe); II- capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares; III- capacidade de reconstituir funcionalmente determinado tecido lesado em ser vivo (TILL; MCCULLOCH; SIMINOVITCH; 1964; VERFAILLIE, 2002).

O feto apresenta-se como uma fonte potencial para a terapia celular, pois pelo estado indiferenciado de suas células, quando transplantadas podem proliferar, migrar e estabelecer conexões funcionais com as outras células (FINE, 1994)

Nos carnívoros domésticos, o desenvolvimento dos conceptos, membranas fetais e placentação está sendo extensivamente estudado em cães (*Canis familiaris*) (MIGLINO et al., 2006). Sendo assim, estudaremos as células tronco fetais, oriundas do líquido amniótico, liquido alantóide e conteúdo vitelino em modelo canino, um modelo bem estabelecido para testes pré-clinicos de doenças humanas, novos tratamentos, testes farmacológicos, entre tantos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para tornar a revisão mais compreensível, a mesma foi dividida em tópicos, da seguinte maneira: 2.1 Formação dos tecidos placentários, embrionários e fetias, 2.2 Células tronco, 2.3 Células tronco mesenquimais, 2.4 Líquido amniótico, 2.5 Líquido alantóide, 2.6 Saco vitelino

2.1 Formação dos tecidos placentários, embrionários e fetais

A fusão de um gameta feminino e um masculino resulta em uma célula diplóide chamada zigoto. Após repetidas clivagens ele se desenvolve em estágios progressivos em blastocisto, embrião, e, com a diferenciação dos órgãos, em feto. O novo e frágil ser depende da flutuabilidade de um ambiente aquoso para adquirir liberdade de desenvolvimento e condições térmicas, químicas e osmóticas relativamente constantes. Nos vertebrados vivíparos, o embrião desenvolve membranas fetais extra-embrionárias da parede corporal e do intestino, as quais como sacos preenchidos de liquido servem às finalidades acima citadas durante a vida pré-natal. Contudo, neste período, processos de intercâmbio fisiológico, tais como respiração e nutrição, exigem disposições especiais, as quais são fornecidas por uma ligação íntima entre partes das membranas fetais e endométrio. O processo pelo qual essa organização se realiza é denominado implantação. O órgão conjunto formado, a placenta, consiste assim numa parte fetal e numa parede uterina, onde o modo de formação e de união das membranas fetais ao endométrio é denominado placentação. O feto e a placenta fetal formam um concepto (BJÖRKMAN, 1989).

A parede do blastocisto é constituída de um epitélio unilaminar, denominado trofoblasto, que se desenvolve antes da massa celular interna diferenciar-se em camadas germinativas. Posteriormente, uma camada de mesoderma é adicionada e a membrana composta é conhecida como o córion. Uma vesícula ectodérmica, o âmnio, também revestido de mesoderma, circunda o embrião e o sustenta num líquido, uma vesícula endodérmica, o saco vitelino, em comunicação com o intestino posterior, o alantóide, participam na formação da placenta. O mesoderma do córion e do âmnio é parte da somatopleura extra-embrionária, enquanto o mesoderma do

saco vitelino e do alantóide origina-se da esplancnopleura extra-embrionária (BJÖRKMAN, 1989).

O córion se desenvolve primeiro como uma simples camada de epitélio, o trofoblasto, avascular. Mais intimamente é estabelecido pelo córion frondoso, o qual forma o vasto aumento na área de contato entre o trofoblasto e o tecido endometrial (BJÖRKMAN; DANTZER; LEISER, 1989).

O alantóide é um pequeno divertículo, originado da parede posterior do saco vitelino (SADLER, 2005). Acredita-se que o alantóide oriente a formação dos vasos umbilicais. Nos mamíferos, nos quais se desenvolve a placenta, assume função respiratória e de armazenamento de materiais excretados (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001).

A vasculogênese do alantóide é iniciada da inclinação distal do alantóide que contém mesoderme, e progride em duas direções, distalmente a fusão com o córion e a forma da placenta labiríntica e proximalmente, a conexão com a aorta dorsal (DOWNS et al., 2004).

A amniogênese é resultado das células do epiblasto que são gradualmente deslocadas em direção ao pólo embrionário pelo acúmulo de fluídos e se diferenciam em uma fina membrana (amniótica) separando a nova cavidade do citotrofoblasto, resultando na formação da cavidade amniótica. Após poucas semanas, a cavidade amniótica envolve todo o embrião. Assim, a cavidade amniótica tem por teto os amnioblastos e por assoalho o epiblasto (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001).

A membrana amniótica é um tecido de origem fetal e é formada por três camadas: uma camada de epitélio simples, uma espessa membrana basal e um mesênquima avascular (BENIRSCHKE; KAUFMAN, 2000). A membrana obtém sua nutrição e oxigenação a partir do fluido coriônico, do líquido amniótico e dos vasos da superfície fetal (TODA et al., 2007).

Dos anexos embrionários, a cavidade vitelina é o primeiro a se formar e, nas aves, bem antes da amniótica. Nos mamíferos placentários, e não nos monotremos, sofre atrofia, durante o desenvolvimento embrionário. Nestes, forma-se primeiramente com uma cavidade revestida pelo hipoblasto e por células achatadas, provavelmente provenientes da diferenciação mesodérmica do citotrofoblasto. Com o desenvolvimento embrionário, o hipoblasto acaba revestindo totalmente a cavidade vitelina primitiva, anteriormente formada, quando então, já diferenciado em

endoblasto, delimitará totalmente a cavidade vitelina secundária que se formou (ALMEIDA, 1999). Os tecidos placentários podem abrigar células as quais mostram plasticidade, que é característica das células embrionárias pré-gastrulação, e as quais podem ter o potencial de diferenciação em diferentes linhagens, isso é bem suportado pelo fato que esses tecidos são originados durante o desenvolvimento embrionário, sempre antes da ocorrência da gastrulação (EVANGELISTA; SONCINI; PAROLINI, 2008).

A placenta humana é uma alternativa para a busca de fontes de células tronco mesenquimais que contornam as limitações de outras fontes, como medula óssea, cordão umbilical, sangue periférico e tecido adiposo, onde as células tronco mesenquimais desses tecidos se mostram promissoras, mas em alguns casos existem limitações em termos de acesso e no uso dessas fontes (MINGUELL, ERICES, 2006; VILLARON et al*.,* 2004).

Estudos feitos por Miao et al. (2006)*,* mostram resultados, onde as células tronco mesenquimais estão presentes na placenta humana. Usando técnicas rotineiras de cultura celular, as células tronco mesenquimais da placenta, podem ser isoladas com sucesso e expandidas *in vitro*. Ainda que a cultura inicial consista de células tipo fibroblastóide e não fibroblastóide, somente a população fibroblastóide permaneceu após a digestão enzimática e passagens.

2.2 Células tronco

As células-tronco podem ser classificadas, conforme seu potencial de diferenciação ou pela sua origem. Quanto ao potencial de diferenciação, são classificadas em totipotentes quando podem dar origem ao embrião e aos tecidos extraembrionários em condições propícias (suporte materno). São pluripotentes quando podem dar origem as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), mas não dão origem ao embrião ou aos tecidos extra-embrionários (VERFAILLIE, 2002). São multipotentes quando dão origem a quatro ou mais linhagens celulares (YOUNG; BLACK, 2004).

Quanto à origem, são classificadas em células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias são as células derivadas da massa

celular interna do blastocisto. Em meio adequado, podem se proliferar indefinidamente, mantendo seu potencial de diferenciação em todos os tecidos do organismo em desenvolvimento (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN; 1981; BRADLEY et al., 1984; WOBUS et al., 1984; DOETSCHMAN et al., 1985; WOBUS; GUAN; PICH; 2001; HUBNER et al., 2003; DALEY; GOODELL; SNYDER, 2003). As células-tronco embrionárias, em cultura, representam alternativa interessante, com aplicação potencial em inúmeras doenças. Possuem características bastante atrativas, quando comparadas às células-tronco adultas, pois podem crescer indefinidamente em cultura apropriada, além de gerar uma ampla série de tipos celulares e permitir manipulação genética mais fácil. Por outro lado, sua utilização apresenta dificuldades geradas pelos questionamentos éticos de sua obtenção e seu potencial no desenvolvimento de tumores (WOBUS; BOHELER, 2005).

Em contraste, as células-tronco adultas podem ser encontradas em diferentes tecidos do feto e do adulto; podem proliferar apenas por um número limitado de gerações, e sua resposta a sinais de diferenciação diminui após cada geração. Formam um reservatório de células indiferenciadas, que permanecem no indivíduo adulto e que estão envolvidas na reposição celular e no reparo dos órgãos e tecidos por toda a vida (YOUNG; BLACK, 2004).

Ao longo dos anos, diversos órgãos e tecidos do corpo humano perdem progressivamente sua capacidade de funcionamento, seja por causa de alguma doença ou pelo processo normal de envelhecimento (PEREIRA, 2008).

A terapia celular é um dos métodos que vêm sendo estudados para enfrentar essas situações. Pesquisas utilizando células-tronco adultas e embrionárias, também chamadas generalizadamente de células progenitoras ou *Stem Cells* (*SC)* (FUCHS; SEGRE, 2000), tem se mostrado bastante promissoras (PEREIRA, 2008).

2.3 Células tronco mesenquimais

Em 2005, foi proposto, pela *International Society for Cellular Therapy*, chamar de células mesenquimais estromais multipotentes (CMEMs), àquelas de aspecto fibroblastóide, isoladas de diversos tecidos, com característica de adesão ao plástico do frasco de cultura, crescimento em colônias e capacidade de diferenciação

mutipotencial. Reserva-se a designação células-tronco mesenquimais para aquelas que preencham os critérios específicos de célula-tronco (HORWITZ et al., 2005).

A sua origem é controversa, embora seja razoável supor, que descenda da célula pluripotente fetal, persistindo durante toda a vida (JAVAZO; BEGGS; FLAK, 2004). Apóia tal hipótese, o encontro de maior concentração de CMEMs em gestação precoce (CAMPAGNOLI et al., 2001), diminuindo com o decorrer da gestação, provavelmente, dirigindo-se de seu sítio de origem para os tecidos fetais (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001). São ainda encontradas em tecido materno, mesmo após a gestação, participando de reparo tecidual (ARTLETT; SMITH; JIMENEZ, 1998; NELSON et al., 1998; SANTOS et al., 2008).

Então, as células tronco mesenquimais são células estromais não-hematopoiéticas que tem multilinhagens com capacidade de diferenciação em diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão e músculo (POUNTOS; GIANNOUDIS, 2005).

Algumas células fetais, como as hematopoiéticas, resistem melhor a criopreservação em comparação às células maduras (NUMAZAKI et al., 1989; GROSCURTH et al., 1986; FINE, 1994). As células mesenquimais fetais apresentam menor chance de rejeição em aplicações alogênicas, em implantes xenólogos, são melhor toleradas (BORLONGAN et al., 1996; DEKEL et al., 1997; DEACON et al., 1997; OUREDNIK; OUREDNIK; MITCHELL, 1998; REINHOLT et al., 1998). Produzem altos níveis de fatores tróficos e angiogênicos, o que aumenta sua possibilidade de crescimento após o implante (DUNNETT; NATHWANI; BJORKLUND, 2000).

2.4 Líquido amniótico

A membrana amniótica é responsável pela hidratação do feto, nutrição, lubrificação do canal do parto e proteção mecânica do feto (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O âmnio é formado por células epiteliais que apresentam morfologia uniforme, não apresentando diferenças entre os mamíferos (STEVEN, 1982). As células que constituem o epitélio amniótico são pavimentosas, continuas e organizadas,

formando um epitélio pavimentoso simples, semelhante ao epitélio do alantóide. O epitélio amniótico está apoiado em uma camada de tecido conjuntivo embrionário, que constitui o mesênquima nos bovinos (ASSIS NETO, 2005).

O líquido amniótico contém quantidade muito grande de células em suspensão, população celular esta, variável com a fase da gestação e traduz as mudanças na formação do líquido amniótico e da maturação fetal e de seus anexos (GOSDEN, 1983).

Em dois trabalhos pioneiros com células do líquido amniótico, observa-se a presença de células mesenquimais no líquido amniótico (MACEK; HURYCH; REZACOVA, 1973; HURYCH et al., 1976), que confirma a hipótese de origem mesenquimal de uma parcela de células do líquido amniótico, sugerida pela análise de produção de colágeno por essas células (PRIEST et al., 1977).

Sugere-se a presença de células de linhagem não hematopoiética, com potencial multilinhagem, no líquido amniótico, e demonstra-se a conversão miogênica destas (STREUBEL et al., 1996). Também se confirma a origem fetal das células mesenquimais, coletadas do líquido amniótico e cultivadas *in vitro*, por meio da tipagem molecular dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (ERLICH et al., 1991).

As células mesenquimais do líquido amniótico apresentam maior capacidade de expansão que células-tronco mesenquimais derivadas de outras fontes, como da medula óssea neonatal, de um adulto e do cordão umbilical (IN'T ANKER et al., 2003; KUNISAKI et al., 2007).

As células mesenquimais do líquido amniótico humano diferenciam-se em neurônios, hepatócitos, fibroblastos, adipócitos, osteócitos, miócitos e condrócitos quando em meio facilitador (NOORT et al., 2002; IN'T ANKER et al., 2003; KAVIANI et al., 2003; TSAI et al., 2004; TSAI et al., 2006; McLAUGHLIN et al., 2006; DE COPPI et al., 2007;; KUNISAKI et al., 2007).

Segundo De Coppi et al. (2007), o fluido amniótico contém múltiplos tipos celulares derivados do desenvolvimento fetal. Células com estas populações homogêneas podem desenvolver diversas células diferenciadas, incluindo aquelas de linhagem adiposa, muscular, óssea e neuronal, eles descreveram linhas de células tronco derivadas do fluido amniótico multipotentes, e usaram um marcador retroviral para verificar que essas células podem crescer em linhagens adipogênicas, osteogênicas, miogênicas, endoteliais, neurogênicas e hepatogênicas, inclusive em

todas as camadas germinativas embrionárias. A este respeito, eles correspondem a um criterioso aceite de células tronco pluripotente, sem a implicância que eles podem gerar todos os tecidos adultos.

No fluido amniótico humano, obtido durante o processo de amniocentese, há uma variedade de células tronco originárias de tecidos embrionários e extra-embrionários (GOSDEN, 1983). Embora essas células sejam rotineiramente usadas para diagnóstico pré-natal de anormalidades fetais causadas por defeitos genéticos, o tipo celular presente no líquido amniótico humano, ainda não é bem caracterizado. Os tipos e propriedades das células do fluido amniótico variam com a idade gestacional, e eventuais patologias fetais.

Baseadas nas características morfológicas e de crescimento, as células do fluido amniótico podem ser classificadas em três tipos: epitelióide, fluido específico amniótico e fribroblastóides (MILUNSKY, 1979). Normalmente as células tipo fibroblastóides, aparecem tarde durante a cultura primária *in vitro* (IN'T ANKER et al., 2003). O fluido amniótico humano tem mostrado que contém células expressando o antígeno Oct-4, um marcador específico de células tronco pluripotentes (PRUSA et al., 2003), e essas células expressam um potencial de diferenciação das linhagens.

Quanto ao potencial de diferenciação, espera-se que a membrana amniótica possa manter propriedades pluripotentes. Durante o desenvolvimento, a massa celular interna do blastocisto, a partir da qual são derivadas as células tronco embrionárias, origina o epiblasto (a partir do qual é obtido o embrião) e hipoblasto (a partir do qual é derivado o saco vitelino). A partir do epiblasto (ectoderma embrionário), é obtida a camada epitelial da membrana amniótica (ectoderma amniótico), enquanto as células mesenquimais (mesênquima amniótico) são da linha primitiva da mesoderme extra-embrionária (ENDERS; KING, 1988).

Acredita-se que as células epiteliais amnióticas possuam capacidade de originar as três camadas germinativas, uma vez que, o epiblasto origina todas as camadas germinativas do embrião. Além disso, a camada epitelial do amniótico é originada antes da gastrulação, ou seja, antes da diferenciação e especificação celular. Desta forma é esperado que as células epiteliais amnióticas possam manter a plasticidade existente nas células da pré-gastrulação do embrião (MIKI et al., 2005).

Int´Anker et al. (2004), analisaram através da curva de crescimento, as células tronco mesenquimais obtidas do fluído amniótico e da membrana amniótica,

e concluíram que elas são similares. Com este dado, eles hipotetizaram que as células tronco mesenquimais oriundas do fluido amniótico são, pelo menos em partes, derivadas do âmnio. Também analisaram o fluido amniótico do segundo e último trimestre da gestação humana, comprovando que ambos são ricos em células tronco mesenquimais, que quando comparadas com as células tronco mesenquimais da medula óssea adulta, demonstram um potencial de expansão significantemente maior.

O âmnio humano pode ser obtido de forma simples de uma placenta a termo, além de não possuir problemas éticos relacionados à sua utilização. Estudos prévios demonstraram a capacidade de diferenciação das células mesenquimais derivadas do fluido amniótico humano em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (KIM et al., 2007).

Além disso, as células tronco do líquido amniótico expressam Oct-4, um marcador específico de células tronco pluripotentes, e também uma elevada capacidade proliferativa e de diferenciação (SIEGEL et al., 2007).

Uma subpopulação celular específica de células distintas morfologicamente, foi isolada mecanicamente e expandida seletivamente a partir do líquido amniótico de ovelhas gestantes, onde determinou-se o perfil imunocitoquímico de muitas subpopulações específicas celulares, além de determinar as seguintes linhagens celulares: mesenquimal, fibroblastos / miofibroblasto. Expressão de vimentina, actina músculo liso, citoqueratina 8 e 18, e proteínas de fibroblastos superficiais foram detectados, no entanto, estas células foram negativas para desmina e CD31. Elas apresentaram significativamente proliferação mais rápida, quando comparadas com células fetais e adultas (KAVIANI et al., 2001).

2.5 Líquido alantóide

O alantóide é um divertículo endodérmico do intestino posterior; ele se forma atrás do divertículo vitelínico. O pedículo alantoidiano encontra-se próximo ao pedículo vitelínico. A evaginação endodérmica empurra, com seu crescimento, uma lâmina de mesoderma esplênico. O desenvolvimento do alantóide será cada vez mais importante, enquanto que a vesícula vitelínica vai se reduzir, a vesícula

alantoidea vai invadir o celoma extra-embrionário e virá se colar no cório. A junção do cório e do alantóide origina a placenta fetal que assumirá então outras funções relacionadas com a evolução da gestação. Nos carnívoros, o alantóide estende-se sobre toda a superfície interna do cório e envolve completamente a cavidade amniótica. A placenta será, tipicamente alantoideana. O alantóide servirá para as trocas com o organismo materno, tanto num sentido como no outro. A circulação do alantóide é muito extensa, mesmo quando a vesícula alantoideana se reduz até desaparecer. No homem, a terminologia designa pelo nome de vasos umbilicais as veias e as artérias que provêm da placenta, pois são os únicos vasos que persistem no cordão umbilical. Nas aves, o alantóide se forma quando a maior parte dos somitos já está formada; no coelho, o seu início se dá no estágio de 14 somitos, e no porco no estágio de 6 somitos. Na espécie humana, a vesícula vitelínica é extremamente reduzida e o divertículo alantoideano já se delimita antes mesmo do aparecimento dos primeiros somitos. De modo geral, o divertículo endoblástico se desenvolve num maciço mesodérmico muito vascularizado. O esboço do alantóide será o eixo do mesoderma alantoideano que entrará em relação com o cório para edificar a placenta (HOUILLON, 1972).

Duas populações celulares morfologicamente distintas são estabelecidas no alantóide (ELLINGTON, 1985; DOWNS et al., 1998): uma camada exterior de "mesotélio”, e um núcleo interno de mesoderme vascularizada, definida inicialmente por um plexo de células endoteliais.

O aparecimento precoce de células tronco hematopoiéticas na placenta sugere que a mesoderme alantoidea e suas derivações podem estar envolvidas na geração das células tronco hematopoiéticas e/ou maturação dessas células no adulto (GEKAS et al., 2005).

2.6 Saco vitelino

A formação do saco vitelino inicia-se quando o hipoblasto (endoderma prospectivo) sofre deslocamento e delamina-se dando origem à cavidade de blástula. O mesoderma formado no botão embrionário primitivo migra entre o epiblasto e o hipoblasto. Isto transforma a blástula em uma estrutura de três camadas. O epiblasto é então transformado no trofoblasto do córion. A cavidade

forrada pelo endoderma é o saco vitelino. Este completa seu desenvolvimento, no momento em que a porção extra-embrionária de celoma se alarga. Assim, o saco vitelino é uma esplancnopleura, a qual inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica. Constituído por células originadas a partir do disco embrionário, ele forma inicialmente uma camada fina de ectoderma (saco vitelino uni laminar ou onfalopleura). Subseqüentemente, a migração de células das camadas internas do endoderma para o ectoderma forma o saco vitelino bilaminar e, finalmente, o crescimento do mesoderma entre os dois primeiros dão origem ao saco vitelino trilaminar (MOSSMAN, 1987).

De acordo com Latshaw (1987), em mamíferos domésticos, o saco vitelino é transitório. Possui varias funções importantes, tais como nutrir a placenta permanente até que esta estivesse formada, sendo importante nos eqüinos e carnívoros. Alguns dos vasos sanguíneos vitelínicos dentro do embrião são mantidos como principais vasos sanguíneos viscerais no adulto. Sua parte endodérmica dá origem às células germinativas primordiais que posteriormente migram para as gônadas, as quais também apresentam características de células produtoras de hormônios esteróides.

De acordo com Wang et al. (2008), primeiramente, a hematopoiese no homem é iniciada durante a terceira semana pelo saco vitelino extra-embrionário, caracterizado pela produção de eritrócitos nucleados, *in situ*. Como no caso de outros vertebrados, é também caracterizado por uma nova geração de células tronco hematopoiéticas intra-embrionárias, seguido pela migração e colonização do fígado fetal para posteriormente, uma maior maturação e ampliação deste.

O desenvolvimento embrionário normal é extremamente dependente do bom funcionamento do saco vitelino, desde o transporte pela camada de endoderme, metabolização de macromoléculas maternais e síntese de proteínas séricas, e a camada de mesoderme que produz as primeiras células sanguíneas dentro das ilhas sanguíneas (JOLLIE, 1990). Todas as células sanguíneas são derivadas das células tronco hematopoiéticas. Essas células tronco representam em grande parte, uma quiescente população que demonstram auto-renovação (PALIS; YODER, 2001).

Há uma mudança no tempo e espaço nos principais locais de hematopoiese durante o desenvolvimento humano. As células sanguíneas surgem inicialmente, no saco vitelino, seguidos seqüencialmente pelo fígado fetal e, finalmente, o

desenvolvimento em ossos longos (KELEMEN; CALVO, 1979; CHARBORD et al., 1996). Como no rato, o saco vitelino em humanos origina a diferenciação primitiva de eritroblastos e macrófagos (PALIS; YODER, 2001).

As células tronco do saco vitelino possuem morfologia homogênea e são primitivas e, portanto não expressam marcadores de células maduras na sua superfície ou antígenos codificados pelo MHC (complexo de histocompatibilidade principal) associados à rejeição de enxertos de tecidos. Durante o desenvolvimento, células tronco do saco vitelino migram temporariamente para o fígado fetal e finalmente localizam-se na medula óssea, local permanente de formação de células sanguíneas. Com a partida de célula tronco, o saco vitelino se atrofia. (HOLLANDS, 1987).

O papel do saco vitelino na biologia das células tronco hematopoiéticas ainda não está claro. Os autores demonstram que o saco vitelino, onde derivam células tronco hematopoiéticas imaturas, podem repovoar recipientes recém-formados, contribuindo para a hematopoiese durante o desenvolvimento normal adulto (MIKKOLA et al., 2005).

3 OBJETIVO

Isolar células tronco proveniente de líquido amniótico, alantóide e do conteúdo vitelino para suas respectivas caracterizações e estudar seu potencial de diferenciação *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODO

Após aprovação do comitê de bioética, o trabalho experimental, foi conduzido como mostra o texto a seguir.

4.1 Animais

Para a análise das células tronco mesenquimais do líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino, foram utilizados 10 úteros de cadelas gravídicas com raça definida ou sem raça definida (SRD), oriundas de campanhas de castração, efetuadas na cidade de São Paulo. Os úteros gravídicos tinham idades gestacionais variadas (entre 25 e 55 dias). As cadelas foram submetidas a técnica de ovário salpingo histerectomia (OSH), para esse procedimento foram sedadas com 0.1mg/kg de acepromazina (Acepran®, Univet, São Paulo, Brazil), 0.5mg/kg xylazina (Anasedan®, Vetbrands, Jacareí, Brazil) and 20mg/kg ketamina (Dopolen®, Vetbrands, Jacareí, Brazil), pelos médicos veterinários responsáveis pelos procedimentos cirúrgicos.

Todo material coletado foi acondicionado em isopor com gelo e transportado para o Laboratório de Células Tronco do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP e/ou para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan. Os úteros foram seccionados cirurgicamente para a retirada das placentas, então foi coletado o material (líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino), e depois, os embriões ou fetos foram fotografados e mensurados pela técnica preconizada por Evans e Sack (1973) (Figura 1). A mensuração foi realizada com auxílio de um paquímetro, da crista nucal até a primeira vértebra sacral, para a obtenção da escala CROW-RUMP.

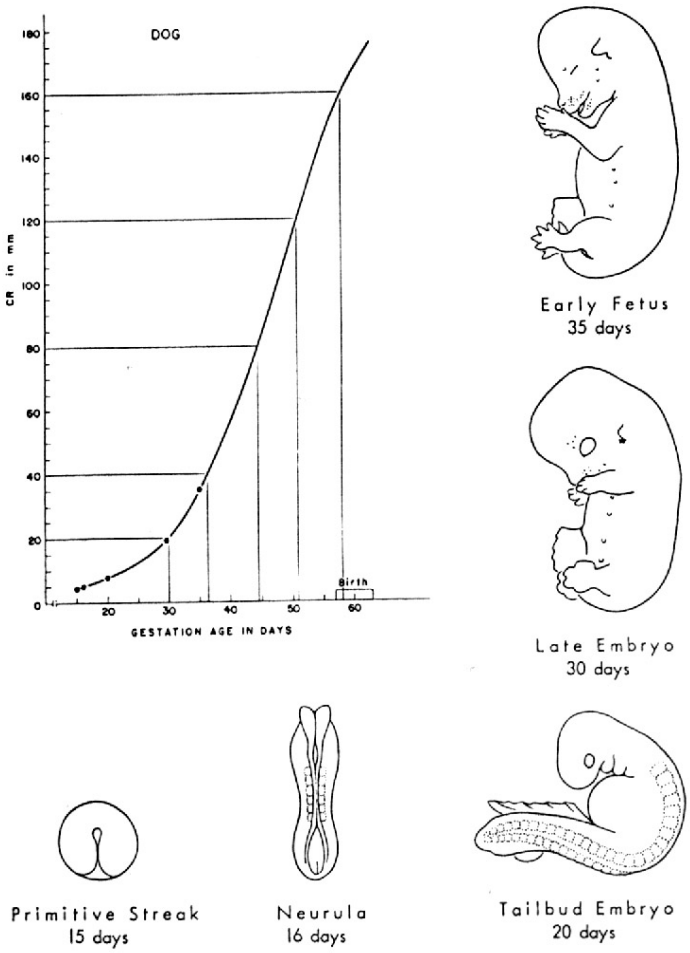

Figura 1- Fonte: Evans e Sack (1973). Gráfico demonstrativo da curva de crescimento de embrião e feto da espécie canina, através da metodologia de *crow-rump*

4.2 Coleta do material

O líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino foram coletados por punção, (Figura 2) com seringas e agulhas estéreis, sob condições assépticas, após OSH, das placentas de 10 cadelas adultas. A seguir, tabela 1, com identificação de raça da cadela, dias aproximados de gestação (seguindo através da metodologia de *crow-rump*) e quantidade do material coletado.

Tabela 1- Demonstrando as cadelas, suas respectivas raças, dias de gestação e a quantidade do material coletado de uma soma dos fetos

Tabela mostrando as cadelas, suas respectivas raças, dias de gestação e a quantidade do material coletado de uma soma dos fetos.

Cadela	Raça	Dias aproximados de gestação	Quantidade de material coletado – alantóide (ml)	Quantidade de material coletado – amniótico (ml)	Quantidade de material coletado – conteúdo vitelino (ml)
1	SRD	30	> 30	> 10	<0,5
2	Pit Bull	35	>30	> 10	-
3	SRD	40	-	> 10	-
4	Dálmata	30	> 30	> 10	>0,5
5	SRD	45	-	< 10	-
6	SRD	25	-	> 10	>0,5
7	SRD	45	< 30	< 10	-
*8	SRD	50	< 30	<10	-
9	SRD	30	> 30	> 10	-
10	SRD	25	>30	> 10	>0,5

*Única cadela prenhe, que obtive sucesso na caracterização das células.

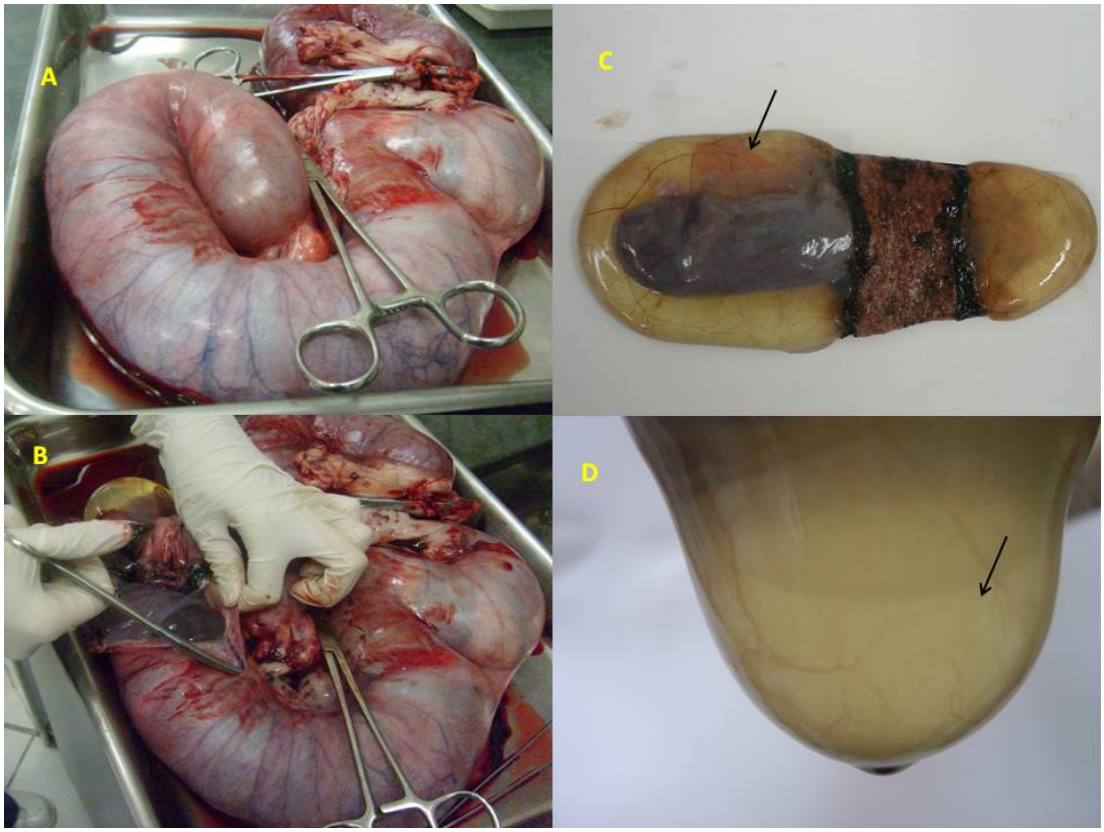

Figura 2: Foto ilustrativa da coleta útero de cão com idade gestacional aproximada de 40 dias. Em A e B útero gestante. Em C saco alantoideano (seta preta) em D o grande volume alantoídeano (seta preta)

4.3 Processamento do material

Para o isolamento das células derivadas do líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino, as amostras foram centrifugadas separadamente em tubos falcon, em 1000rpm, por 7 minutos, resultando em pellets, foram suspendidas em meio ALFA-MEM, todas as células isoladas de cada amostra, foram colocadas em frascos de cultura de 25cm3 (Nunc, Rochester, MN) contendo ALFA-MEN suplementado com 100U/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina (Gibco), 1% de L-glutamina, 1% de aminoácidos não essenciais, 15% de soro Hyclone. Após 24 horas as células não aderentes foram removidas por meio de lavagem, 2 vezes com PBS e depois, troca de meio de cultura. As células foram cultivadas até atingirem semi-confluência. As células foram mantidas na estufa de CO_2 (5%), em atmosfera úmida, temperatura 37°C. Em seguida uma parte das células foram congeladas contando a passagem 1 e guardadas no Nitrogênio líquido, enquanto a outra parte foi repicada várias vezes a fim de expandir a cultura sob condições descritas acima.

Até o estabelecimento do meio de cultivo descrito acima, alguns outros protocolos foram testados (Quadro 1)

Meios testados para protocololizar meio de cultivo das células isoladas dos líquido amniótico e alantóide de fetos caninos

Meios	Antibiótico-1%	L-glutamina	Aminoácidos não essenciais	Alfa-MEN	DMEN-H	D-MEN-L	SFB	Hyclone	Knokout
1	X	X				X	X		
2	X	X	X			X	X		
3	X	X	X			X		X	
4	X	X	X		X		X		
5	X	X	X		X				X
6	X	X	X	X				X	

Quadro 1- Meios utilizados durante a padronização de um meio ideal para cultivos das células tronco oriunda do líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino

4.4 Protocolo de imunofluorescência

As células isoladas do líquido amniótico e do líquido alantóide previamente cultivadas sobre lamínulas até confluência de 70% foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sisma) por no mínimo 2 horas. As lamínulas foram lavadas três vezes com TBS: 20mM Tris-HCl (Vetec, Duqye de Caxias, RJ, BR), pH 7,4, 0,15 M, NaCl (Dinâmica Reagent, São Paulo, SP, BR), Tween-20 a 0,05% (Sigma). Para a permeabilização das células incubamos a lamínula por 15 minutos em solução de 0,1% de Triton X-100 (Santa Cruz Biotechnology). Após nova lavagem com TBS as células foram incubadas por 30 minutos em solução de BSA a 5% (*Bovine Serum Albumin* – Sigma). Os anticorpos primários (Quadro 2) foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente.

ANTICORPOS	ESPÉCIES QUE REAGEM	EMPRESA
Oct-3/4 (Sc-5279) Diluição 1:100	HUMANO CAMUNDONGO/RATO	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A).
Vimentin (Type: V9, sc-6260), diluição 1:500.		Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A).
Cytokeratin piptide 18,(C1399) diluição 1:500.	HUMANO	Sigma
Nestin (ab5922) Diluição: 1:500.	HUMANO	Millipore

Quadro 2 - Anticorpos primários utilizados para caracterizar as células progenitoras do líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino através da técnica de imunocitofluorescência

Após 1 hora da adição do anticorpo primário, as células foram lavadas com TBS e incubadas por 1 hora, em câmara escura, com o anticorpo secundário

conjugado com FITC (fluorescein isothiocyanate) na diluição 1:500. As lamínulas receberam uma gota do meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Hercules, CA, EUA) com DAPI (4´6-Diamidino-2-phenylindole) sendo acomodadas em lâminas histológicas de vidro e posteriormente analisadas em microscópio confocal. As lâminas controle foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. (Quadro 3)

ANTICORPOS	ESPÉCIES QUE REAGEM	EMPRESA
anti-Mouse IgG –FITC conjugated (AP308F) Dilution 1:100	CAMUNDONGO	Amersham Biosciences
Anti-Rabbit IgG-FITC CONJUGATED (AP308F) Dilution 1:100	COELHO	Amersham Biosciences
anti-Gouti IgG- FITC CONJUGATED (SC2356) Dilution 1:100	CABRA	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, U.S.A).

Quadro 3 - Anticorpos secundários utilizados para caracterizar as células progenitoras do líquido amniótico, líquido alantóide e conteúdo vitelino através da técnica de imunofluorescência

4.5 Protocolos de diferenciação

Seguindo o trabalho de caracterização das células, foram feitas algumas diferenciações celulares, sendo elas, osteogênica, condrogênica e adipogênica.

4.5.1 Diferenciação osteogênica

Cerca de $5x10^3$ de células isoladas a partir do líquido amniótico e líquido alantóide de fetos caninos, foram cultivadas em placas de 6 wells. Após 24 horas, o meio basal foi substituído pelo meio de diferenciação DMEM-Low Glicose (DMEM-LG) suplementado com 2% de soro Knockout (Gibco), 1% Penicilina/Streptomicina e

com os indutores osteogênicos (100 µM dexametasona e 50 µM de 2-fosfato ácido ascórbico, todos da Sigma-Aldrich). As trocas de meio foram realizadas a cada três ou quatro dias, de acordo com as necessidadesa observadas diariamente. A cultura controle foi mantida com DMEM-LG, 2% de soro Knockout, 50µM de 2-fosfato ácido ascórbico e 1% de Penicilina/ Estreptomicina. No décimo dia da diferenciação, ambos os meios da cultura (experimental e controle) foram refeitos sendo suplementados com 200mM de β-Glicerolfosfato. Após 21 dias de cultivo, as amostras foram avaliadas pela coloração de *von Kossa*, para determinar a deposição mineral de acordo como descrito por Lennon et al., (1996).

4.5.2 Diferenciação adipogênica

Para diferenciação adipogênica, cerca de $1x10^5$ células foram cultivadas em placas de 6-wells, com procedimentos semelhantes à diferenciação osteogênica. O meio para diferenciação foi composto por DMEM-HG, com 10% soro fetal bovino (Hyclone), 0,25M isobutilmetilxantina, 10 µM insulina e 1% penicilina. A troca do meio indutor foi feita duas vezes por semana e mantido por 20 dias. Após este período, as células foram fixadas por 60 minutos a temperatura ambiente com paraformaldéido 4% e lavadas algumas vezes com etanol 70%. Para fossem coradas, elas foram encubadas a temperatura ambiente por cinco minutos com Oil Red O, o excesso de corante foi retirado em algumas lavagens com água destilada, como descrito por Zuk et. al. (2001).

4.5.3 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, cerca de $8x10^4$ células/mL serão centrifugadas em tubo de polietileno a 300 x g. O meio para diferenciação foi composto por DMEM-HG, com 1% soro fetal bovino (Hyclone), 6.25 µM insulina, 10 ng/ml TGF-□1 e 1% penicilina. A troca do meio indutor será realizada todos os dias e mantido por 21 dias. Após este período, as amostras serão fixadas a temperatura ambiente com paraformaldéido 4% e então seccionadas com o auxílio de um

micrótomo. As lâminas foram então preparas, e algumas submetidas à coloração com Azul de Toluidina como descrito por Zuk et al.,. (2001) e outras ao Tricomo de Masson.

4.6 Protocolo de curva de crescimento

A capacidade de proliferação *in vitro* das células isoladas a partir do líquido amniótico e alantóide de fetos caninos foram avaliada através do método de duplicação celular (do inglês, cell doubling), previamente descrito por Vidal et. al. (2006). As células cultivadas em garrafas T25 com meio basal atingindo confluência de aproximadamente 70%, neste ponto, foram tripsinizadas e contadas com o auxílio da câmara de Newbauer, estas células forão então replaqueadas, em duplicata, sob a densidade de $1x10^5$ células em novas garrafas T25. A cada três dias, elas foram novamente tripsinizadas, contadas e replaqueadas. Este processo se inicia a partir da passagem dois (P2) até se finaliza na passagem 23 (P23).

5 RESULTADOS

Após metodologia estabelecida, foram observados, diferentes resultados entre os meios cultivados.

5.1 Isolamento dos tecidos para obtenção das células

Para o isolamento de células do líquido amniótico, alantóide e conteúdo vitelino foram utilizados 10 úteros gravídicos em diferentes idades gestacionais sendo 2 com raças definida (dálmata e pit bull) e 8 sem raça definida (Tabela 1). O volume total de amostra dos fluídos é um fator primordial para o isolamento das células do âmnio, alantóide e saco vitelino, foi observado que o volume dos fluídos fetais variou entre as idades fetais e entre os tecidos (Figura 3 e 4 A, B, C e D)

Foram utilizados dois métodos de isolamento para as células dos líquidos alantóide e amniótico. Para o isolamento das células do líquido amniótico e alantóide foram obtidos melhores resultados ao utilizar líquidos de aspecto transparente e de coloração amarelada (Figura 3). Verificou-se uma grande quantidade de precipitado celular e debris no fluído amniótico e alantóide, por este motivo a coleta foi realizada na porção superior da bolsa amniótica e da bolsa alantoidea para não puncionar os debris e evitar possível contaminação. Para o isolamento do conteúdo vitelino foram utilizados 4 úteros gravídicos com idades gestacionais entre 25 e 30 dias (Figura 4 A e D). A coleta foi difícil devido ao pequeno volume da amostra presente no saco vitelino, aproximadamente 0,5 mL do conteúdo vitelino do total de fetos.

O primeiro isolamento utilizou somente as células resultantes da centrifugação dos fluídos, enquanto que o segundo foi utilizado todo o fluido fetal. Com base nestas informações o isolamento de células só foi eficiente no útero com 50 dias de gestação (útero gravídico 8), num total de 10 fêmeas gestantes (TABELA 1), para âmnio e alantóide, sendo utilizado o fluído fetal total para expansão das células. Para o conteúdo vitelino, o volume da amostra foi muito pequeno e o isolamento não foi possível.

Figura 3 - Na seqüência o volume da amostra coletada dos líquidos alantóide (A) amniótico (B) e vitelino (C) de cães com idade gestacional de aproximadamente de 40 dias

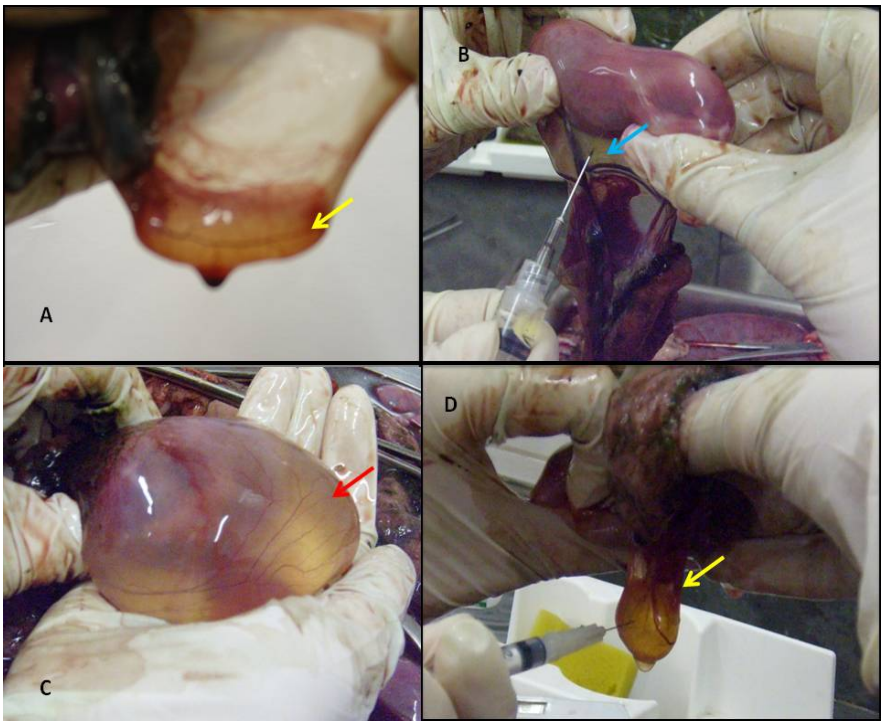

Figura 4 - Fotos ilustrativas dos fluidos fetais de cães com idade gestacional aproximada de 30 dias. Em A e D o conteúdo vitelino, em B o conteúdo amniótico e em C o grande volume de líquido alantóide

5.2 Características de isolamento com diferentes meios de cultivo

Foram testados seis meios de cultivo com o intuito de estabelecer um meio ideal para o cultivo das células do líquido amniótico e alantóide (Quadro 1). Os resultados obtidos demonstraram que somente o meio de número 6 foi capaz de estabelecer e manter cultura das células do liquido amniótico e alantóide. Não sendo eficiente para saco vitelino. As células do líquido amniótico e alantóide ao serem cultivadas com os meios de cultivos 1, 2, 3, 4 e 5 foram observados baixa capacidade de expansão celular com células com características de células diferenciadas e sinais de apoptose (Figura 5 e 6). A utilização do meio possibilitou o estabelecimento da cultura e expansão das células com morfologia semelhante a fibroblastos do líquido amniótico e líquido alantóide. Portanto optou-se por utilizar o meio composto por Alfa-MEM e soro HyClone adicionado dos componentes básicos como antibiótico, aminoácidos não essenciais e L-glutamina.

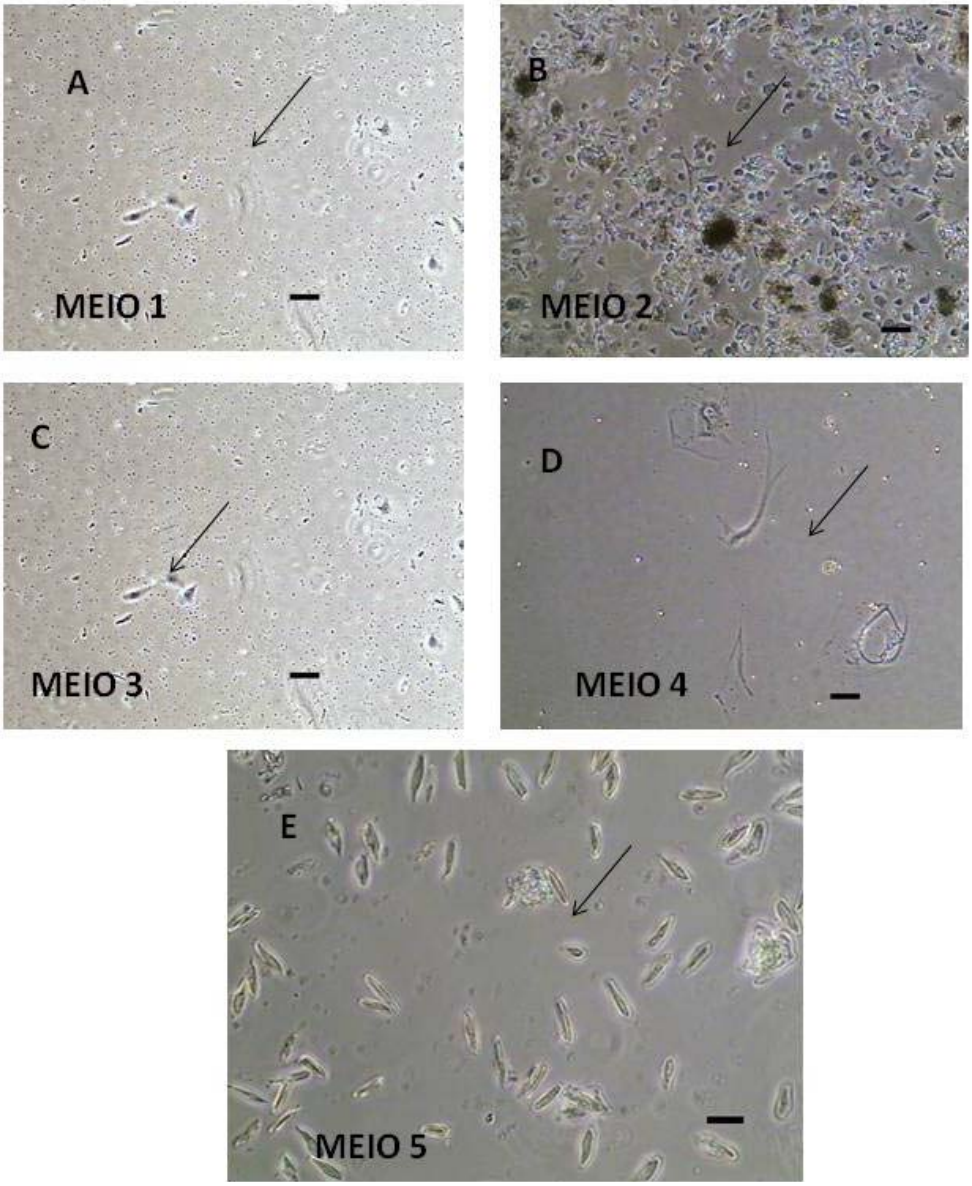

FIGURA 5: Diferentes meios de cultivo utilizado para isolar as células progenitoras do líquido alantoídeano. Observar a baixa capacidade de expansão das células ao utilizarem os respectivos meios de cultivo

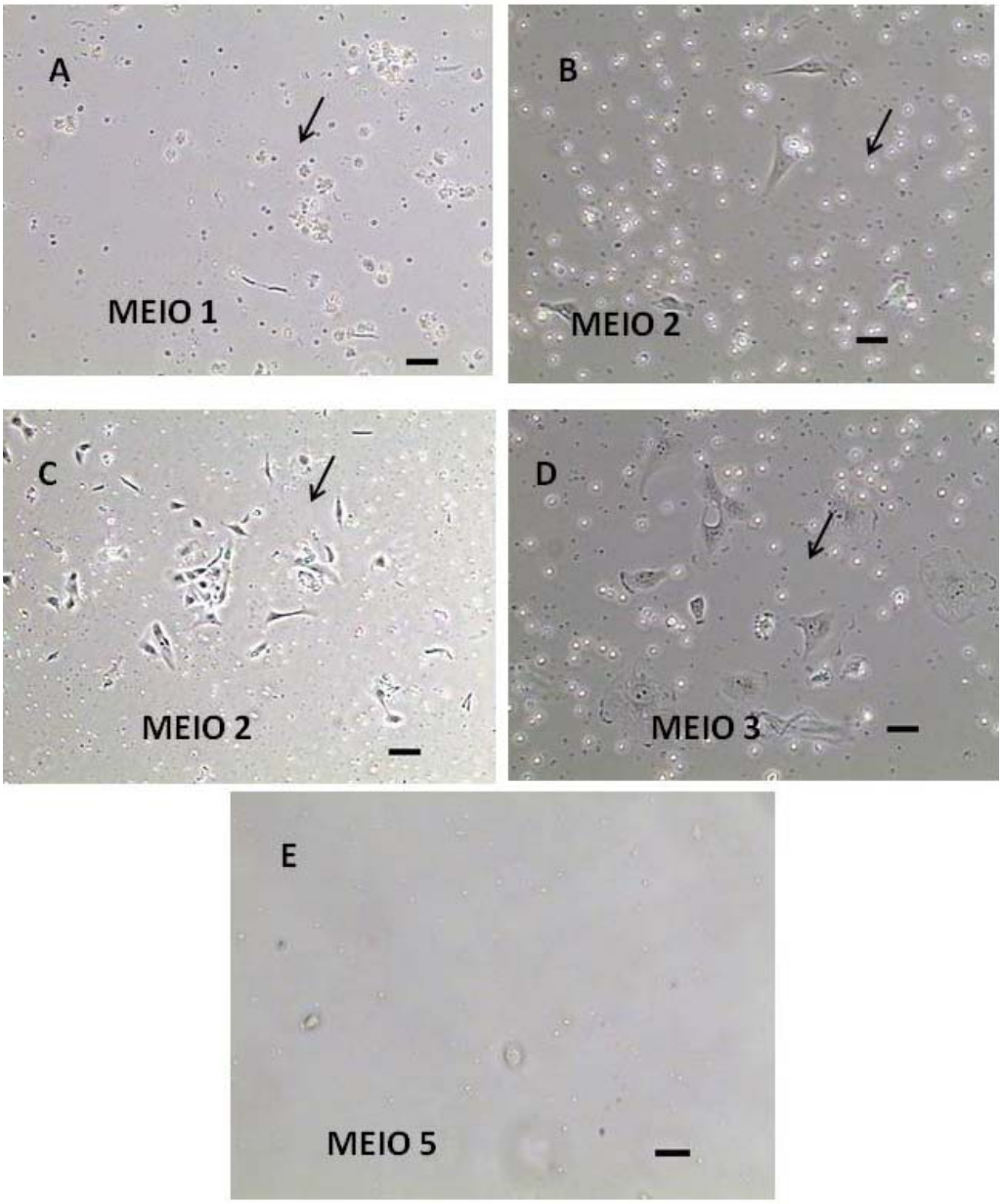

FIGURA 6: Diferentes meios de cultivo utilizado para isolar as células progenitoras do líquido amniótico. Observar a baixa capacidade de expansão das células ao utilizarem os respectivos meios de cultivo

5.3 Conteúdo vitelino

O conteúdo vitelino, de muito pouco volume, foi coletado e estudado apenas suas características de isolamento.

5.3.1 Características de isolamento com diferentes meios de cultivo

O conteúdo vitelino (no máximo 1ml) foi transferido para placas de 33mm de diâmetro com o meio de cultivo. Depois de realizado o plaqueamento, não foi possível observar a adesão de muitas células na placa de cultivo ao utilizar os meios de cultivo 1, 2, 4 e 6 e derivadas dos fetos com idades gestacionais entre 25 e 30 dias. Estas se mantiveram viáveis somente por 3 dias em cultivo, o que impossibilitou a expansão das células. Ao utilizar o meio de cultivo 6 observamos a adesão de poucas células, no entanto apresentaram características de células diferenciadas, que não proliferaram e logo em seguida, sofreram apoptose, impossibilitando a obtenção da cultura de células (Figura 7). Após várias tentativas desistimos do isolamento das células tronco mesenquimais do conteúdo vitelino.

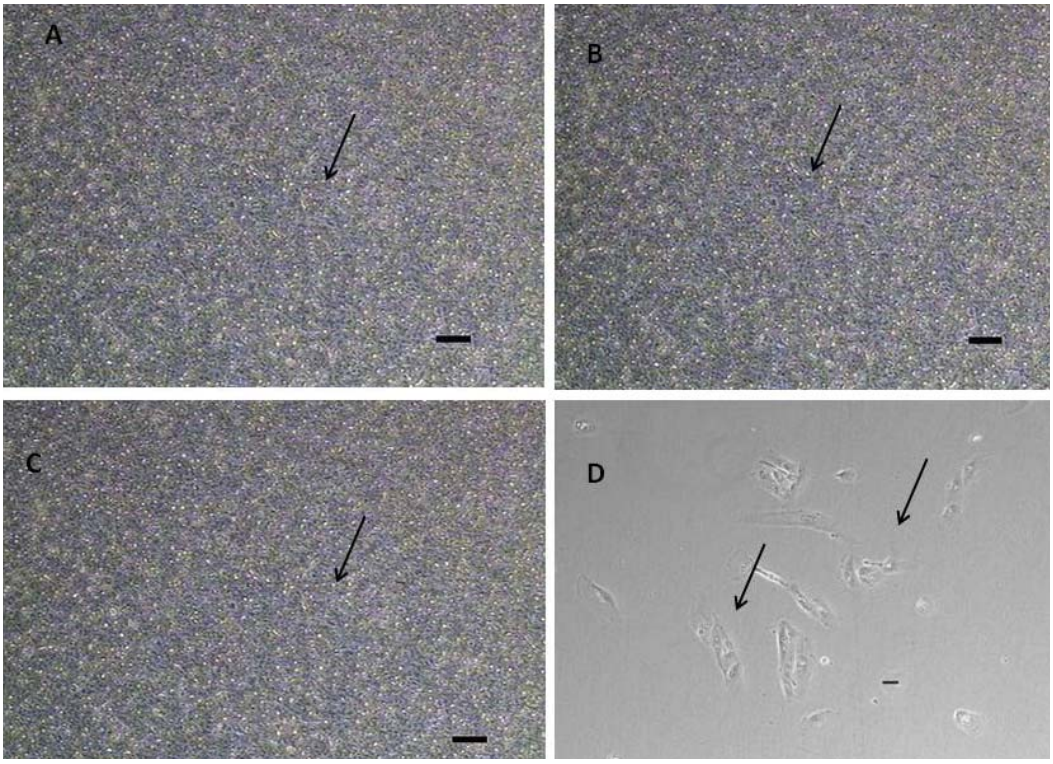

Figura 7: Fotomicrografia das células derivadas do conteúdo vitelino. Em A meio 1, em B meio 2, e em C meio 4 (setas pretas). Somente em D, meio 6, observa-se a presença de células aderentes com morfologia de células diferenciadas (setas pretas)

5.4 Líquido amniótico

Para o isolamento das células do fluído amniótico, 2mL deste fluído foi transferido para garrafas de cultivo T25, com meio de cultivo 6. Nos primeiros dias de cultivo era possível visualizar grande quantidade de debris não aderentes. Após 7 dias, o sobrenadante foi desprezado e foram observados a adesão de células com morfologia fibroblastoide, permanecendo em cultivo (FIGURA 8). As células progenitoras do líquido amniótico estavam com um formato mais alongado nas extremidades e núcleo bem arredondado. Estas células apresentaram alta capacidade de expansão e decorrido mais 4 dias foi realizado o primeiro repique celular.

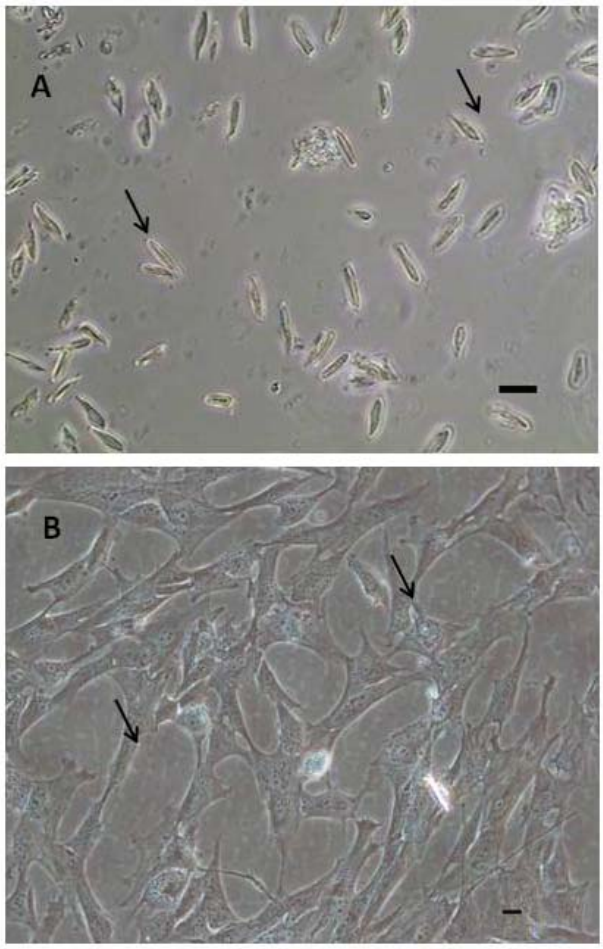

Figura 8. Fotomicrografia das células progenitoras do liquido amniótico cultivadas em meio 6. Em A debris celulares encontrados com 2 dias de cultura (seta). Em B células com morfologia fibroblastoíde das células progenitoras do líquido amniótico (seta)

5.4.1 Curvas de crescimento

As células progenitoras do líquido amniótico tiveram um potencial de expansão limitado *in vitro*, desta forma os resultados da curva de crescimento foram insatisfatórios, sendo que na passagem 3, já não haviam mais células, indicando que essas células não tem capacidade desejável de proliferação.

5.4.2 Características imunofenótipicas (imunofluorescência)

O imunofenótipo das células progenitoras do líquido amniótico cultivado em meio 6 com 50 dias de gestação foi realizado através dos ensaios de imunofluorescência com os anticorpos monoclonais Oct-3/4 (fator de transcrição de pluripotência) e marcadores citoplasmáticos de proteínas de filamento intermediário como: vimentina (característico de células mesenquimais e fibroblastos), nestina (característico de células progenitoras neuronal) e citoqueratina (característico de células epiteliais). As células progenitoras do líquido amniótico foram imunopositivas para vimentina, apresentando uma marcação de citoesqueleto de células, nestina e citoqueratina-18 (Figura 9, 10 e 11), sendo negativas para Oct-3/4.

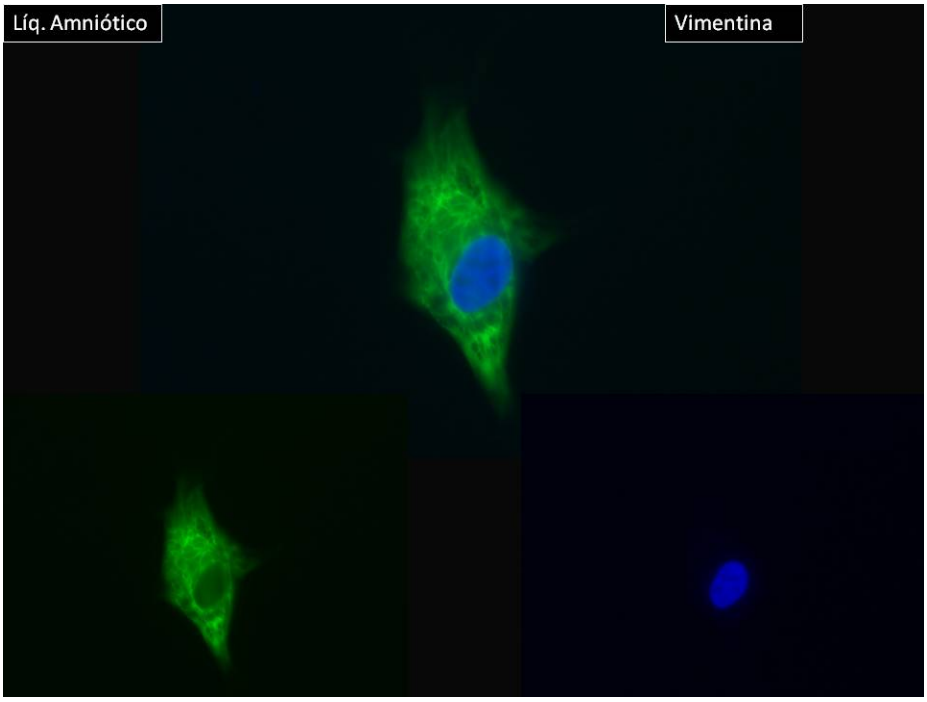

Figura 9 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo vimentina nas células progenitoras do líquido amniótico em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo vimentina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse azul- núcleo corado com DAPI*).

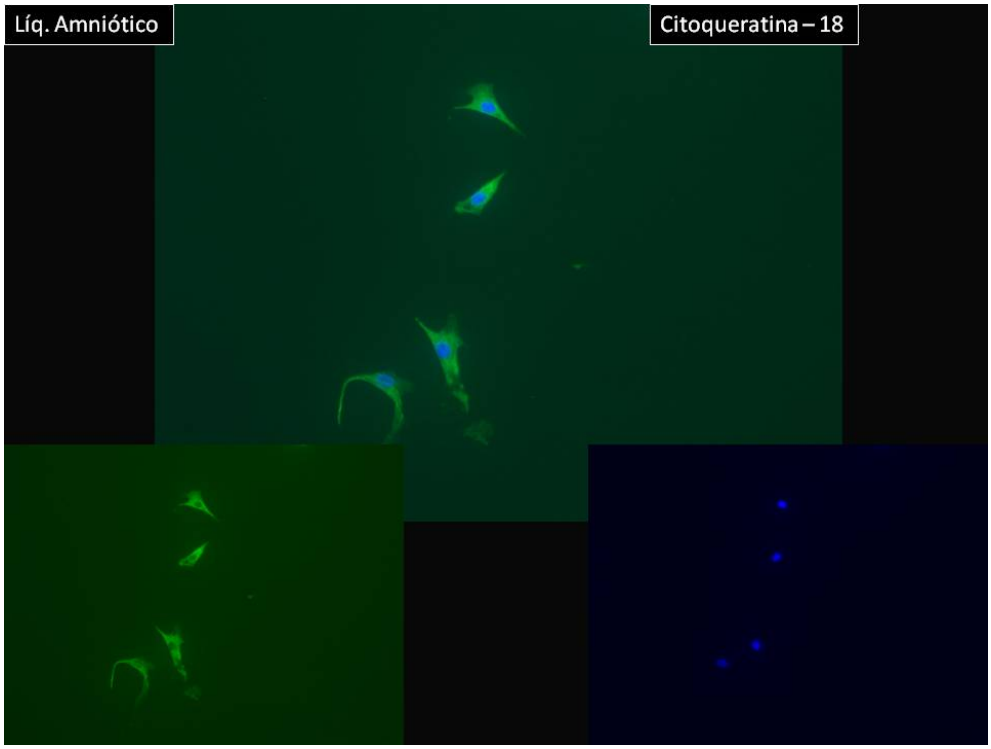

Figura 10 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo citoqueratina nas células progenitoras do líquido amniótico em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo citoqueratina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-mouse azul- núcleo corado com DAPI*)

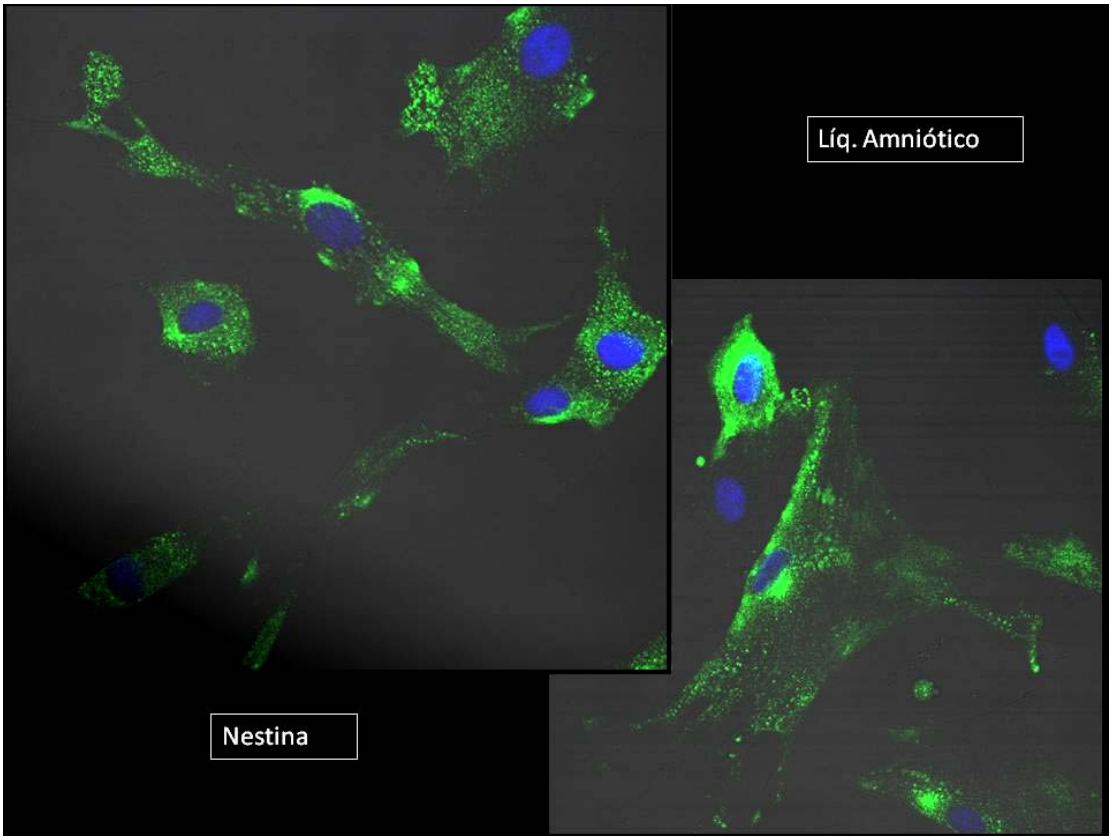

Figura 11 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo nestina nas células progenitoras do líquido amniótico em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo nestina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit azul- núcleo corado com DAPI*)

5.4.3 Potencial de diferenciação

As células progenitoras do líquido amniótico com 50 dias de gestação cultivadas em meio 5 foram capazes de diferenciar em tecidos ósseos, cartilaginosos.

A diferenciação osteogênica foi mantida por 21 dias e após este período foi observado à formação de matriz extracelular através da coloração de VON-KOSSA (Figura 12). A diferenciação condrogênica também foi eficiente para as células progenitoras do líquido amniótico. A formação de uma micromassa celular ocorreu a partir de $2x10^6$ células progenitoras do líquido amniótico em cultivo celular suspensão em tubo de polipropileno de 15ml. As células foram incluídas em paraplast com 21 dias de cultura. Nos cortes histológicos corados com Azul de

Toluidina foi observada celularidade e as proteoglicanas da matriz extracelular. As fibras colágenas foram demonstradas através da coloração Tricromo de Masson (Figura 13). As células progenitoras do líquido amniótico não foram capazes de diferenciar em adipócitos quando induzidas com meios específicos. Foram observados foram células com morfologia semelhante a neurônios (Figura 14).

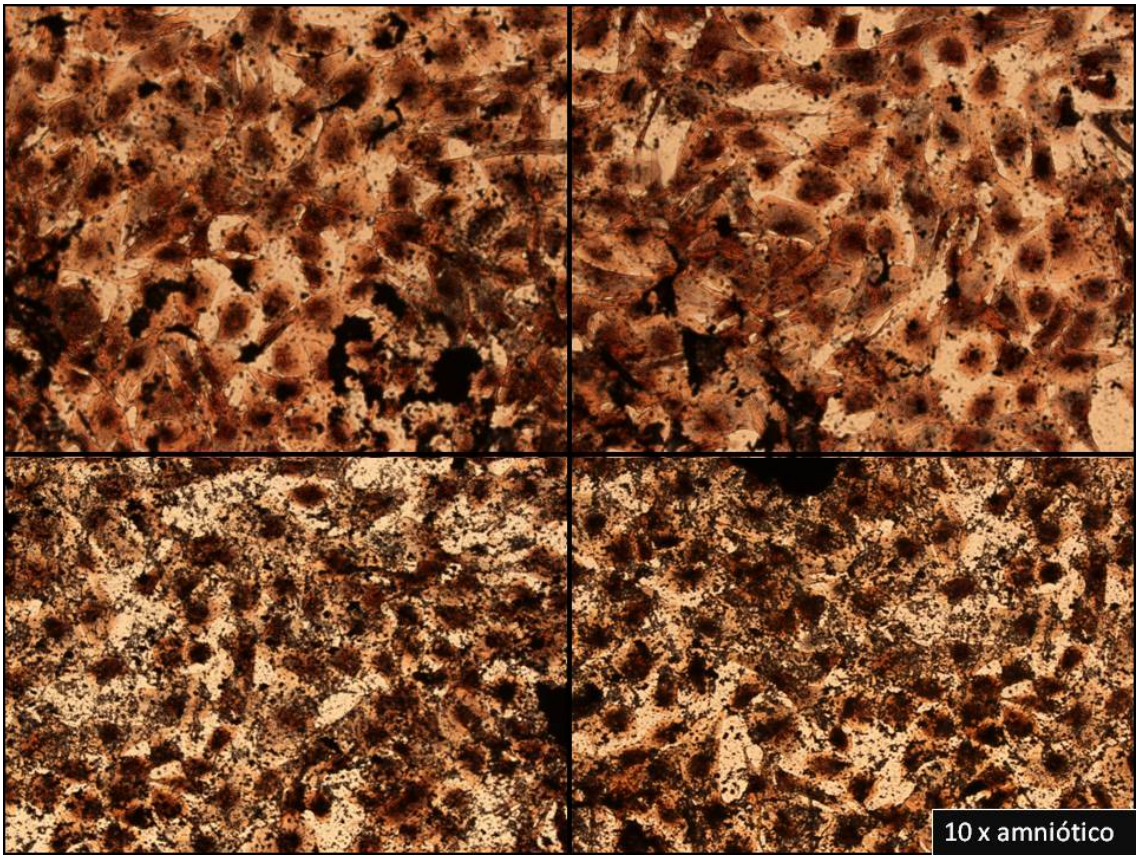

Figura 12 - Fotomicrografia da diferenciação osteogênica das células progenitoras do liquido amniótico. Em A, B, C e D células diferenciadas em osteócitos coradas pelo método de Von Kossa, na seta áreas de calcificação.

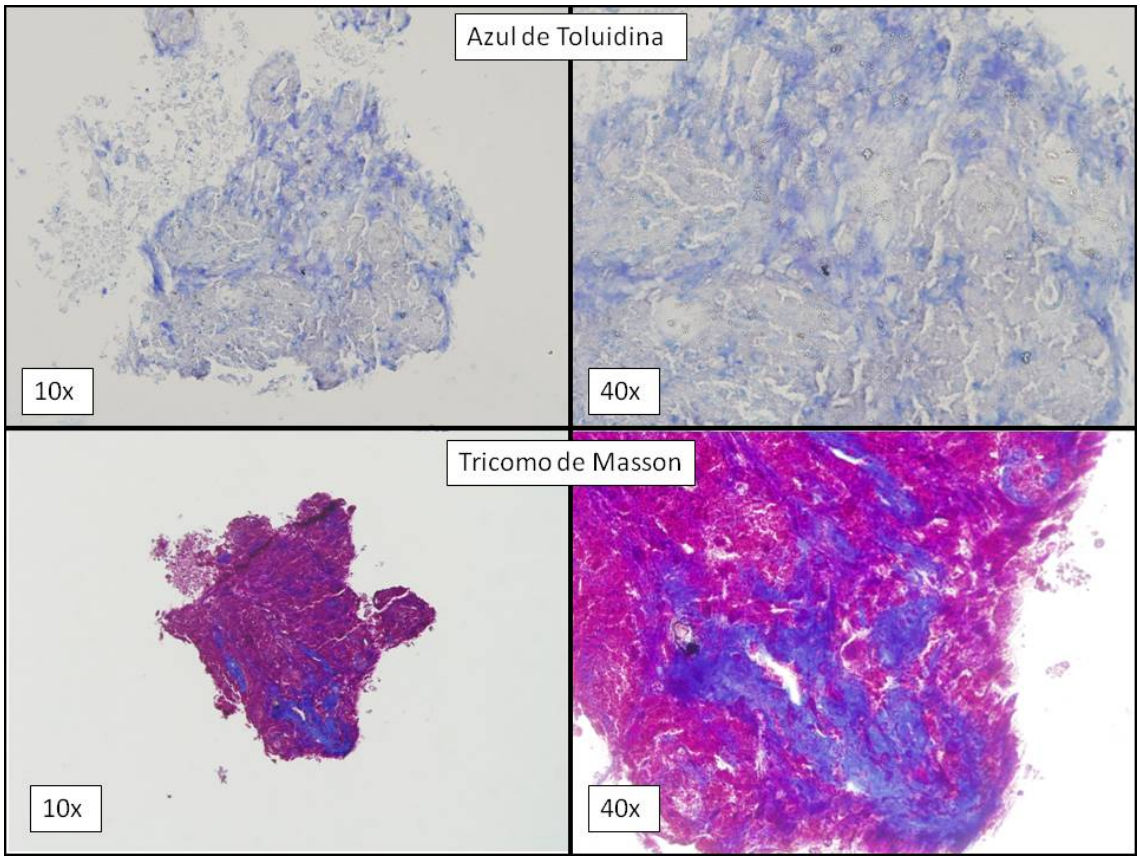

Figura 13 - Fotomicrografia da diferenciação condrogênica das células progenitoras do liquido amniótico coradas pela técnica de Azul de Toluídina e Tricromo de Massom. Em A e B micromassa celular obtida a partir da diferenciação condrogênica com 21 dias de cultivo aumento verificar a pequena celularidade (seta preta). Em C e D fibras colágenas (seta preta)

Figura 14: Fotomicrografia das células do líquido amniótico, morfologicamente semelhantes a células neuronais, cultivadas em meio indutor adipogênico. Em A e B, setas indicando as células semelhantes a neuronais

5.5 Líquido alantóide

Para o isolamento das células do líquido alantóide, 2mL deste fluido foi transferidos para garrafas de cultivo T25 com meio de cultivo 6. Nos primeiros dias de cultivo havia grande quantidade de debris não aderentes. Após 7 dias o sobrenadante foi desprezado e foram observados a adesão de células com morfologia fibroblastoíde permanecendo em cultivo. As células progenitoras do líquido alantóide estavam com um formato mais alongado nas extremidades e núcleo bem arredondado (Figura 15).

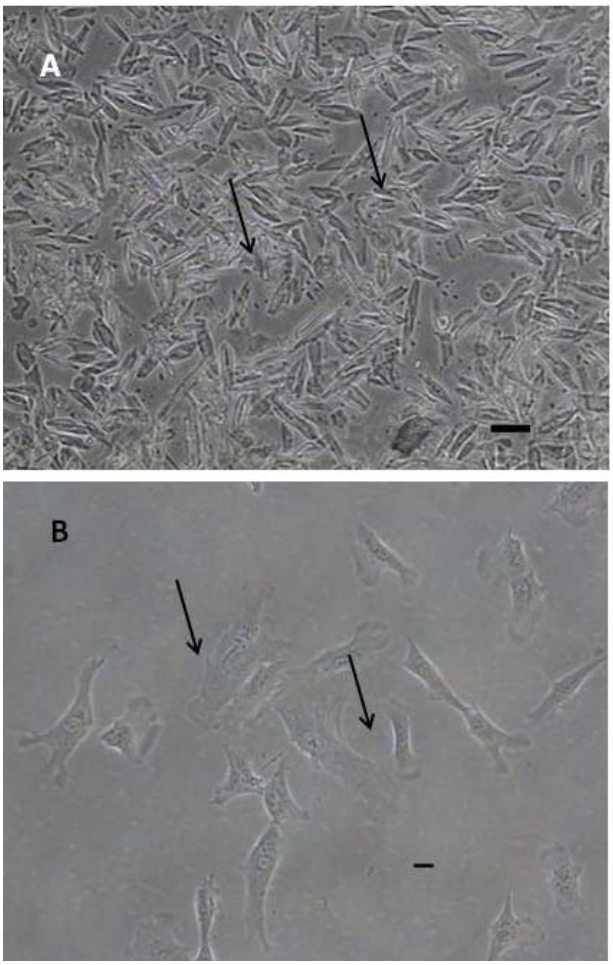

Figura 15: Fotomicrografia das células progenitoras do liquido alantoídeano cultivadas em meio 6. Em A debris celulares encontradas com 2 dias de cultura (seta). Em B células com morfologia fibroblastoíde das células progenitoras do (seta)

5.5.1 Curva de crescimento

As células progenitoras do líquido alantóide tiveram um potencial de expansão limitado *in vitro*, desta forma os resultados da curva de crescimento foram insatisfatórios, sendo que quando chegou na passagem 4, já não haviam mais células na garrafa de cultivo, característica essa, indesejável para a cultura das células tronco.

5.5.2 Características imunofenótipicas (imunofluorescência)

O imunofenótipo das células progenitoras do líquido alantoideano cultivado em meio 6 com 50 dias de gestação foi realizado através dos ensaios de imunofluorescência com os anticorpos monoclonais Oct-3/4 (fator de transcrição de pluripotência) e marcadores citoplasmáticos de proteínas de filamento intermediário como: vimentina (característico de células mesenquimais e fibroblastos), nestina (característico de células progenitoras neuronal) e citoqueratina (característico de células epiteliais). As células progenitoras líquido alantóide foram imunopositivas para vimentina, apresentando uma marcação de citoesqueleto de células, nestina e citoqueratina-18 (Figura 16, 17 e 18), sendo negativas para Oct-3/4.

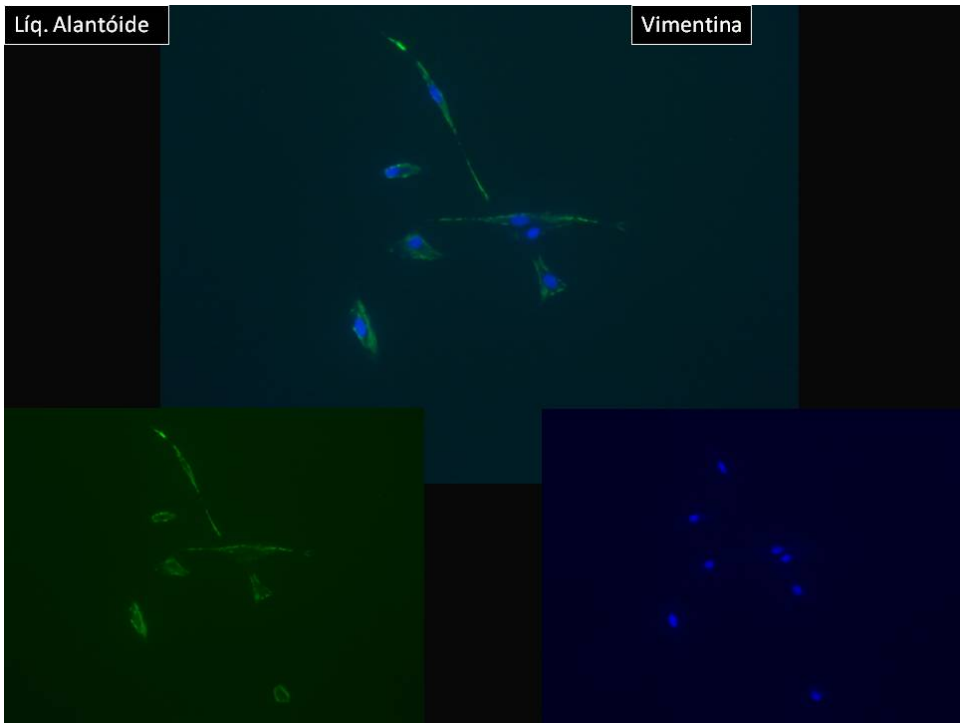

Figura 16 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo vimentina nas células progenitoras do líquido alantoídeano em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo vimentina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit azul- núcleo corado com DAPI*)

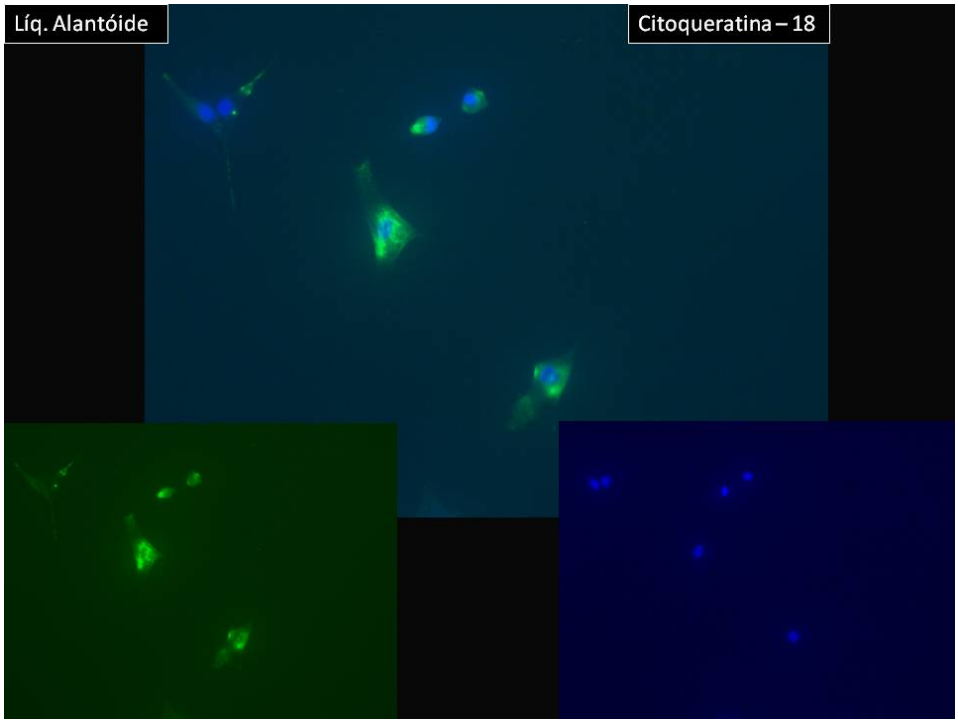

Figura 17 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo citoqueratina nas células progenitoras do líquido alantoídeano em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo vimentina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit azul- núcleo corado com DAPI*)

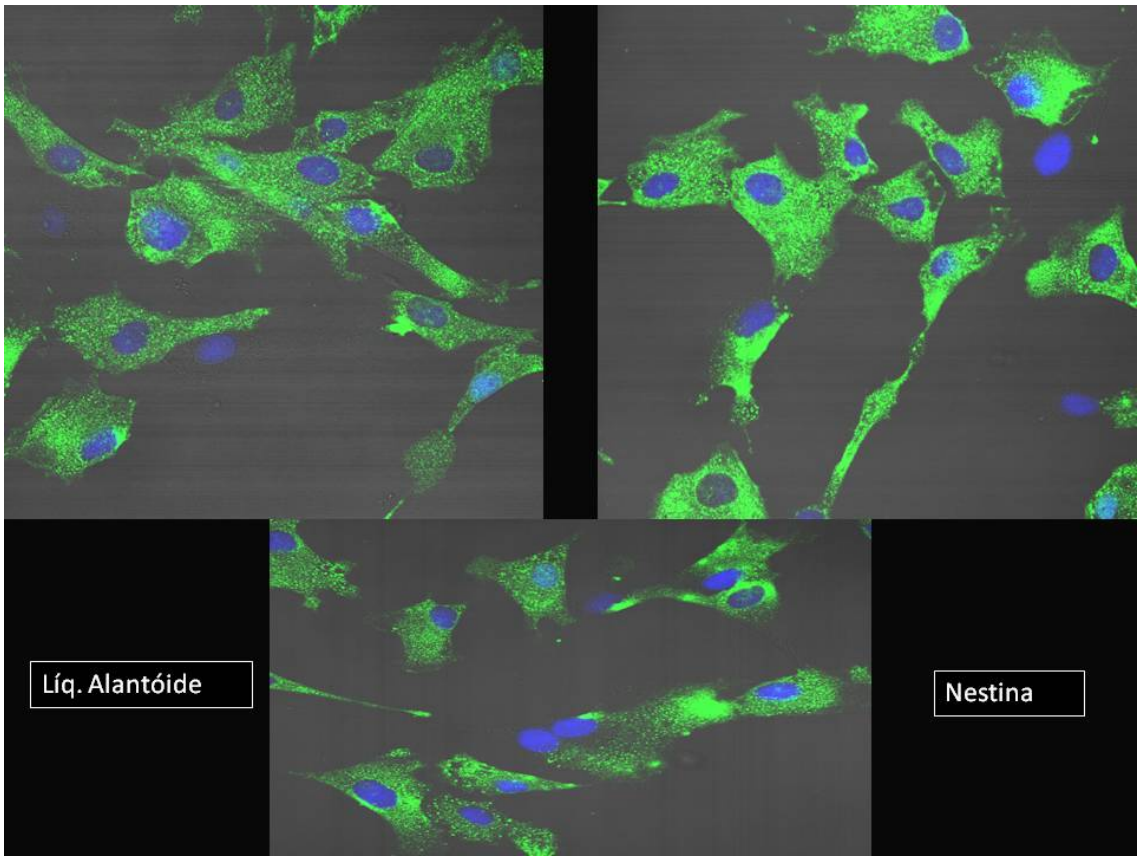

Figura 18 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência para o anticorpo nestina nas células progenitoras do líquido alantoídeano em Meio de Cultivo 6. Verificar imunopositividade no citoplasma das células progenitoras da o anticorpo nestina em A, *(Verde-Anticorpo secundário florescente FITC conjugado com a imunoglobulina anti-rabbit azul- núcleo corado com DAPI*)

5.5.3 Potencial de diferenciação

As células progenitoras do líquido alantóide com 50 dias de gestação cultivadas em meio 5 foram capazes de diferenciar em tecidos cartilaginoso A formação de uma micromassa celular ocorreu a partir de $2x10^6$ células progenitoras do líquido amniótico em cultivo celular suspensão em tubo de polipropileno de 15ml. As células foram incluídas em paraplast com 21 dias de cultura. Nos cortes histológicos corados com azul de toluidina foi observada celularidade e as proteoglicanas da matriz extracelular. As fibras colágenas foram demonstradas através da coloração Tricromo de Masson e Azul de Toluidina (Figura 19).

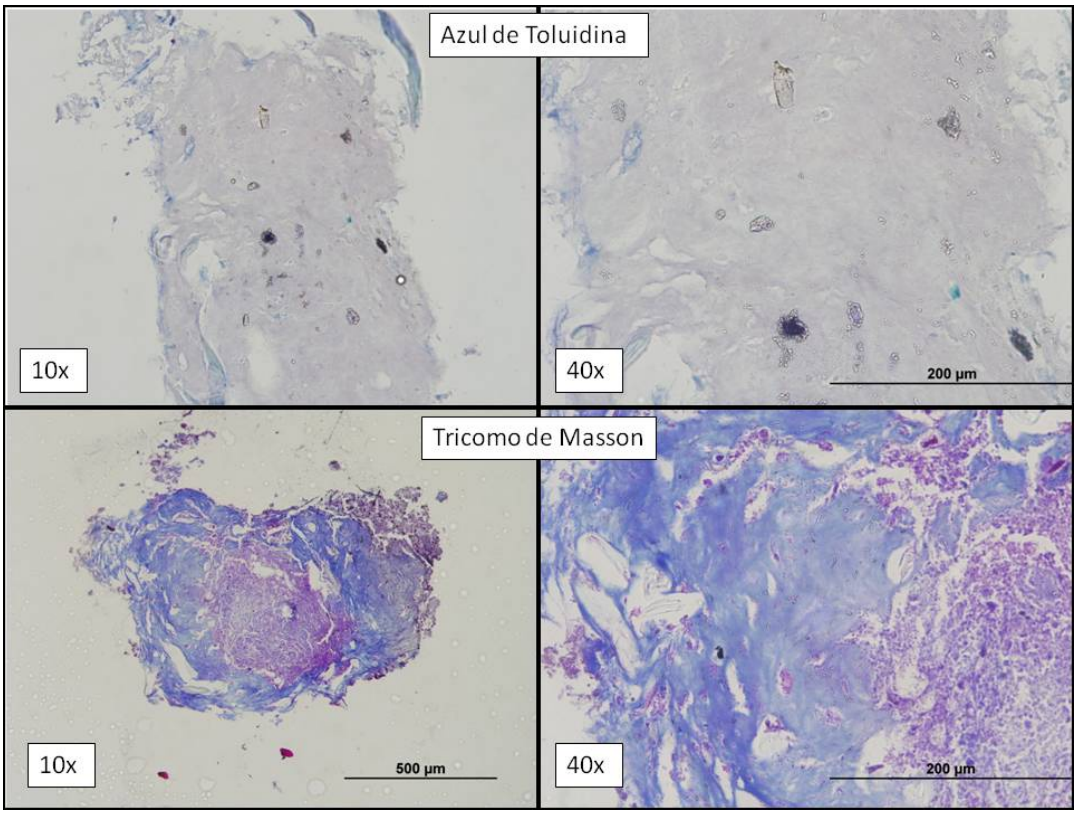

Figura 19 - Fotomicrografia da diferenciação condrogênica das células progenitoras do liquido alantoídeano coradas pela técnica de Azul de Toluídina e Tricromo de Massom. Em A e B micromassa celular obtida a partir da diferenciação condrogênica com 21 dias de cultivo aumento verificar a pequena celularidade (seta preta). Em C e D fibras colágenas (seta preta)

As células progenitoras do líquido alantoíde não foram capazes de diferenciar em adipócitos quando induzidas com meios específicos. Foram verificadas células com morfologia semelhante a neurônios(Figura 20).

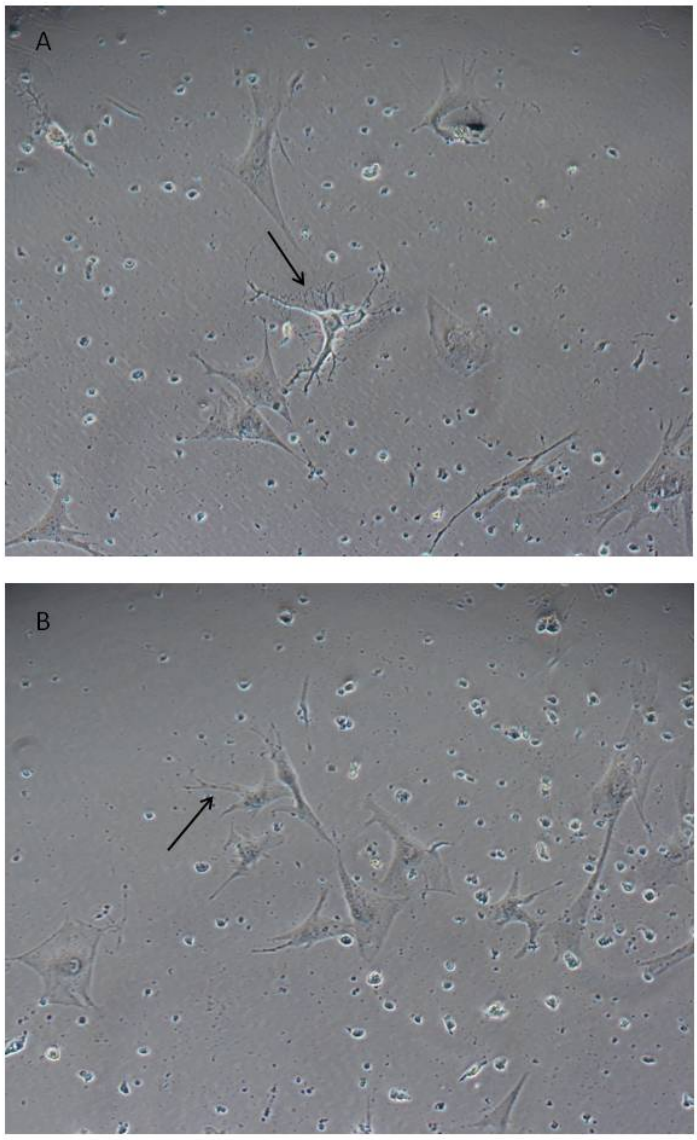

Figura 20 - Fotomicrografia das células do líquido alantóide, morfologicamente semelhantes a células neuronais, cultivadas em meio indutor adipogênico. Em A e B, setas indicando as células semelhantes a neuronais

6 DISCUSSÃO

Foram encontradas algumas dificuldades na realização deste trabalho, sendo a principal delas, estabelecer a idade fetal ideal para a coleta do material, uma vez que até o momento, não há publicações sobre o isolamento do líquido amniótico, alantóide e vitelo em cães, com a finalidade da obtenção de células tronco mesenquimais dos mesmos.

A obtenção de culturas viáveis só foi observada nas amostras obtidas a partir dos 50 dias de gestação, as amostras obtidas em dias inferiores a 50 não demonstraram capacidade de cultivo,e as amostras superiores apresentaram um nível de contaminação incompatível com o estabelecimento de cultura.

Após análise do liquido amniótico humano no terceiro terço de gestação, foi verificada imunomarcação positiva para vimentina, citoqueratina-18 e nestina; e imunomarcação negativa para oct-4, Kim et al.,(2007). Em estudos com células tronco humanas se descreve imunomarcação positiva para vimentina e oct-4 no segundo trimestre de gestação, porém tem-se que levar em consideração a diferença que existe de tempo gestacional entre humanos e cães. No entanto, na tentativa de realizar novamente estes testes em variados tempos gestacionais, não foi observada a presença de células, o que impossibilitou a realização do teste para confirmar a imunomarcação de oct-4. As células mesenquimais foram encontradas apenas no tempo gestacional de 50 dias, sendo negativas para esse marcador. Verificou-se que mesmo quando realizada coleta no terceiro trimestre de gestação humana, You et al. (2008), encontrou imunomarcação positiva para oct-4, diferindo com os resultados obtidos nos cães, no período gestacional correspondente. No entanto, foram observados por You et al. (2008) & Kim et al., (2007) marcação positiva para vimentina e diferenciação osteo, condro, asipo e neuro, dados esses, que corroboram com nossos achados.

Não foi possível estabelecer cultura do conteúdo vitelino nas idades gestacionais coletadas, pois, os sacos vitelinos estavam com pouco volume. Segundo Latshaw (1987) em mamíferos domésticos, o saco vitelino é transitório, o que confirma a dificuldade de se estabelecer a cultura, por não ter a data gestacional ideal da cadela, para essa coleta. Mais estudos devem ser conduzidos para melhor determinar os momentos ideais de coleta desse material, especialmente no

isolamento das células tronco mesenquimais. Hoje, se estuda o potencial das células tronco hematopoiéticas, e mesmo assim, segundo Mikkola et al., (2005) o papel do saco vitelino na biologia das células tronco hematopoiéticas ainda não está claro. Os autores demonstram que o saco vitelino, de onde derivam células tronco hematopoiéticas imaturas, podem repovoar recipientes recém-formados, contribuindo para a hematopoiese durante o desenvolvimento normal adulto.

Foram realizados os mesmos testes no líquido amniótico e líquido alantóide, mostrando semelhanças e diferenças entre eles. As imunomarcações foram semelhantes, sendo elas positivas para vimetina, nestina e citoqueratina-18, e negativas para oct-4. Quando realizada a diferenciação celular, somente as células tronco do líquido amniótico foram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica, e ambos, obtiveram diferenciação neurogênica e condrogênica, sendo a última, apresentando a marcação mais forte na células tronco do líquido alantóide.

Na literatura, o alantóide é mais estudado juntamente com o córion, como no trabalho de Brandon et al., (2006), onde ele isola as células da fusão corion-alantóide, obtendo células hematopoiéticas, diferente dos resultados obtidos neste trabalho.

7 CONCLUSÕES

Após esse estudo, podemos concluir que o líquido amniótico humano é bem estudado, por ser de fácil acesso na gestação humana, e por ser o de maior volume na mesma. Na gestação do cão, o líquido amniótico, o mais interno dos líquidos fetais (mais próximo do feto), tem um barreira a ser passada até seu acesso, essa barreira é o líquido alantóide, que no caso dos cães, é o de maior volume durante toda a gestação. Apesar da existência dessa barreira, é possível seu acesso, através de ultra-som. O líquido alantóide, na gestação humana, é pouco estudado, por ser de volume reduzido e estar somente em uma região delimitada da placenta, o que difere bem no caso dos cães.

Dentre os líquidos pesquisados, o que apresenta maior plasticidade, é o amniótico.

O líquido alantóide na literatura, é estudado com a junção do córion, dessa forma, não é possível ter certeza da origem de suas células, já na espécie canina, como o alantóide tem um grande volume, sua coleta foi simples e o resultado de sua cultura fidedigno, e dessa forma, confirmando, a presença de células mesenquimais na sua composição.

O células tronco do saco vitelino, no final do desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento fetal, as células que foram isoladas apresentaram crescimento lento e foram incapazes de formar colônias, o que indica que as células isoladas não são células tronco verdadeiras.

Apesar de que as células tronco fetais isoladas no presente trabalho, expressaram os marcadores de células tronco adultas e capacidade de diferenciação para linhagem mesodermal e ectodermal, elas não apresenta uma alta capacidade de proliferação, sendo impossível obter a curva de crescimento dessas células, podemos concluir que as células isoladas, são celulas precursoras com a capacidade limitada da diferenciação.

Baseada na nossa experiência, podemos concluir que aparenteente existe uma janela temporária no desenvolvimento fetal dos cães, quando as células tronco e/ou as células progenitoras podem ser isoladas. Cabe determinar mais precisamente este intervalo para definir em que momento podem ser encontradas as

células tronco nesses anexos fetais, que teriam uma aplicação terapêutica, apresentando uma boa proliferação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

ARLETT, C. M.; SMITH, J. B.; JIMENEZ, S. A. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. **N Engl J Med.** v. 23, n. 338 (17), p. 1186-1191, 1998.

ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento placentário em bovinos obtidos por gestações naturais e por fecundação *in vitro*.** 2005. 223 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

BJÖRKMAN N.; DANTZER, V.; LEISER, R. Comparative placentation in laboratory animals. A review. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.** v.4, p.16, 1989.

BJÖRKMAN N. Placentação. In: Dellma, H.; Broxn, E. N. **Histologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989, p. 279.

BORLONGAN, C. V.; STAHL C. E.; CAMERON, D. F.; SAPORTA, S.; FREEMAN, T. B.; CAHILL, D. W.; ET AL. CNS immunological modulation of neural graft rejection and survival. **Neurol Res.** v. 18(4), p. 297-304, 1996.

BRADLEY, A.; EVANS, M.; KAUFMAN, M. H.; ROBERTSON, E. Formation of germline chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**. v. 17, n. 309(5965), p. 255-6, 1984.

BRANDON, M.; ZEIGLER; SUGUYAMA, D.; CHEN, M.; GUO, Y.; DOWNS, K. M.; SPECK, N. A. The alantois and chorion, when isolated before circulation or chorio-

allantoic fusion, have hematopietic potential. **Development**. v. 133, p. 4183-92, 2006.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood** v. 15, n. 98(8), p. 2396-402, 2001.

CHARBORD, P., TAVIAN, M., HUMEAU, L., PEAULT, B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. **Blood** 87:4109, 1996.

DALEY, G. Q.; GOODELL, M. A.; SNYDER, E. Y. Realistic prospects for stem cell therapeutics. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.** p.398-418, 2003.

DEACON, T.; SCHUMACHER, J.; DINSMORE, J.; THOMAS, C.; PALMER, P.; KOTT, S.; EDGE, A.; PENNEY, D.; KASSISSIEH, S.; DEMPSEY, P.; ISACSON, O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. **Nat Med.** v. 3(3), p. 350-3, 1997.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G. JR.; SIDDIQUI, M. M.; XU, T.; SANTOS, C. C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A. C.; SNYDER, E. Y.; YOO, J. J.; FURTH, M. E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **In Nature Biotechnology**, v. 25, n. 01, p.100-104, 2007.

DEKEL, B.; BURAKOVA, T.; BEN-HUR, H.; MARCUS, H.; OREN, R.; LAUFER, J.; REISNER, Y. Engraftment of human kidney tissue in rat radiation chimera: II.Human fetal kidneys display reduced immunogenicity to adoptively transferred human peripheral blood mononuclear cells and exhibit rapid growth and development. **Transplantation.** v. 15, n. 64, p. 1550-8, 1997.

DOETSCHMAN, T. C.; EISTETTER, H.; KATZ, M.; SCHMIDT, W.; KEMLER, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines:formation of

visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **J Embryol Exp Morphol.** v. 87, p. 27-45, 1985.

DOWNS, K. M.; HELLMAN, E.R.; MCHUGH, J.; BARRICKMAN, K.; INMAN, K. E.; Investigation into a role for the primitive streak in development of the murine allantois. **Development**. v. 131, p. 37-55, 2004.

DOWNS, K. M.; GIFFORD, S.; BLAHNIK, M.; GARDNER, R. L. The murine allantois undergoes vasculogenesis that is not accompanied by erythropoiesis. **Development.** v. 125, p. 4507-4521, 1998.

DUNNETT, S. B.; NATHWANI, F.; BJORKLUND, A. The integration and function of striatal grafts. **Prog Brain Res.** v. 127, p. 345-80, 2000.

ELLINGTON, S. K. L. A morphological study of the development of the allantois of rat embryos in vivo. **Journal of Anatomy.** v. 142, p. 1-11, 1985.

ENDERS, A. C.; KING, B. F. Formation and differentiation of extraembryonic mesoderm in the rhesus monkey. **American Journal of Anatomy.** v. 181, p. 327-340, 1988.

ERLICH, H.; BUGAWAN, T.; BEGOVICH, A. B.; SCHARF, S.; GRIFFITH, R.; SAIKI, R.; ET AL. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. **Eur J Immunogenet**. v. 18(1-2), p. 33-55, 1991.

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

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature.** v. 9, n. 292(5819), p. 154-6, 1981.

FINE, A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview. **CMAJ.** v. 1, n. 151(9), p. 1261-1268, 1994.

FUCHS, E.; SEGRE, J. Stem Cell: A new lease on life. **Cell**. v. 100, p. 143-155, 2000.

GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G.; **Embriologia.** Ed. Artmed, 2a, p. 248, 261-264. 2001.

GEKAS, C.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; ORKIN, S. H.; MIKKOLA, H. K. The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. **Dev Cell.** v. 3, p. 365-375, 2005.

GOSDEN, C. M. Amniotic fluid cell types and culture. **British medical bulletin.** v. 39, p. 348-354. 1983.

GROSCURTH, P.; ERNI, M.; BALZER, M.; PETER, H. J.; HASELBACHER, G. Cryopreservation of human fetal organs. **Anat Embryol (Berl)** v. 174(1), p. 105-13, 1976.

HOLLANDS, P. Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early post-implantation mouse embryos. **Development.** v. 99, p. 69-76, 1987.

HORWITZ, E. M.; LE, B. K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A.; INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** v. 7(5), p. 393-5, 2005.

HUBNER, K.; FUHRMANN, G.; CHRISTENSON, L.K.; KEHLER, J.; REINBOLD, R.; DE LA F.; WOOD, J.; STRAUSS, J. F.; BOIANI, M.; SCHOLER, H. R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. **Science**. v. 23, n. 300(5623), p. 1251-6, 2003.

HOUILLON, C. **EMBRIOLOGIA.** ED. Edgard Blucher ltda, p. 77, 90, 92, 96, 1972.

HURYCH, J.; MACEK, M.; BENIAC, F.; REZACOVA, D. Biochemical characteristics of collagen produced by long term cultivated amniotic fluid cells. **Hum Genet**. v. 12, n. 31 (3), p. 335-40, 1976.

IN´T ANKER, P.S. SCHERJON, S. A.; KEUR, C. K.; GROOT-SWINGS, G. M. J. S.; CLAAS, F. H. J.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells.** V. 22, p. 1338-1345, 2004.

JAVAZON E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Exp Hematol.** v. 32(5), p. 414-25, 2004.

JOLLIE W. P. Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. **Teratology.** v. 41, p. 361, 1990.

KAVIANI, A.; GULESERIAN, K.; PERRY, T. E.; JENNUNGS, R. W.; ZIEGLER, M. M.; FAUZA, D. O. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. **J Am Coll Surg.** v. 196, p. 592-7, 2003.

KAVIANI, A.; PERRY, T. E.; DZAKOVIC, A.; JENNINGS, R. W.; ZIEGLER, M. M.; FAUZA, D. O. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. **Journal of Pediatric Surgery.** v. 36, p. 1662–1665, 2001.

KELEMEN, E.; CALVO, W. Atlas of human hematopoietic development. New York: **Springer-Verlag**, 1979.

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

KIM, J. et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. **In Cell Proliferation,** v. 40, p. 76-77, 2006.

KUNISAKI, S. M.; FUCHS, J. R.; STEIGMAN, S. A.; FAUZA, D. O. A comparative analyses of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. **Tissue Eng.** v. 13(11), p. 2633-44, 2007.

KUNISAKI, S. M., ARMANT, M., KAO, G. S., STEVENSON, K., KIM, H., & FAUZA, D. O. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: A prelude to clinical trials. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 42, p. 974–980, 2007.

LATSHAW, W. K. **Veterinary development anatomy: a clinical oriented approach.** Toronto: Decker, 1987. p. 49-74.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinic of Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

MACEK, M.; HURYCH, J.; REZACOVA, D. Collagen synthesis in long-term cultures of amniotic fluid. **Cesk Pediatric.** v. 28 (9), p. 478-80, 1973.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 78(12), p. 7634-8, 1981.

MCLAUGHLIN, D.; TSIRIMONAKI, E.; VALLIANATOS G.; SAKELLARIDIS, N.; HATZISTAMATIOU, T.; STAVROPOULOS-GIOKA, C.; TSEZOU, A.; MESSINIS, I.; MANGOURA, D. Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. **J Neurosci Res.** v. 15, n. 83(7), p. 1190-200, 2006.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cell from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International.** v. 30, p. 681-687, 2006.

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

MIKKOLA, H. K. A.; GEKAS, C.; ORKIN, S. H.; DIETERLEN-LIEVRE, F. Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. **Experimental hematology.** v. 33, p. 1048-1054, 2005.

MILUNSKY, A. **Amniotic fluid cell culture.** Genetic Disordes of the fetus. New york: Plenum Press. p. 75, 1979.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Exp Biol Med (Maywood).** v. 226(6), p. 507-20, 2001.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine.** v. 231, p. 39-49, 2006.

MOSSMAN, H. W. Vertebrate fetal membranes. **New Brunswick: Rutgers University Press.** p. 383, 1987.

NELSON, J. L.; FURST, D. E.; MALONEY, S.; GOOLEY, T.; EVANS, P. C.; SMITH, A; ET AL. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. **Lancet.** v. 21, n. 351(9102), p. 559-62, 1998.

NOORT, W. A.; KRUISSELBRINK, A. B.; IN'T ANKER, P. S.; KRUGER, M.; VAN BEZOOIJEN, R. L.; DE PAUS, R. A.; HEEMSKERK, M. H.; LÖWIK, C. W.; FALKENBURG, J. H.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. **Exp Hematol.** v. 30, p. 870-8, 2002.

NUMAZAKI K.; GOLDMAN H, WONG I, WAINBERG M. A. Maturation of human fetal and infantile thymic cells in tissue culture. **In Vivo**. v. 2, p. 101-7, 1989

OUREDNIK, J.; OUREDNIK, W.; MITCHELL, D. E. Remodeling of lesioned kitten visual cortex after xenotransplantation of fetal mouse neopallium. **J Comp Neurol**. v. 25, n. 395(1), p. 91-111, 1998.

PALIS, J.; YODER, M. Y. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. Experimental Hematology , v. 29, p. 927–936, 2001.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva.** Rio de Janeiro, v.13, n.1, p. 07-14, 2008.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. Biology of mesenchymal stem cells. **International journal of the care of the injured.** v. 36, p. 8-12, 2005.

PRIEST, R. E.; PRIEST, J. H.; MOINUDDIN, J. F.; KEYSER, A. J. Differentiation in human amniotic fluid cell cultures: I: Collagen production. **J Med Genet.** v. 14 (3), p. 157-62, 1977.

PRUSA A. R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Oct-4 expressing cells in humam amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Human Reproduction**, v.18, n. 07, p.1489-1493. 2003

REINHOLT, F. P.; HULTENBY, K.; TIBELL, A.; KORSGREN, O.; GROTH, C. G. Survival of fetal porcine pancreatic islet tissue transplanted to a diabetic patient: findings by ultrastructural immunocytochemistry. **Xenotransplantation**. v. 5(3), p. 222-5, 1998.

SADLER, T. W. **Langman Embriologia Médica.** 9ed., p 47, 2005.

SANTOS, M. A.; O'DONOGHUE, K.; WYATT-ASHMEAD, J.; FISK, N. M. Fetal cells in the maternal appendix: a marker of inflammation or fetal tissue repair? **Hum Reprod.** v. 10, 2008.

SIEGEL, N.; ROSNER, M.; HANNEDER, M.; VALLI, A.; HENGSTSCHLÄGER, M. Stem Cells in Amniotic Fluid as New Tools to Study Human Genetic Diseases. **Stem Cell Rev.** v. 3, p. 256-264, 2007.

STEVEN, D.H. **Placentation in the mare Reproduction**. Suppl. 31. Dept Anatomy, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3DY, U.K. p. 41- 55, 1982.

STREUBEL, B.; MARTUCCI-IVESSA, G.; FLECK, T.; BITTNER, R. E.; In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells—background and outlook. **Wien Med Wochenschr.** v. 146 (9-10), p. 216-7, 1996.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A.; SIMINOVITCH, L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the grow.th of spleen colony-forming cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 51, p. 29-36, 1964.

TODA, A.; OKABE, M.; YOSHIDA, T.; NIKAIDO, T. The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. **Journal of Pharmacological Sciences***.* v. 105, p. 215-228, 2007.

TSAI, M. S.; HWANG, S. M.; TSAI, Y. L.; CHENG, F. C.; LEE, J. L.; CHANG, Y. J. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. **Boil Reprod.** v. 74(3), p. 545-51, 2006.

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

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.** v. 12(11), p. 502-8, 2002.

VILLARON, E. M.; ALMEIDA, J.; LOPEZ-HOLGADO, N.; ET AL. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogenic haematopoietic stem cell transplantation. **Haematologia.** v. 89, p. 1421-1427, 2004.

WANG, X. Y.; LAN, Y.; HE, W. Y.; ZHANG, L.; YAO, H. Y.; HOU, C. M.; TONG, Y.; LIU, Y. L.; YANG, G.; LIU, X. D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**. v. 15, n. 111(4), p. 2436-43, 2008.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev.** v. 85(2), p. 635-78, 2005.

WOBUS, A. M.; HOLZHAUSEN, H.; JAKEL, P.; SCHONEICH, J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. **Exp Cell Res.** v. 152(1), p. 212-9, 1984.

WOBUS, A. M.; GUAN, K.; PICH, U. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. **Methods Mol Biol**. v. 158, p. 263-86, 2001.

YOU, Q.; CAI, L.; ZHENG, J.; TONG, X.; ZHANG, D.; ZHANG, Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. **Int J Gynecol Obstet.** v. 2, p. 149-152, 2008.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C. JR. Adult stem cells. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.** v. 276(1), p. 75-102, 2004.