JÉSSICA BORGHESI

**Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de
membrana amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)**

**Sao Paulo
2014**

JÉSSICA BORGHESI

**Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana
amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)**

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 Domésticos e
Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron

São Paulo
2014

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.3063
FMVZ

Borghesi, Jéssica
Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho
(*Oryctolagus cuniculus*) / Jéssica Borghesi. -- 2014.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2015.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Phelipe Oliveira Favaron.

1. Coelho. 2. Âmnio. 3. Células tronco. 4. Multipotencialidade. I. Título.

São Paulo, 03 de novembro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Isolamento e Caracterização de Células Progenitoras de Membrana Amniótica e Saco Vitelino de Coelho", protocolado sob o CEUA nº 1891200514, utilizando 6 Coelhos (6 fêmeas), 2 Outras (2 machos), sob a responsabilidade de Phelipe De Oliveira Favaron, foi aprovado na reunião de 17/09/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Isolation and Characterization of Progenitor Cells and Amniotic Membrane Rabbit Yolk Sac", protocol number CEUA 1891200514, utilizing 6 Rabbits (6 females), 2 Other (2 males), under the responsibility Phelipe De Oliveira Favaron, was approved in the meeting of day 09/17/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BORGHESI, Jéssica

Título: Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)

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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

A minha mãe **Rita de Cassia Borghesi** e a minha avó **Maria Carolina Borghesi**, meus exemplos de força, luta e determinação. As minhas vitórias sempre serão suas também.

Ao meu namorado **Pedro Henrique**, pela paciência e compreensão durante esses anos.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador **Dr. Phelipe Oliveira Favaron**, pois sem ele seria impossível o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela sua orientação, dedicação, confiança e amizade. Poucos tem o privilegio de dizer que tiveram um orientador tão presente e prestativo, ao longo de sua pós-graduação e esse privilegio eu tive. Sempre serei grata por tudo. *Muito obrigada*

“Agradeço todas as dificuldades que encontrei se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As dificuldades nos impedem de caminhar. Mas as criticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

Á **Prof. Dra. Maria Angelica Miglino** por ter me recebido de porta abertas e sempre confiando no meu objetivo, nunca medindo esforços para realização deste trabalho.

A minha querida e eterna orientadora, **Prof. Dra. Ana Flavia de Carvalho**, pela paciência e dedicação nos primeiros ensinamentos da área científica.

A **Dra. Cristiane Valverde Wenceslau**, por dividir suas experiências, pelos seus conselhos e dicas na nova jornada de vida que se iniciava.

Ao **Prof. Dr. Paulo Maiorka**, pela ajuda nas análises histopatológicas.

A **Prof. Dra. Claudia Mori**, pela contribuição dos camundongos nudes.

A **Dra. Ana Claudia Carreira**, por toda dedicação e empenho e paciência em ajudar nas análises desse trabalho, sua ajuda foi fundamental e sem ela não seria possível sua finalização, *muito obrigada*.

A **Prof. Dra. Cristina Massoco** e a técnica **Nikole** pela contribuição das análises.

A **Dra. Sonia Will** pela contribuição neste trabalho

Ao técnico **Ronaldo Agostinho**, pelas conversas, conselhos, amizade e principalmente pela ajuda durante esse dois anos.

Ao **NUCEL** (Nucleo de Terapia Celular e Molecular) e ao técnico **Túlio Felipe Pereira**, pela realização dos experimentos de citometria de fluxo.

As funcionarias **Jaqueline Santana** e **Dra. Rose Eli**, obrigada por sempre estares dispostas a tirar duvidas e ajudar no possível.

Ao técnico **Dr. André Franciulli**, obrigada pela ajuda e recepção na nossa chegada.

Aos colegas do LCT, **Dylaila, Katia Guimarães, Raphael Cruz, João Leonardo, Mariah, Fabiele Russo** e especialmente a **Isabella Fernandes** e a **Dra. Graciela Pignatari** que sempre estiveram dispostas a ajudar me ensinando e tirando dúvidas, nos momentos mais críticos deste trabalho.

Aos colegas de laboratório **Bruna Andrade, Dailiany Orechio, Rennan Olio, Adriana Raquel, Fernanda Menezes** e especialmente a **Dayane Alcântara** por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos que já foram **Rafael Carvalho, Marcio Nogueira, Valdir Pavanello**, obrigada pelas dicas, conselhos e pela disposição a ajudar nos trabalhos e a tirar dúvidas.

Ao amigo **Marcio Pereira** defeitos todos possuem, qualidades somente amigos sabem ver. Sempre serei grata por nunca ter medido esforços e nunca dizer não em cada pedido de ajuda

Ao amigo **Cesar Prado**, pela amizade e confiança que nasceu de nosso convívio diário.

Ao amigo **Eduardo Malavassi**, por simplesmente sempre estar disposto a ajudar.

Aos novos amigos, **Ana Carolina Martins, Natal (Franceliussa Delys), M.A. (Maria Angelica), Paulo Ramos, Marcão, Luciano Cesar** e **Carla Carvalho**, obrigada pelos cafés, almoços, festas e viagens, cada momento de descontração foi fundamental para dar força para a continuação desta jornada.

Aos velhos amigos que trouxe de casa, **Lara Carolina** e **Miguel Lobo**, amizade é algo que a gente conquista dia a pós-dia, confiança também. Obrigado pela presença de cada um nesses anos, nosso convívio foi fundamental para que esta conquista fosse possível.

As bibliotecárias **Elza** e **Neusa** por toda paciência e dedicação com que nos auxiliam.

A **CAPES** pela concessão da bolsa.

EPIGRAFE

“Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles.”

Philip Ochoa

RESUMO

BORGHESI, J. **Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)**. [Phenotype and multipotentiality of progenitor cells from the Rabbit amniotic membrane (*Oryctolagus cuniculus*)]. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As células tronco possuem a capacidade de auto renovação ilimitada e de se manterem indiferenciadas durante um período prolongado de tempo, até se diferenciarem em uma linhagem celular específica. Devido as dificuldades encontradas na utilização de células embrionárias por questões éticas, de segurança e histocompatibilidade e a limitada plasticidade das células tronco adultas, as células tronco fetais, derivadas de tecidos extraembrionários, aparecem no cenário terapêutico como uma alternativa promissora. Uma vez que apresentam alta capacidade de proliferação e expansão *in vitro*, além de sua característica imunogênica, por se encontrarem na interface materno fetal. Por conta destas características, a membrana amniótica surgiu como uma nova e importante fonte de células tronco em diferentes espécies. Neste trabalho, foram utilizados 8 fetos de coelhos para a coleta da membrana amniótica. A membrana foi isolada pela técnica de explante, as amostras foram cultivadas em meio DMEM-HIGH, e posteriormente criopreservadas nas passagens P4 e P8 para realizar os experimentos. Em cultivo, essas células apresentaram aderência a placa, alta capacidade de proliferação e morfologia semelhante à fibroblastos. Na caracterização imunofenotípica, houve expressão de marcadores de citoesqueleto, de células mesenquimais, proliferação, pluripotência e para precursores de células hematopoiéticas, embora não tenha ocorrido a expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD-45) e de células precursoras neuronais. Quando induzidas a diferenciação *in vitro*, as células amnióticas tiveram capacidade de se diferenciarem nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Além disso, quando injetadas em camundongos nude, não foi verificada a formação de tumor. Nossos resultados demostram que células de membrana amniótica de coelho podem ser consideradas células tronco mesenquimais com possibilidade de serem utilizadas no futuro na terapia celular.

Palavras-chave: Coelho. Âmnio. Células tronco. Multipotencialidade.

ABSTRACT

BORGHESI, J. **Phenotype and multipotentiality of progenitor cells from the Rabbit amniotic membrane (*Oryctolagus cuniculus*)**. [Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)]. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Stem cells are capable of unlimited self renewal and to remain undifferentiated for a prolonged period of time up to differentiate into a specific cell lineage. Due to the difficulties in the use of embryonic cells due ethical reasons, security and histocompatibility, and in the other hands, the limited plasticity of adult stem cells, fetal stem cells, derived from extraembryonic tissues, appear in the therapeutic setting as a promising alternative. They have high capacity of proliferation and *in vitro* expansion, as well as immunogenic properties, since they are at the maternal-fetal interface. Due to these characteristics, the amniotic membrane has emerged as an important new source of stem cells in different species. In this work, we used 8 fetuses of rabbits to collect amniotic membrane. The membrane was isolated by the explant technique. Samples were cultured in DMEM-HIGH, and cryopreserved in the passages P4 and P8 in order to perform the experiments. In culture, these cells exhibited adhesion to the dishes, high proliferative capacity and fibroblast-like morphology. In immunophenotypic characterization, there was expression of markers related to cell cytoskeleton, mesenchymal stem cells, proliferation, pluripotency, and hematopoietic precursor cells. And there was no expression of hematopoietic cell markers (CD-45) and neuronal precursor cells. When induced to *in vitro* differentiation, the amniotic cells were able to differentiate in osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. Furthermore, when injected into nude mice, tumor formation has not been verified. Our results demonstrate that rabbit amniotic membrane cells can be considered mesenchymal stem cells with possibility to be used in the future in cell therapy.

Keywords: Rabbit. Amnion. Stem cells. Multipotentiality.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	17
2	OBJETIVO	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	EMBRIOLOGIA, FUNÇÃO E MORFOLOGIA DA MEMBRANA AMNIÓTICA	19
3.2	CÉLULAS TRONCO ORIUNDAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA	20
3.3	O COELHO COMO UM MODELO PARA A TERAPIA CELULAR	24
4	MATERIAL E MÉTODO	27
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS	27
4.2	CULTIVO CELULAR DE MEMBRANA AMNIÓTICA	27
4.2.1	Isolamento, Obtenção e Cultivo das Células Derivadas de Membrana Amniótica	27
4.2.2	Análise morfológica	28
4.2.3	Teste de viabilidade de criopreservação	29
4.2.4	Microscopia eletrônica de varredura	29
4.2.5	Ensaio de avaliação do metabolismo celular pelo método colorimétrico de MTT	30
4.2.6	Caracterização celular por imunocitoquímica	30
4.2.7	Caracterização celular por citometria de fluxo	31
4.3	DIFERENCIAÇÃO CELULAR	32
4.3.1	Diferenciação adipogênicas e osteogênica	32
4.3.2	Diferenciação condrogênica	33
4.4	POTENCIAL TUMORIGÊNICO	34
5	RESULTADOS	35

5.1	ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	35
5.2	ANÁLISE MORFOLOGICA DAS CÉLULAS	38
5.3	TESTE DE VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO	41
5.4	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO METODO COLORIMÉTRICO DE MTT	41
5.5	CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR IMUNOCITOQUÍMICA.....	43
5.6	CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	47
5.7	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	56
5.8	POTENCIAL TUMORIGÊNICO	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

Células tronco possuem a capacidade de auto renovação ilimitada e de se manterem indiferenciadas durante um período prolongado de tempo até se diferenciarem em uma linhagem celular específica (YOUNG, 2004; TROUNSON, 2006). Tais propriedades tem tornado as células tronco uma nova ferramenta para ser utilizada no mecanismo de reparo e regeneração tecidual, trazendo novas expectativas na área da medicina regenerativa, inclusive para o tratamento de diversas patologias, as quais até o presente momento não se tem tratamento efetivo para sua cura (DIEBOLD et al., 2000; ALVEZ; CARRONDO; CRUZ, 2007).

Devido as dificuldades encontradas na utilização de células embrionárias por questões éticas, de segurança e histocompatibilidade e a limitada plasticidade de células tronco adultas, as células tronco fetais, derivadas de tecido extraembrionários, aparecem no cenário terapêutico como uma alternativa, a qual possui alta capacidade de proliferação e expansão *in vitro*, além de sua característica imunogênica, uma vez que se encontram na interface materno fetal (WOLBANK et al., 2007; MARCUS et al., 2008; FERNANDES et al., 2012;). Diversos pesquisadores tem estudado a capacidade de obtenção de células tronco a partir do córion (CIUCĂ et al., 2011; ABUMAREE et al., 2013), alantóide (ARORA; PAPAIONNOU, 2012; FERNANDES et al., 2012), saco vitelino (WENSCELAU et al., 2011; FAVARON et al., 2014) e membrana amniótica (PARK et al., 2012; RUTIGLIANO et al., 2013). No entanto o uso de células de saco vitelino, córion e alantóide torna-se limitado devido as dificuldades encontradas para obtenção destas membranas durante a gestação. O saco vitelino na maioria dos mamíferos domésticos e no próprio homem regride ao longo da gestação, quando a placenta permanente se desenvolve (BARON, 2003). Por sua vez, o córion humano segundo Portmann-Lanz et al. (2006), quando isolado no primeiro trimestre de gestação prolifera melhor que as células isoladas no terceiro trimestre, estas características limitam e dificultam a obtenção de amostras, uma vez que somente seria possível isolar estas células em casos de aborto. Por outro lado, a membrana amniótica pode ser obtida no momento do parto, em um simples método de isolamento, não havendo portanto, nenhum método invasivo de coleta, que comprometa a saúde da mãe ou do feto. Devido a estas características, a literatura mostra um maior uso da

membrana amniótica em relação às outras membranas extraembrionárias e fetais, inclusive com estudos mais avançados com a avaliação *in vivo* do seu potencial de diferenciação (ZHU et al., 2013; VIDANE et al., 2014), capacidade de regeneração (SANKAR; MUTHUSAMY, 2003; MIKI; STROM, 2006) e tratamento de doenças (UCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008; INSAUSTI et al., 2010). Com isso, podemos destacar a membrana amniótica como uma importante fonte de células tronco.

A membrana amniótica tem origem a partir do epiblasto, possuindo assim, alto potencial de pluripotência, o que é confirmado pela expressão de alguns marcadores tais como: Sox-2, Nanog, Oct-4 e Rex-1 (MIKI et al., 2007; Parolini et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012). Porém, o potencial de aplicação de células de membrana amniótica não se deve apenas a característica de pluripotência, mas também a sua característica imunogênica (PAROLINI; SONCINI, 2006; MARCUS; WOODBURY, 2008). Parolini et al. (2008) estudando a membrana amniótica humana relatou dois tipos celulares: células epiteliais derivadas do ectoderma e células mesenquimais derivadas do mesoderma.

Por conta destas características, a membrana amniótica surgiu como uma nova e importante fonte de células tronco em diferentes espécies, incluindo o homem (IN'T ANKER et al., 2004; DIAZ-PRADO et al., 2011), cavalo (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE-CONSIGLIO, 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012), ovelha (MAURO et al., 2010), gato (RUTIGLIANO et al., 2013; VIDANE et al., 2014), cão (URANIO et al., 2011) e rato (MARCUS et al., 2008). As células obtidas a partir da membrana amniótica foram caracterizadas e diferenciadas em várias linhagens celulares, como osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica (IN'T ANKER et al., 2004; RUTIGLIANO et al., 2013; VIDANE et al., 2014) (Quadro 1).

A utilização de células de membrana amniótica para o tratamento de doenças também tem demonstrado bons resultados terapêuticos e sem toxicidade ou efeitos colaterais, como já descrito em alguns estudos, como por exemplo, em sistema nervoso (SANKAR; MUTHUSAMY, 2003), doença de Parkinson (KAKISHITA et al., 2003; KONG et al., 2008), função hepática (SAKURAGAWA et al., 2001; MIKI; STROM, 2006) e diabetes mellitus (UCELLI et al., 2008).

No cenário atual, caracterizar novas espécies animais como modelo experimental é de fundamental relevância, uma vez que pesquisas experimentais e testes pré-clínicos são de suma importância para a medicina humana, sendo um

pré-requisito para posterior utilização clínica (BARRY et al., 2010). Nesse contexto, podemos citar a importância que os coelhos possuem como modelos experimentais, devido às vantagens relacionadas ao comportamento, baixo custo de manutenção, curto período de prenhez e fisiologia (BRIGHTON, 1985; HILTUNEN; VUORIO; ARO, 1993; NUNAMAKER, 1998). O coelho da Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*, Linnaeus 1758), é uma espécie que apresenta alto índice de proliferação, em seu ambiente natural a reprodução é influenciada pelas condições climáticas. A puberdade tem início aos 6 meses de vida, sendo a fêmea poliestral com ovulação estimulada, aproximadamente de 10 a 12 horas após o coito. O seu período de gestação varia entre 30 a 32 dias, podendo a fêmea ter de 3 a 5 ninhadas por ano e a cada ninhada de 3 a 6 crias (SOUTHERN, 1940; ALVES, 1994; VILLAFUERTE, 2002; AJAYI et al., 2005). Outra característica fundamental que favorece o uso dessa espécie como modelo experimental diz respeito às semelhanças reprodutivas. Os coelhos compartilham muitas características com os humanos, principalmente relacionadas ao desenvolvimento embrionário e placentário, além de semelhanças relacionadas à morfologia e fisiologia (FISCHER et al., 2012).

Devido as semelhança compartilhadas com o homem, os coelhos tem sido largamente utilizados na terapia celular, tanto para caracterizar novos tipos celulares como modelo animal para testes *in vivo*. Diversos trabalhos tem mostrado resultados bastante satisfatórios e promissores. Dentre eles, podemos citar trabalhos que utilizaram células de medula óssea de coelho como descrito por Mardone et al. (2010). Tais autores, foram capazes de diferenciar células da medula óssea em linhagem condrogênica. Por sua vez, Zhang et al. (2014) as diferenciaram em linhagem neurogênica, ambos *in vitro*, para futuras aplicações na reconstituição óssea e transplantes neurológicos, respectivamente. Ainda com células de medula óssea de coelho Minguell et al. (2011) testou estas células para avaliar sua aplicação pela infusão intratecal por punção lombar em coelhos. Células obtidas da polpa dentária de coelhos foram caracterizadas e aplicadas nestes animais para reparo de defeitos periodontais (LIU et al., 2011). Honda et al. (2010) isolaram células do fígado e estômago de coelho para gerar células pluripotentes induzidas (iPS – induced pluripotent stem cells) e avaliar sua eficácia e segurança. Células de tecido adiposo foram isoladas e caracterizadas *in vitro* para a reconstituição de cartilagem articular lesada (WANG et al., 2014). Células autólogas de pele de coelho foram cultivadas e induzidas a células multipotentes onde foram transplantadas

através da artéria pancreática para o tratamento de diabetes tipo I (HU et al., 2013). Considerando as características morfofisiológicas que coelhos e humanos compartilham, bem como o aparente sucesso na obtenção, cultivo e aplicação de diferentes linhagens de células progenitoras nessa espécie, este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e diferenciar células progenitoras obtidas de membrana amniótica de coelhos na idade gestacional de 16 dias.

Quadro 1 - Características relacionadas a morfologia, caracterização e diferenciação de células de membrana amniótica em diferentes espécies

Espécie	Morfologia	Marcadores expressos	Linhagens diferenciadas	Referência
Humano	Epitelial Mesenquimal	CD90,CD44,CD73,CD116, CD117,CD105,CD29, SSEA-4 e STRO-1	Osteogênica, Condrogênica, Adipogênica, Miogênica, Neurogênica	Anker et al. (2004); Portmann- Lanz et al. (2006); Lange- Consiglio et al.(2012); Miki e Strom (2001); Parolini (2008).
Gato	Epitelial	SSEA-4, CD34 OCT-4,Nanog,CD44 e CD116	Osteogênica, Adipogênica,Condrogênica. Neurogênica	Rutigliano et al.(2013)
Cão	Mesenquimal	CD90 e CD105	Osteogênica, Adipogênica,Condrogênica	Park et al. (2012)
Equino	Mesenquimal	CD19,CD20,CD28,CD31,CD38, CD41,CD44,CD62,CD90,CD105 e CD200	Osteogênica, Adipogênica,Condrogênica	Min-Sooseo et al. (2013)
Ovelha	Epitelial	Oct-4, SSEA-1, SSEA-3, SSEA- 4, TRA-1-60, TRA-1-81 e Nanog	Neurogênica, Osteogênica	Zhu et al. (2013); Mattioli et al. (2012)
Rato	Mesenquimal	CD90,CD29 e Vimentina	Osteogênica, Adipogênica, Neurogênica, Hepatogênica	Marcus et al.(2008)

1.1 JUSTIFICATIVE E HIPÓTESE

Levando em conta a capacidade de auto-renovação das células tronco e a plasticidade na diferenciação, tem-se buscado conhecer fontes alternativas ao uso de células embrionárias, mas que mantenham alta capacidade de expansão e diferenciação. Neste sentido, as células derivadas dos anexos embrionários tem surgido no cenário terapêutico, como uma fonte bastante promissora. Por conta da origem precoce da membrana amniótica durante o desenvolvimento embrionário, a partir do epiblasto e características relacionadas à imunogenicidade, levantamos a hipótese de que seria possível obter células progenitoras mesenquimais com alto potencial de diferenciação *in vitro* capazes de expressar marcadores de células tronco, proliferação e pluripotência em coelhos, espécie que se destaca como um excelente modelo experimental para a pesquisa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Considerando a importância dos coelhos como modelo experimental, inclusive na medicina humana para avaliação de tratamentos e testes de novas drogas e mais recentemente terapia celular, o objetivo deste trabalho foi aumentar o conhecimento sobre a obtenção de linhagens de células progenitoras em coelhos, tendo como fonte a membrana amniótica em fase de meio de gestação.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estabelecer culturas de células progenitoras da membrana amniótica de coelhos com 16 dias de gestação;
2. Avaliar o potencial de expansão e proliferação das células amnióticas do coelho;
3. Caracterizar o fenótipo das células progenitoras através de citometria de fluxo e imunocitoquímica;
4. Avaliar o potencial de diferenciação das células da membrana amniótica em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas;
5. Testar o potencial tumorigênico das células da membrana amniótica em camundongo imunossuprimido da linhagem BALB/c nude.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 EMBRIOLOGIA, FUNÇÃO E MORFOLOGIA DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Durante seu desenvolvimento, o embrião apresenta quatro membranas distintas que o proteja e auxilia nas trocas materno-fetais: o córion, o alantóide, o âmnio e o saco vitelino (MOSSMAN, 1987).

Após a implantação do blastocisto no útero, surge um espaço no embrioblasto que dará origem ao primórdio da cavidade amniótica. Com o progresso do desenvolvimento, as células amniogênicas, denominadas de amnioblastos, se separam do epiblasto e revestem o âmnio, que envolve a cavidade amniótica. Simultaneamente ocorrem mudanças morfológicas no embrioblasto que resultam na formação de uma placa bilaminar quase circular de células achatadas, chamada de disco embrionário, o qual é formado por duas camadas: o epiblasto e hipoblasto (MOORE; PERSAUD, 2004). As células do epiblasto, aderidas ao citotrofoblasto, também denominadas amnioblastos se diferenciam em células amnióticas epiteliais e circundam a cavidade amniótica. Em alargamento progressivo simultaneamente, a camada mesenquimal extraembrionária ao redor das células epiteliais se especializam em tecido conjuntivo amniótico (MIKI; STROM, 2006).

Amniogênese é o resultado do deslocamento gradual das células do epiblasto para o polo embrionário, devido à acumulação de fluido onde se diferenciam numa membrana amniótica fina, resultando no seu término, na formação da cavidade amniótica. No homem, após duas semanas a cavidade amniótica circunda todo o embrião. Assim, a cavidade amniótica é coberta por amnioblastos. A membrana amniótica é um tecido de origem fetal composto por 3 camadas: uma camada de epitélio simples, uma membrana basal e uma membrana mesenquimal avascular (BENIRSCHKE; KAUFAMAM, 2000; MOORE; PERSAUD, 2004). Basicamente, a membrana amniótica é composta por 2 tipos celulares: as células amnióticas epiteliais, de formato cubóide à colunar, apresentam origem epiblastica e compõem a camada epitelial interna em contato direto com o fluido amniótico. E as células amnióticas mesenquimais, as quais encontram-se aleatoriamente distribuídos na

matriz extracelular tendo sua origem no mesoderma extraembrionário (CHANG et al., 2010).

A função atribuída a membrana amniótica é de uma bolsa membranosa, que mantém o conceito dentro do líquido amniótico impedindo sua dessecação e funcionando como um amortecedor que protege o feto de impactos e permite que o mesmo cresça sem que haja distorção ou pressão de sua estrutura (OKAZAKI et al., 1981). A membrana é metabolicamente ativa e esta envolvida na manutenção da homeostase de água e soluto de líquido amniótico, ela também tem a função de secretar fatores nutritivos (CHAMBERS et al., 2003) e inibe a resposta imune contra o feto (BENRISCHE; KAUFMANN, 2000; CALVIN; OJEN, 2007). 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).

A membrana amniótica é a membrana fetal mais interna que entra em contato com o conteúdo do saco amniótico (TIEDEMANN, 1979) seu aspecto macroscópico é liso e avascular (BENIRSCHKE; KAUFAMAM, 2000). Microscopicamente pode ser observada uma monocamada de células cuboides sobre a membrana basal. Este epitélio encontra-se sobre uma camada mesenquimal abundante em colágeno e com poucas células, sendo estas células predominante fibroblastos (MUKAIDA et al., 1977).

3.2 CÉLULAS TRONCO ORIUNDAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA

A medicina regenerativa é um emergente campo na área da manipulação genética para o desenvolvimento de estratégias destinadas a manter, aumentar ou restaurar a função de um tecido ou órgão que por alguma patologia teve perda ou comprometimento de sua função. Neste campo as células tronco são fundamentais, uma vez que possuem capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos celulares (BELTRAMI et al., 2003).

Células tronco são definidas pela sua capacidade de auto-renovação ilimitada e indiferenciação, o que lhes confere um papel primordial durante o processo de desenvolvimento (ASAHARA; KAWAMOTO, 2004; MIMEAULT; BATRA, 2006; TROUNSON, 2006). As células tronco são classificadas de acordo com seu

potencial de diferenciação. Células totipotentes são capazes de se diferenciar em todas as células do organismo incluindo os tecidos extraembrionários; células tronco pluripotentes são capazes de formar as três camadas germinativas, contudo não são capazes de formar os anexos embrionários, a pluripotência é tipicamente associada com células tronco embrionárias a qual são caracterizadas pela expressão dos marcadores Oct-4, SSEA-3, SSEA-4 e TRA-1-60. Por outro lado, as células tronco multipotentes ou adultas possuem potencial de diferenciação limitado (ZHANG et al., 2006; PAROLINI et al., 2009).

Células tronco embrionárias são isoladas da massa celular interna do blastocisto e possuem a capacidade de se diferenciarem em células oriundas dos três folhetos embrionários, no entanto seu uso em terapia celular e pesquisa tem sido restrito por questões éticas, de segurança e histocompatibilidade, uma vez que estas células quando injetadas *in vivo* possuem a capacidade de formar teratoma contendo formações teciduais proveniente dos três folhetos embrionários (WEISSBERGE; QASIM, 2005). Células adultas ou multipotentes são responsáveis pela manutenção e integridade dos tecidos adultos e possuem a capacidade de se diferenciarem em apenas alguns tipos celulares, diferentes das células tronco embrionárias (pluripotentes) que possuem capacidade de se diferenciarem em células provenientes dos três folhetos embrionários (CAPLAN, 2007; WANG et al., 2008; MRUGALA et al., 2009).

Nos últimos anos houve um crescente interesse nos estudos de células tronco fetais, uma nova classificação dada à células derivadas de tecidos extraembrionários. Estas células apresentam grande capacidade de proliferação e expansão *in vitro*, o que favorece o estabelecimento de bancos de linhagens celulares (MIKI et al., 2005; FERNANDES et al., 2012), por se encontrarem na interface materno fetal, possuem característica imunossupressora, tornando-se propícias para transplantes (LI et al., 2005; WOLBANK et al., 2007). Além disso, rotineiramente estes tecidos extraembrionários são descartados após o parto e seu uso não acarreta problemas éticos e religiosos significativos (Parolini et al., 2008; URANIO et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). No entanto, o uso de membranas humanas fica limitado à tecidos de final de gestação, ou àqueles obtidos de ocorrências de aborto.

A membrana amniótica é originada do epiblasto, possuindo assim, alto potencial de pluripotência, o que é confirmado pela expressão de marcadores tais como: Sox-

2, Nanog, Oct-4 e Rex-1 (MIKI; STROM, 2006; Parolini et al., 2008; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012). Porém, o potencial de aplicação de células de membrana amniótica não se deve apenas a característica de pluripotência, mas também a sua característica imunogênica (MARCUS; WOODBURY, 2008; PAROLINI; SONCINI, 2006).

Parolini et al. (2008) estudando a membrana amniótica humana relatou dois tipos celulares: células epiteliais derivadas do ectoderma e células mesenquimais derivadas do mesoderma. As células epiteliais da membrana amniótica são isoladas pela separação manual do âmnio do córion, seguido pela digestão por tripsina para a liberação de células epiteliais (PAROLINI et al., 2008). Em cultura expressam marcadores epiteliais tais como citoqueratina (MIKI; STROM, 2006), marcadores de células embrionárias: SSEA-4 e TRA-1-60, de pluripotência: Oct-4, Sox-2 e Nanog e não expressam marcadores mesenquimais (ILANCHERAN et al., 2007; MIKI et al., 2007). Por outro lado, as células mesenquimais de membrana amniótica são isoladas por separação mecânica do âmnio e do córion por digestão com colagenase para liberar células mesenquimais da camada mesodérmica (PAROLINI et al., 2008). Em cultura expressam marcadores para células mesenquimais tais como CD73, CD90 e CD105 e não expressam marcadores de células hematopoiéticas: CD34 e CD45 (PORTMANN-LANZ et al., 2006; WOLBANK et al., 2007; SONCI et al., 2007; VIDANE et al., 2014).

Vários estudos de transplantes e enxertos foram realizados com a membrana amniótica humana a termo e os resultados demonstraram que estas células não causam resposta imunológica (AKLE; ADINOLFI; WELSH, 1981; KUBO et al., 2001; BAILO et al., 2004; WOLBANK et al., 2007). Esta imunogenecidade pode ser explicada pelas propriedades imunomoduladoras que as membranas fetais possuem, as quais estão envolvidas na manutenção e tolerância materno-fetal (PAROLINI et al., 2008). Outro fator importante é que estas células possuem expressão de MHC de classe I (complexo de histocompatibilidade de classe I) e não expressam MHC de classe II (KUBO et al., 2001; LLNACHERAN et al., 2007; BANAS et al., 2008). Vários mecanismos auxiliam estas características entre elas podemos citar a função da membrana amniótica de secretar proteínas anti-inflamatória, sua atividade pró-apoptótica que promove a apoptose de leucócitos (ZHOU; CHEN; FENG, 2003; HORI et al., 2006; LI et al., 2006) e a presença da proteína anti-bacteriana lactoferrina (KANYSHKOVA et al., 2001).

As células de membrana amniótica de humanos foram isoladas pela primeira vez em 2004 por In't Anker et al. que além de isolar estas células também demonstrou sua capacidade de diferenciação para células osteogênicas. Mais tarde, outros autores realizaram a diferenciação de células da membrana amniótica em outras linhagens celulares, tais como Condrogênica, utilizando células amnióticas de cães (RUTIGLIANO et al., 2013; VIDANE et al., 2014), e neurogênica com células de ovelhas (ZHU et al., 2013).

Na clínica, o potencial de aplicação de células tronco derivadas da membrana amniótica é muito amplo e crescente, sendo que suas aplicações clínicas podem atingir uma variedade de doenças, em especial àquelas associadas à processos degenerativos induzidos por processos inflamatórios e fibróticos (PAROLINI; CARUSO, 2011).

A utilização de células de membrana amniótica para tratamento de algumas doenças demonstra bons resultados terapêuticos e sem toxicidade ou efeitos colaterais. Estudos em macacos demonstraram a utilidade destas células no sistema nervoso central, após o transplante destas em áreas lesionadas na medula espinhal, resultando na regeneração de neurônios na medula (SANKAR; MUTHUSAMY, 2003). Ainda na parte neuronal, estudos mostram que células de membrana amniótica foram utilizadas em modelos de ratos com Parkinson para produzir dopamina, afim de prevenir a degeneração dos neurônios (KAKISHITA et al., 2003; KONG et al., 2008). Miki et al. (2007) relatou que quando estas células foram aplicadas em ratos, as mesmas foram capazes de reestabelecer a função hepática *in vivo*. Além disso, transplante em ratos imunodeficientes com problemas hepáticos, mostraram reação positiva para albumina após sete dias de transplante celular (SAKURAGAWA et al., 2000). Células de membrana amniótica expressaram marcadores pancreáticos como amilase $\alpha 2B$ e produziram glucagon, após serem induzidas a diferenciação pancreática (ILANCHERAN et al., 2007). Podemos citar ainda outras doenças onde células de membrana amniótica apresentaram resultados clínicos satisfatórios, como doença pulmonar (MAGATTI et al., 2008; INSAUSTI et al., 2010) e diabetes mellitus (UCELLI; MORETTAI; PISTOIA, 2008).

Por conta dessas características, a membrana amniótica surgiu como uma nova e importante fonte de células tronco em diferentes espécies incluindo no homem (IN'T ANKER et al., 2004; DIAZ-PRADO et al., 2011), cavalo (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE-CONSIGLIO, 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012),

ovelha (MAURO et al., 2010), gato (RUTIGLIANO et al., 2013), cão (URANIO et al., 2011) e rato (MARCUS et al., 2008).

Estudos recentes demonstraram a grande capacidade de diferenciação das células-tronco derivadas de membrana amniótica, reafirmando a importância em se estudar a morfologia, o comportamento, capacidade de diferenciação, aplicabilidade e sucesso em tratamentos *in vivo* destas células, para que num futuro próximo, ocorra a expansão de sua aplicabilidade para outras doenças dentro da terapia celular (Parolini et al., 2008; ISMAIL et al., 2009; MIHU et al., 2009). Apesar de haver hoje na literatura resultados referentes a espécies como cavalo, ovelha, cão, roedores e para o próprio homem, quanto à Ordem Lagomorpha, os dados acerca da obtenção e caracterização das células amnióticas permanecem inexistentes.

3.3 O COELHO COMO UM MODELO PARA A TERAPIA CELULAR

Caracterizar novas espécies animais afim de utilizá-las como modelos experimentais é de fundamental importância, uma vez que para o avanço da ciência, principalmente da medicina, é essencial a realização de testes e ensaios pré-clínicos em animais, antes de apresentá-los como novos tratamentos para a saúde do homem, sendo portanto, um pré-requisito para sua utilização clínica (BARRY et al., 2010). Nesse contexto, podemos citar os coelhos, os quais tem sido largamente utilizados como modelos experimentais, devido as semelhanças que possui com os humanos. Especificamente na terapia celular, os coelhos tem sido utilizados para obter e caracterizar novas linhagens celulares a partir de diferentes tecidos, bem como um modelo para realização de testes de células *in vivo*.

A maioria dos trabalhos com células tronco de coelhos utilizam células da medula óssea, afim de diferenciá-las em linhagens celulares específicas, para aplicação *in vivo* e consequente reconstituição ou reparo tecidual. Neste contexto, Mardones et al. (2010), isolaram e diferenciaram *in vitro* células do íleo em linhagens condrogênicas, para possíveis reconstituições ósseas. Por outro lado, Zhang et al. (2014), isolaram células de medula óssea do fêmur de coelhos, e as diferenciaram em células neuronais para futuros transplantes de reparo do sistema nervoso. Pensando em seu uso como um método menos invasivo *in vivo*, os autores

marcaram estas células *in vitro* com óxido de ferro superparamagnético, as quais podem então ser rastreadas por meio de ressonância magnética. Os autores concluíram que estas células podem então ser induzidas a diferenciação em células neuronais marcadas com o óxido sem perder sua viabilidade e eficiência, podendo ser confiavelmente monitoradas por ressonância magnética, fornecendo auxílio para seu uso em aplicações clínicas. Ainda considerando as células de medula óssea de coelho, Miguell et al. (2011) avaliaram a segurança e viabilidade de infusão de células tronco mesenquimais em animais de grande porte, com isso foi realizada a aplicação de células de medula óssea em coelhos por meio de infusão intratecal por punção lombar, sendo este um método seguro e sem efeitos colaterais.

Pensado na engenharia odontológica que busca soluções para defeitos ósseos periodontais, que até o presente momento tem como tratamento autotransplantes; Liu et al. (2011), isolaram células de polpa dentária de coelhos e aplicaram um complexo de proteína óssea morfogênica com um recombinante humano mediado por células tronco de polpa dentária de coelhos. O modelo animal utilizado foi o próprio coelho que teve lesões periodontais induzidas, sendo este complexo aplicado e avaliado. Os resultados demonstraram que com o uso do complexo a reconstituição ocorreu em um intervalo de tempo mais curto do que naqueles métodos já previamente testados.

Lesões na cartilagem articular tem capacidade limitada de auto reparo, por falta de fornecimento sanguíneo (MITHOEFER et al., 2005). Com o intuito de investigar a viabilidade de reparação de defeitos de cartilagem articular, Wang et al. (2014) isolaram células tronco de tecido adiposo de coelho e induziu lesões na cartilagem articular desse modelo animal, reconstituindo a lesão com uma cartilagem articular acelular onde as células foram aplicadas. Os resultados demonstraram que a cartilagem articular foi preenchida por condrócitos.

Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada ou por deficiência absoluta ou relativa de insulina. Com o intuito de analisar a eficiência de células tronco neste tipo de doença, Hu et al. (2013) isolaram células tronco multipotentes de pele de coelho e as transplantaram em animais da mesma espécie através da artéria pancreática. O tratamento mostrou eficácia uma vez que os níveis de açúcar no sangue foram reduzidos, havendo também melhora na função das células do pâncreas em um modelo animal de diabetes tipo 1.

A superfície córnea é mantida pela produção de células epiteliais do limbo localizado na periferia da córnea. Danos nesta região podem causar deficiência límbica podendo resultar em perda córnea, diminuição da visão e finalmente cegueira. O tratamento indicado é o transplante do epitélio do olho contralateral saudável ou com enxerto de um doador, no entanto essas técnicas são limitadas pela disponibilidade de tecido de doador e o risco das complicações (SEJPAL; BAKHTIARI; DENG, 2013). Zhou et al.¹. (2014) buscaram uma fonte alternativa para a reconstituição ocular, isolando células epiteliais de membrana amniótica humana e aplicando-as no estroma da córnea de coelhos. Os resultados satisfatórios, permitiram concluir que as células epiteliais da membrana amniótica humana podem ser induzidas a se diferenciarem em células epiteliais da córnea que podem ser por sua vez, ser adequadas para reconstrução do epitélio da córnea em casos de deficiência límbica.

¹ ZHOU, Q.; LIU, X.Y.; RUAN, Y.X.; WANG, L.; JIANG, M.M.; WU, J.; CHEN, J. Construction of corneal epithelium with human amniotic epithelial cells and repair of limbal deficiency in rabbit models. **Human Cell**, Tokyo, Aug. 2014. No prelo

4 MATERIAL E METODO

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 8 fetos de coelhos com 16 dias de gestação. Os animais foram oriundos do abatedouro da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga-SP. Vale ressaltar que os experimentos foram conduzidos segundo os princípios preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-USP, sobre o protocolo de nº 1891200514. O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da FMVZ-USP.

Após o abate foi realizado uma incisão ventral na região abdominal para expor o útero gravídico. Por fim, o útero foi aberto e as membranas fetais e placenta foram expostas, para então a membrana amniótica ser coletada.

4.2 CULTIVO CELULAR DE MEMBRANA AMNIÓTICA

4.2.1 Isolamento, Obtenção e Cultivo das Células Derivadas de Membrana Amniótica

Com o auxílio de uma tesoura a membrana amniótica foi exposta e removida. A membrana foi lavada cinco vezes com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 5% (Invitrogen, Cat. 15140-122, Carlsbad, CA, USA), e acondicionada em meio de cultivo para transporte suplementado com 5% de penicilina-estreptomicina, 15% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo) e 80% de DMEM-HIGH GLUCOSE (LGC Biotecnologia, Cat. BR30003-05, Cotia, São

Paulo). O material coletado sob condições de assepsia foi transportado ao Laboratório de Cultivo Celular do setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

Os procedimentos subsequentes foram realizados dentro de um fluxo laminar. No fluxo laminar as membranas amnióticas foram depositadas em placa de Petri e lavadas cinco vezes com PBS acrescido de penicilina-estreptomicina a 5% para remoção de possíveis elementos contaminantes. Este procedimento foi repetido cinco vezes sendo trocadas as placas a cada lavagem. Após o processo de descontaminação, foi realizada a dissociação mecânica da membrana, com auxílio de lâminas bisturi. Os explantes da membrana amniótica foram implantados em placas de cultivo de 100 mm de diâmetro (Corning, Cat.3296, NY, USA) e preenchidas com 7 ml de meio de cultivo. Foram testados três meios de cultivo: DMEM-HIGH GLUCOSE (LGC Biotecnologia, Cat. BR30003-05, Cotia, São Paulo), DMEM/HAM'S-F12(1:1) (LGC Biotecnologia, Cat. BR30004-05, Cotia, São Paulo) e MEM/ALPHA (LGC Biotecnologia, Cat. BR3007-05, Cotia, São Paulo) suplementado com 15% de SFB (soro fetal bovino, LGC Biotecnologia, Cat. BR330110-01, Cotia, São Paulo), 1% de estreptomicina/penicilina, 1% de aminoácidos não essenciais (LGC Biotecnologia, Cat. BR30238-01, Cotia, São Paulo) e 50 µL de piruvato de sódio (Sigma, Cat. S8636, St. Louis, Mo. USA). As placas foram mantidas em estufa a temperatura de 37°C, com umidade relativa próxima de 100% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, foram observadas as primeiras células aderentes. Após a adesão das células o meio era trocado de 48 a 72 horas. Quando as células atingiam confluência de 80% elas eram tripisinizadas para sua expansão. Para tanto, as células eram lavadas com PBS e acrescentado tripsina 0,25% (LGC Biotecnologia, Cat. BR30042-01, Cotia, São Paulo) e mantidas por cinco minutos na estufa a 37°C. Ao final, para neutralizar a tripsina colocava-se a mesma quantidade de meio de cultura e centrifugava por cinco minutos a 1200 rpm, para então expandir as células. Todos os experimentos foram realizados na passagem 4 e 8.

4.2.2 Análise Morfológica

Para a análise morfológica das células derivadas da membrana amniótica, as amostras foram avaliadas a cada 3 dias através de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100). As células foram avaliadas periodicamente até serem congeladas, desta maneira foi possível observar e descrever as variações morfológicas durante seu crescimento.

4.2.3 Teste de Viabilidade de Criopreservação

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas de membrana amniótica foram congeladas para realização de experimentos futuros. As células foram tripisinizadas como já descrito anteriormente e aproximadamente um milhão de células foram ressuspensas em 1,5 ml de meio de congelamento contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (LGC Biotecnologia, Cat.13-0091.01, Cotia, São Paulo) igualmente distribuídas em criotubos (Corning, Cat.430055, NY,USA). Seguido este procedimento, os criotubos foram transferidos para o aparelho Mister Froozen e mantidas em freezer -80°C overnight. Depois de 24 horas, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenados.

Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C . Depois de descongelada, a suspensão celular contida nos criotubos foi transferida para tubos cônico de polipropileno de 15 ml (Corning, Cat.430055, NY,USA) contendo aproximadamente 5 ml de meio de cultivo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio de cultivo, transferidas para garrafas e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 a 37°C para expansão celular.

4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta técnica, amostras das células foram colocadas em cultivo sobre lamínulas de vidro. Após a aderência nas lamínulas, as células foram fixadas em

glutaraldeído 2,5%, lavadas em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de desidratações contínuas em álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e 100%). Por fim as mesmas foram desidratadas à seco em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente as amostras foram colocadas em suporte metálico para revestimento em ouro ("sputtering" Emitech K550). Para observar os resultados foi utilizado o microscópio eletrônico ME Leo 435 VP.

4.2.5 Ensaio de Avaliação do Metabolismo Celular pelo Método Colorimétrico-MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmicheal et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide]), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis. O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 12 dias para análise da proliferação celular das células de membrana amniótica de coelho. Para tanto, 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 wells em um volume de 210 μ L/poço para cada dia de experimento. Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 100 μ l de meio novo e mais 10 μ l da solução A de MTT (Life Technologies, Cat. V-13154, Carlsbad, CA, USA) (1 mL de PBS diluído na solução A de MTT 5mg). Essa mistura foi incubada por 4 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, acrescentou mais 100 μ l da solução B (0,01M HCl diluído em 10 ml de água destilada e acrescentados na solução B de MTT 1g), permanecendo por mais 4 horas a 37 °C, protegido da luz. Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (MQuant–Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 545 nm.

4.2.6 Caracterização Celular por Imunocitoquímica

Primeiramente, 1×10^4 células provenientes do cultivo celular de membrana amniótica de coelhos foram plaqueadas em placas de cultivo de 24 wells, as quais continham lamínula de vidro. Quando as células atingiram confluência de 80% todo meio de cultivo foi retirado e as células foram lavadas com PBS por 2 vezes e acrescentado paraformoldeído 4% por 30 minutos. Posteriormente as células foram lavadas em solução de TBS (Tampão Salino de Tris) por 2 vezes para a retirada de todo paraformoldeído. Em seguida, foi adicionado Triton a 0,1%, nos anticorpos nucleares como Nanog (n-17,sc30331,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e OCT-4(sc-4420,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) até cobrir toda a superfície da lamínula por 10 minutos, para promover a permeabilização da membrana celular. Posteriormente, as células foram novamente lavadas 2 vezes com solução de TBS. Para evitar reações inespecíficas, foi utilizado a solução de 5% de soro fetal bovino e 0,1 % de Triton diluídos em TBS durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após este período, as células foram incubadas “overnight” a 4°C com anticorpos primários sendo eles anti-mouse: Vimentina (sc-73259,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Citoqueratina 18 (sc-32329,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Stro-1(sc-47733,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Pcn-3 (sc-46,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), CD105 (Abcam, ab53321, Cambridge, UK),OCT-4 (sc-4420,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e Nestina (sc-33677, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), anti-rabbit SSEA4 (sc-59368,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), β -tubulina (sc-47751,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e CD117 (A4502, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), anti-goat Nanog (n-17, sc30331,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Sox-2 (sc-17320,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe), Tra-1 (sc-21705,Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e CD73 (sc-14684, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe) e finalmente o anticorpo conjugado CD45 (Invitrogen, MHCD4501,Carlsbad, CA, USA) diluídos em PBS na proporção de 1:50. Passado este período, as células foram lavadas 3 vezes com TBS. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG mouse-conjugado a FITC, anti-IgG goat-conjugado a FIT e anti-IgG rabbit-conjugado a FIT) na diluição de 1:500 por uma 30 minutos em câmara escura. As células foram novamente lavadas com TBS por 3 vezes e posteriormente montadas com solução de montagem Vectashield com DAPI (ABCYS, Paris France). As células foram observadas no microscópio de fluorescência LSM 510 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) em objetivas de 20x e 40x.

4.2.7 Caracterização Celular por Citometria de Fluxo

Para análise imunofenotípica foi utilizado o método de citometria de fluxo. As células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBSA na concentração de 1×10^5 células/mL e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1:100) por 30 minutos a 4°C. Após este período as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:500) por 30 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário inespecífico. Para cada amostra, foram contados 10000 eventos. Os anticorpos primários utilizados foram: Nanog (n-17, sc30331), Sox-2 (sc-17320), Vimentina (sc-73259), Citoqueratina 18 (RGE53, sc-32329), Nestina (sc-33677), Stro-1(sc-47733), PCNA (sc-46) β -tubulina (sc-47751), SSEA-4 (sc-59368) TRA-1-60 (sc-21705), CD73 (sc-14684), CD 105 (Abcam, ab53321, Cambridge, UK) CD 117(A4502, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), CD45 (Invitrogen, MHCD4501, Carlsbad, CA, USA).

4.3 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

4.3.1 Diferenciação Adipogênica e Osteogênica

Para a diferenciação adipogênica e osteogênica foram plaqueadas 1×10^4 células para teste e 1×10^3 células para controle sendo cultivadas em placas de 24 wells com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. A diferenciação iniciou quando as células atingiram confluência de 80%. Primeiramente o meio de cultivo foi removido e adicionou-se 1 ml de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) para os testes e para os controles adicionou-se somente DMEM-HIGH, 15% SFB e 1% de

penicilina/estreptomicina. As placas foram reincubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana. O meio utilizado para troca continha o dobro da concentração dos agentes indutores. As amostras foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 21 dias até a diferenciação celular e monitoradas em microscópio de luz invertido (Nikon Eclipse TS-100).

O meio utilizado para a indução da diferenciação osteogênica era composto por DMEM-HIGH suplementado com 7,5% de Soro Fetal Bovino comum, 100 µM de ácido ascórbico (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 mM de beta-glicerolfostato (Sigma, St. Louis, Mo. USA) e 0,1mM de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil) em cada poço. As células diferenciadas em osteócitos e os seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas com a coloração de Von Kossa e Alizarina Red e a seguir, montadas em permout.

A diferenciação adipogênica foi induzida adicionando DMEM-HIGH suplementado com 7,5% SBF, 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 µM de indometacina (Sigma-Aldrich) e 1 mM de dexametasona em cada poço (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil). As células diferenciadas em adipócitos e os seus controles foram fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e após, lavados em água destilada e incubados em álcool 70% por 2 a 3 minutos e coradas com a coloração Oil Red.

4.3.2 Diferenciação Condrogênica

Para a diferenciação em condrócitos uma suspensão celular contendo 10⁶ células indiferenciadas, foi ressuspensa em 2 ml de meio indutor (StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit / GIBCO – Invitrogen cell culture) em um tubo cônico de polipropileno de 15 mL e então, centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos. O botão celular obtido foi cultivado no próprio tubo, em estufa úmida, a 37°C com 5% de CO₂ e a metade do meio de cultivo foi cuidadosamente removido e um 1 ml de meio novo de indução adicionado 2 vezes por semana. Após 21 dias, a amostra foi

lavada com PBS e fixada em solução de paraformaldeído 4% por 2 horas. A seguir, a amostra foi desidratada em banhos sucessivos de álcool a 50, 70, 90%, seguidos de três banhos a 100% com duração de 10 minutos cada. Na sequência, receberam dois banhos de xilol com duração de 2 minutos, respectivamente, e então, foi colocada em banho com *paraplast* líquido a 60°C, em estufa seca, por 30 minutos e incluída em *paraplast*. Foram realizados cortes de 4 µm e colocados sobre lâminas de vidro. Na sequência, foram coradas com, Hematoxilina-Heosina, Tricromo de Masson e Picrosírius. JUNQUEIRA et al.,1979; TOLOSA et al., 2003)

4.4 POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Para análise do potencial tumorigênico foram aplicadas 1×10^6 células em 2 camundongos BALB/c nude. Os animais foram adquiridos e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia.

Inicialmente, as células foram tripsinizadas seguindo protocolo de repique celular, centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e lavadas com PBS. Posteriormente, o precipitado foi ressuspendido em 50 µl de solução fisiológica e aplicado nos animais. Cada animal recebeu aplicação de 10^6 células por via subcutânea na região dorsal com o auxílio de uma seringa de insulina. A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada semanalmente no durante o período de oito semanas. Após as oito semanas os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo do comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Amostras do bíceps, fígado, pulmão, rim, coração e pâncreas foram coletados e fixados em paraformaldeído a 4%. Tecidos para exame histopatológico foram embebidos em parafina e seccionados a 5 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e investigado com um microscópio Olympus (CX 31 RBSFA).

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA

Para o cultivo celular foram testados três meios diferentes ALFA-MEM, DMEM-HAM'S F12 e DMEM-HIGH Glucose todos suplementados com 15% de soro fetal bovino. Depois de testados, tanto o meio ALFA-MEM quanto o DMEM-HMA'S F12 resultaram primeiramente em um lento crescimento celular, demorando em media de três a quatro dias para o explante começar a soltar células e em seguida a mudança morfológica nas células, seguido de desprendimento das mesmas da placa de cultivo e finalmente morte celular. No entanto, o DMEM-HIGH quando testado mostrou resultados satisfatórios sendo considerado o melhor meio para cultivar as células de membrana amniótica por conta da alta taxa de crescimento, maior aderência celular, morfologia e viabilidade (Figura 1 A e 1B). Após 24 horas de cultura, foi possível observar as primeiras células aderentes nas placas de cultivo (Figura 2A e 2B). O meio de cultivo era trocado em media 3 vezes por semana, sendo todo o meio retirado e substituído por meio novo. Em media a cada 3 dias, as células atingiam confluência de 80%, realizando-se assim a expansão das culturas (Figuras 2C e 2D).

Figura 1 - Fotomicrográfica de células de membrana amniótica de coelho com 2 dias de cultivo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: As células foram cultivadas em 3 meios de cultivo diferentes: DMEM-HIGH, ALFA-MEM, DMEM-HAM'S F12. Em [A] cultivo com ALFA-MEM, notar no círculo a morfologia das células disformes e mortas, o mesmo padrão que ocorreu com células cultivadas em DMEM-HAM'S F12. Em [B] cultivo em DMEM-HIGH. Notar a aderência e morfologia fibroblastóide das células (seta). Aumento de 4x.

Figura 2 - Fotomicrográfrica de células de membrana amniótica de coelho

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Células obtidas de membrana amniótica com 16 dias de gestação cultivadas em meio DMEM-HIGH Glicose suplementado com soro fetal bovino. Em [A] células com 24 horas de cultivo, notar fragmento de membrana amniótica (MA) e região de liberação de células do fragmento (circulo vermelho). Em [B] notar morfologia fibroblastóide das células e sua aderência (seta). Em [C] pode-se observar uma placa de cultivo com confluência de 50% das células e em [D] confluência de 80%. Quando comparamos [C] onde as células possuem mais espaço com [D] onde possuem intimo contato entre elas podemos notar que elas perdem as ramificações do citoplasma e passam a ter um formato mais arredondado. Aumento em A, C e D 4x e B 10x .

5.2 ANÁLISE MORFOLOGICA DAS CÉLULAS

Nas culturas, em media por volta do terceiro dia de cultivo as células atingiam confluência de 80%, sendo possível tripisinizar e expandir as células. Devido a alta capacidade de expansão e rápida proliferação, obteve-se uma grande quantidade de células, havendo predomínio de células fibroblastóides, as quais apresentaram citoplasma alongado e núcleo esférico e centralizado (Figura 3A e 3B). As células eram fotografadas duas vezes por semana para sua análise morfológica, não demonstrando nenhuma alteração em sua morfologia ao longo das análises. As células foram levadas até a passagem 8, onde mantiveram as mesmas características (Figura 3C e 3D). No entanto quando analisadas em citometria de fluxo notamos duas populações distintas (Figura 4).

Figura 3 - Fotomicrográfrica de células de membrana amniótica de coelho

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Células obtidas de membrana amniótica com 16 dias de gestação cultivadas em meio DMEM-HIGH Glicose suplementado com soro fetal bovino. Em [A] e [B] células na passagem 4, notar o citoplasma alongado (seta). Em [C] e [D] microscopia eletrônica de varredura. Células na passagem 8 demonstrando a mesma morfologia fibroblastóide, notar o citoplasma alongado com núcleo esférico e centralizado (seta). Aumento em A 10x e B 4x.

Figura 4 - Análise morfológica de células progenitoras de membrana amniótica de coelho por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar os círculos demonstrando as duas populações de células que puderam ser identificadas, com tamanho e granulosidade diferentes.

5.3 TESTE DE VIABILIDADE DE CRIOPRESERVAÇÃO

Alíquotas de 1×10^6 células derivadas de membrana amniótica foram congeladas para realização de experimentos futuros. Quando necessário, as células foram submetidas ao descongelamento rápido no banho-maria a 37°C . Depois de descongeladas as células foram transferidas para tubo polipropileno de 15 ml e centrifugadas, sendo posteriormente transferidas a garrafas medias e mantidas em cultura. As células apresentaram as mesmas características que tinham antes de serem congeladas, possuindo formato fibroblastóide com citoplasma alongado e núcleo esférico centralizado. Sua capacidade de proliferação permaneceu a mesma, podendo se obter uma confluência de 80 % com três dias de cultivo, como demonstrado nas figuras (3 A e 3 B).

5.4 ENSAIO DE AVALIAÇÃO DO METABOLISMO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO - MTT

Para a realização do MTT 1×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. A leitura do experimento foi realizada durante 12 dias com intervalo de 48 horas. Células de membrana amniótica foram utilizadas em duas passagens P4 e P8, como demonstram os gráficos a seguir.

O gráfico 1 demonstra a análise de proliferação de células de membrana amniótica de coelho na passagem 4. Notamos um crescimento inicial até o quarto dia, seguido por uma queda do quarto ao sexto dia, com retorno do crescimento até o oitavo dia, decaindo novamente até o décimo segundo dia.

O gráfico 2: demonstra a análise de proliferação de células de membrana amniótica na passagem 8. Notamos baixa taxa de crescimento até o sexto dia, seguido por um crescimento contínuo até o oitavo dia, o qual foi seguido por uma queda contínua até o décimo segundo dia.

Gráfico 1 - Ensaio de proliferação de células progenitoras de membrana amniótica de coelho na passagem 4 pelo método colorimétrico de MTT. Amostras quadruplicadas avaliadas durante 12 dias

Gráfico 2 - Ensaio de proliferação de células progenitoras de membrana amniótica de coelho na passagem 8 pelo método colorimétrico de MTT. Amostras quadruplicadas avaliadas durante 12 dias

5.5 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR IMUNOCITOQUÍMICA

Foi realizado a análise de imunocitoquímica nas células de membrana amniótica de coelho a fim de verificar a expressão de marcadores de células mesenquimais (Vimentina, Stro-1, Citoqueratina 18, β -tubulina, CD-105 e CD-73), pluripotência (Nanog, Oct-4, SSEA-4, Tra-1 e Sox-2), proliferação celular (PCNA-3), células hematopoiéticas e precursoras de células hematopoiética (CD-45 e CD-117), células de fator de crescimento endotélio vascular (VEGF) e células progenitoras neuronais (Nestina).

Marcadores de estrutura celular estavam expressos nas células progenitoras de membrana amniótica de coelho. As células foram imunopositivas para Vimentina (Figura 5A), Citoqueratina 18 (Figura 5B) marcadores específicos para filamento intermediário e β -tubulina (Figura 5C), marcador específico para microtúbulos de membrana. Verificamos ainda as reações imunopositivas para marcadores de células tronco mesenquimais CD-105 (Figura 5D), CD-73 (Figura 5E), e Stro-1 (Figura 5F).

Observamos também marcação imunopositivas para marcadores de proliferação celular como PCNA-3 (Figura 6A), fator de crescimento de endotélio vascular como VEGF (Figura 6B) e marcador de células progenitoras neuronais como Nestina (Figura 6C). E marcação positiva para células hematopoiéticas CD-45 (Figura 6D) e precursores de células hematopoiética CD-117 (Figura 6E).

Marcadores de pluripotência também apresentaram marcação imunopositivas para Nanog (Figura 7A), Oct-4 (Figura 7B), SSEA-4 (Figura 7C), Tra-1-60 (Figura 7D) e Sox-2 (Figura 7E).

Todas as análises de imunocitoquímica foram realizadas com células na passagem 4 e 8, ambas apresentaram a mesma reação como já descrito acima.

Figura 5 - Fotomicrográfrica de imunocitofluorescência de células de membrana amniótica de coelho

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Perfil de expressão de marcadores nas células de membrana amniótica de coelho com 16 dias de gestação na passagem 4. Reações imunopositivas para marcadores de estrutura celular e de células tronco mesenquimais, Em [A] Vimentina, [B] CK, [C] β -tubulina, [D] CD73, [E] CD105 e [F] STRO-1. Notar em verde membrana celular, devido ao anticorpo secundário FITC e núcleo azul em DAPI.

Figura 6 - Fotomicrográfrica de imunocitofluorescência de células de membrana amniótica de coelho

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Perfil de expressão de marcadores de proliferação celular, fator de crescimento de endotélio vascular, células progenitoras neuronais, células hematopoiéticas e precursores de células hematopoiéticas, respectivamente. Nas células de membrana amniótica de coelho com 16 dias de gestação na passagem 4. Em [A] PCNA-3, [B] VEGF, [C] Nestina, [D] CD45 e [E] CD117. Notar em verde membrana celular, devido ao anticorpo secundário FITC e núcleo azul em DAPI.

Figura 7 - Fotomicrográfrica de imunocitofluorescência de células de membrana amniótica de coelho

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Perfil de expressão de marcadores de pluripotência nas células de membrana amniótica de coelho com 16 dias de gestação na passagem 4. Em [A] Nanog, [B] Oct-4, [C] SSEA-4, [D] Tra-1 e [E] Sox-2. Notar em verde membrana celular, devido ao anticorpo secundário FITC e núcleo azul em DAPI.

5.6 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise de marcadores por citometria de fluxo, células de membrana amniótica na passagem 4 e 8 foram analisadas, demonstrando resultados similares em ambas passagens para quase todos os marcadores.

A análise de células de membrana amniótica de coelho na passagem 4 demonstrou níveis altos de expressão para marcadores de citoesqueleto como Vimentina (58%), Citoqueratina 18 (57,5%) e β -tubulina (26,2%). Marcadores mesenquimais apresentaram níveis consideráveis, exceto o CD-73 (3,72%) que apresentou um nível insignificante em relação aos outros marcadores tais como, CD-105 (40%) e Stro-1 (58,5%)(Figura 8).

Houve uma baixa expressão para marcadores de células precursoras hematopoiéticas e células hematopoiéticas, CD-117 (18%) e CD-45 (7,29%), respectivamente. No entanto o marcador de proliferação PCNA-3 teve uma alta expressão (58%), porém quando testado marcadores de células progenitoras neuronais obtivemos baixa expressão Nestina (8,25) (Figura 9).

Quando testados, os marcadores de pluripotência demonstraram alta expressão para Nanog (70,1 %), SSEA-4 (60,7%) e TRA-1 (52,7%) e uma menor expressão para SOX-2 (14,2)(Figura 10).

Analizamos também as células na passagem 8, elas demonstraram níveis elevados de expressão para marcadores de citoesqueleto como Vimentina (43,3%) e Citoqueratina 18 (39,4%), no entanto β -tubulina (13,6%) demonstrou uma baixa expressão em relação aos outros. Marcadores mesenquimais expressaram níveis consideráveis, CD-73 (35,7%), CD-105 (47,9%) e Stro-1 (40,1)(Figura 11).

Marcador de células precursoras hematopoiéticas, CD-117, apresentaram níveis elevados de expressam (43,5%), ao contrário do marcador de células hematopoiéticas CD-45 (0,57%) que teve marcação insignificante. O marcador de proliferação PCNA-3 apresentou altos níveis de expressão (67,7%), ao contrário do marcador de células precursoras neuronais (Nestina) que não observou marcação significativa (0,72%)(Figura 12).

Marcadores de pluripotência como SSEA-4 (83,4%) e Sox-2 (33,8%) apresentaram altos níveis de expressão, diferindo de Nanog (0,72%) e Tra-1 (0,90%) que não possuíram marcação significativa(Figura 13).

O gráfico 3 compara as porcentagens de expressão de cada anticorpo utilizado na caracterização imunofenotípica em relação as duas passagens que o experimento foi realizado.

Figura 8 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P4 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar níveis de expressão positivos para marcadores de citoesqueleto (Vimentina, Citoqueratina e β -tubulina) e marcadores de células mesenquimais (CD-105 e Stro-1), e marcação insignificante para CD-73.

Figura 9 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P4 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar níveis baixos de expressão positiva para marcadores de células precursoras hematopoiéticas e células hematopoiéticas (CD-117 e CD-45) e para células precursoras neuronais (Nestina) e uma alta expressão para marcador de proliferação (PCNA-3).

Figura 10 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P4 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar expressão positiva para marcadores de pluripotência (Nanog, SSEA-4, Tra-1 e Sox-2).

Figura 11 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P8 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar marcação positiva para marcadores de citoesqueleto (Vimentina, Citoqueratina e β tubulina) e para marcadores mesenquimais (CD-73, CD-105 e Stro-1).

Figura 12 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P8 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar marcação positiva para marcadores de células precursoras hematopoiética (CD-117) e de proliferação (PCNA-3) e expressão quase nula para células hematopoiéticas (CD-45) e células precursoras neuronais (Nestina).

Figura 13 - Histograma da imunofenotipagem das células de membrana amniótica de coelho em P8 por citometria de fluxo

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Notar marcação positiva para os marcadores de pluripotência (SSEA-4 e Sox-2) e marcação quase nula para Nanog e TRA-1.

Gráfico 3 - Porcentagem referente a expressão de marcadores na passagem 4 e 8, utilizado para imunofenotipagem de células progenitoras de membrana amniótica de coelho.

5.7 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células de membrana amniótica foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos, osteócitos e condrócitos através da adição de meios específicos no cultivo. As células foram mantidas nos meios indutores por 21 dias, após este período foram realizados as devidas colorações para a análise morfológica.

As células diferenciadas na linhagem adipogênica foram coradas com coloração Oil Red tornando-se possível observar as mudanças na morfologia das células. Estas passaram a apresentar um citoplasma globoso com núcleo deslocado para a periferia. No interior do citoplasma, aglomerados de vesículas lipídicas foram observadas (Figuras 14 A e 14 B), diferindo das células controles que apresentam morfologia fibroblastóide com núcleo centralizado no interior do citoplasma (Figura 14 C).

As células diferenciadas na linhagem osteogênica foram coradas com coloração de Von Kossa (Figura 14 D) e de Alizarina Red (Figura 14 E). Tornou-se possível verificar uma matriz extracelular calcificada, onde regiões com maior calcificação formavam a matriz óssea, diferindo das células controles que mantiveram sua morfologia característica (Figura 14 F).

As células diferenciadas na linhagem condrogênica, foram visualizadas pelas colorações de Hematoxilina- Eosina (Figura 15 A), Tricrômio de Masson (Figura 15 B) e Picrosirius (Figura 15 C e 15 D). Notou-se nas mesmas a perda de sua morfologia fibroblastóide, as quais assumiram morfologia mais arredondada com núcleo globoso, e aparecimento de regiões semelhantes á lacunas condrocitárias ricamente entremeadas por fibras colágenas.

Figura 14 - Fotomicrográfica de células de membrana amniótica de coelho em ensaios de diferenciação

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Em [A] e [B], diferenciação adipogênica coradas com coloração Oil Red. Notar: vesículas de gordura (setas) aglomeradas no interior do citoplasma e núcleo celular deslocado para periferia da célula. Em [C] controle da diferenciação adipogênica mostrando que as células mantiveram sua morfologia fibroblastóide. Em [D] e [E], diferenciação osteogênica coradas com coloração de Von Kossa e Alizarina Red, respectivamente. Notar (setas) calcificação óssea e formação de matriz extracelular (ME). Em [F] células controle demonstrando a manutenção da morfologia celular.

Figura 15 - Fotomicrográfica de células de membrana amniótica de coelho em ensaios de diferenciação

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: Em [A] coloração de Hematoxilina-Eosina, [B] Tricrômio de Masson, [C] e [D] Picrosirius. Notar o formato arredondado com núcleo globoso (semelhante à condroblastos) adquirido pelas células amnióticas durante a diferenciação adipogênica, bem como a formação de uma matriz rica em fibras de colágeno que entremeia as células. Observar (seta vermelha) núcleo das células, (seta preta) a formação das lacunas condrocitárias e (seta azul) as fibras de colágeno.

5.8 POTENCIAL TUMORIGÊNICO

Células de membrana amniótica na passagem 4 e 8 foram injetadas no membro pélvico esquerdo de dois camundongos nude (Figura 16 A). Os animais foram observados durante oito semanas, e durante esse período não apresentaram sinais de formação tumoral nem na região de aplicação das células, nem em qualquer outra região corpórea.

Após oito semanas, os animais foram eutanasiados, analisando-se macroscopicamente o membro no qual foi realizada a aplicação celular (Figura 16 B).

Histopatologicamente os rins, pulmão, fígado, coração e baço foram analisados mostrando que continuaram com as mesmas características estruturais características dos seus tecidos portanto, não apresentaram qualquer alteração que pudesse estar relacionada com crescimento metastático tumoral (Figura 16 C-M).

Figura 16 - Análise do potencial tumorigênico de células de membrana amniótica injetadas em camundongos nude

Fonte: (BORGHESI, 2014)

Legenda: [A] demonstra o momento da aplicação das células no membro pélvico esquerdo. Notar macroscopicamente em [B] depois de 8 semanas que não houve formação tumoral no membro no qual foram injetadas as células. Notar na análise histopatológica em [C] e [D] rim; [E] e [F] pulmão; [G] e [H] fígado; [I] e [J] coração e [L] e [M] baço que não houve formação tumoral, uma vez que os órgãos permaneceram com as mesmas características histológicas características. Observar (GL) glomérulo, (TCP) túbulo contorcido proximal, (seta) túbulo contorcido distal, (A) alvéolo, (BI) bronquíolo e (VC) veia centro lobular.

6 DISCUSSÃO

Estudos recentes demonstraram a grande capacidade de diferenciação das células tronco derivadas de membrana amniótica, reafirmando a importância em se estudar a morfologia, o comportamento, capacidade de diferenciação, aplicabilidade e sucesso em tratamentos *in vivo* destas células, para que num futuro próximo haja expansão de sua aplicabilidade para outras doenças, além daquelas que para as quais já tem sido utilizadas dentro da terapia celular (PAROLINI et al., 2008; ISMAIL et al., 2009; MIHU et al., 2009).

As células de membrana amniótica foram isoladas pelo método de explante, sendo o mesmo método utilizado por Marcus et al. (2008) em ratos e Uranio et al. (2011) em cães, diferindo de trabalhos que utilizaram digestão enzimática com tripsina ou colagenase para obtenção de uma cultura de células mais homogênea (ROSSI et al., 2012; TABATABAEI et al., 2014). Segundo o método de isolamento a partir da membrana amniótica, dois tipos celulares podem ser obtidos, quando isoladas por digestão de tripsinas as células liberadas são epiteliais e quando isoladas por digestão de colagenase as células liberadas são fibroblastóides (PAROLINI et al., 2008). No entanto nossa cultura foi realizada pelo método mecânico de explante, com isso obtivemos uma cultura mista contendo ambos os tipos celulares.

Após a definição do método de isolamento foi necessário a escolha do meio de cultivo, uma vez que a literatura diferia quanto aos meios utilizados para o cultivo de células oriundas de membrana amniótica em cada espécie. Os meios comumente utilizados eram ALFA-MEM (COLI et al., 2011), DMEM-HAM'S F12 (ZHU et al., 2013; VIDANE et al., 2014) e o mais frequentemente o DMEM-HIGH (DIAZ-PRADO et al., 2011; SEO et al., 2012; PAROLINI et al., 2014), testamos esses três tipos de meios, e o que podemos observar foi que tanto com ALFA-MEM quanto o DMEM-HAM'S F12 não obtivemos um crescimento satisfatório, quando comparado com o DMEM-HIGH, para o qual foi possível verificar um melhor crescimento e proliferação *in vitro*, sendo visto as primeiras células aderentes com morfologia fibroblastóide predominantes já nas primeiras 24 horas de cultivo como observado por Marcus et al. (2008).

Com o estabelecimento da cultura foi possível analisar sua capacidade de criopreservação. As células foram congeladas e posteriormente descongeladas para sua análise, demonstrando a mesma característica morfológica que possuíam anteriormente, formato fibroblastóide e a alta capacidade de proliferação, resultados compatíveis com Francioli (2012) e Vidane et al. (2014). Com esta análise foi possível criar um banco de células para expansão e realização dos experimentos, assim como para a realização de outros experimentos futuros, como ensaios *in vivo* e outros testes *in vitro*.

Em nossos estudos de viabilidade celular, observamos pelos gráficos de MTT que as células na passagem 4 tiveram um crescimento, seguido por uma queda, apresentando uma retomada de crescimento antes do decaimento ao término do ensaio. No gráfico onde utilizou-se células na passagem 8, observamos um crescimento contínuo, seguido por uma queda até o término do ensaio. Isso demonstra o que já havíamos observado no cultivo, que células na passagem 4 tentem a apresentar proliferação e expansão melhores, do que aquelas oriundas de passagens mais avançadas (passagem 8), as quais possuem proliferação contínua, no entanto mais retardada em relação a passagens menores. Nossos resultados diferem de outras células de membrana amniótica fibroblastóides que apresentaram um perfil de células tronco mesenquimais com um crescimento contínuo (FRANCIOLLI, 2012; VIDANE et al., 2014), no entanto nossos resultados se assemelham mais aos estudos de Winck (2012) que trabalharam com culturas de células mistas, semelhantes a nossa. Neste trabalho, o autor demonstra que houve uma proliferação inicial, seguida por uma queda e então uma retomada de proliferação até o final do experimento, embora nossos resultados mostrem uma queda na fase final das análises.

A caracterização imunofenotípica foi realizada pelas técnicas de imunocitoquímica e por citometria de fluxo. Nas análises de imunocitoquímica todos os anticorpos testados apresentaram reações imunopositivas sendo, estes marcadores de citoesqueleto (Vimentina, Citoqueratina 18, β -tubulina), células mesenquimais (CD-73, CD-105, Stro-1), células precursoras neuronais (Nestina), fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), proliferação (PCNA-3), pluripotência (Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA-1, SOX-2), células precursoras hematopoiéticas (CD-117) e células hematopoiéticas (CD-45). Esta imunopositividade para marcador de células hematopoiéticas (CD-45) não era

esperado uma vez que a membrana amniótica é uma membrana avascularizada, no entanto nossos resultados assemelharam-se com os de Winck (2012) em cães e Franciolli (2012) em equinos que também tiveram marcação positiva. No entanto, apesar da membrana amniótica ser normalmente avascular, esta reação positiva para CD45 pode estar relacionado ao fato de que, ao longo do desenvolvimento embrionário dos coelhos e roedores, o saco vitelino se justapõe à membrana amniótica. Durante esse processo, o saco vitelino (membrana com funções relacionadas à hematopoese e formação dos primeiros vasos sanguíneos fetais) pode influenciar na formação de pequenos vasos sanguíneos na membrana amniótica (BOLLEROT; POUGET; JAFFREDO, 2005; MAGATTI et al., 2008).

No entanto, na citometria de fluxo, obtivemos alguns resultados diferentes aos encontrados na imunocitoquímica, contudo vale ressaltar que a análise de citometria é uma técnica muito mais sensível e confiável de análise com marcação de anticorpos, uma vez que ela nos concede não apenas dados qualitativos, mas também quantitativos (porcentagem de células marcadas) a cerca da expressão dos anticorpos analisados. Por outro lado, a técnica de imunocitoquímica revela apenas se houve ou não expressão do anticorpo analisado, independente se a expressão foi alta ou baixa. Com isso analisamos através da citometria de fluxo as células nas passagens 4 e 8 e obtivemos uma diferença significativa em relação à expressão de alguns anticorpos nas duas passagens.

Avaliou-se marcadores de citoesqueleto e células mesenquimais como Vimentina e Citoqueratina 18, os quais são anticorpos de filamento intermediário e β -tubulina marcador de microtúbulo de membrana, assim como CD-73, CD-105 e Stro-1, bem como Vimentina e Citoqueratina, que caracterizam linhagens de células mesenquimais e células epiteliais (citoqueratina+), respectivamente, e ambas obtiveram níveis de expressão alto, demonstrando que nossa cultura possuía heterogeneidade na composição celular (TABATABAEI et al., 2014). O marcador mesenquimal CD-105 teve uma alta expressão em ambas as passagens, assim como o Stro-1(58%,5), porém quanto a este último, na passagem 8 sua expressão decaiu um pouco(40,1%), o que pode ser justificado pelo fato que uma das características conhecida para este anticorpo é a perda de sua expressão ao longo das passagens (KOLF et al., 2007). No entanto quanto a expressão de CD-73 observamos que na passagem 4 sua expressão é quase nula, e na passagem 8 houve aumento considerável do nível de expressão (DIAZ PRADO et al., 2011;

FRANCIOLLI, 2012; PARK et al., 2014; VIDANE et al., 2014). As células de membrana amniótica de coelho também foram positivas para células precursoras hematopoiéticas (CD-117) (DIAZ-PRADO et al., 2011) e negativas para CD-45, corroborando com outros estudos previamente realizados (MARCUS et al., 2008; VIIDANE et al., 2014; PAROLINI et al., 2014). No entanto, na análise de imunocitoquímica foi possível observar algumas células marcadas, embora na citometria a porcentagem de células marcadas tenha sido tão pequena que chega a ser considerado insignificante. O marcador de proliferação celular (PCNA-3) marca células em proliferação, embora o mesmo tenha mostrado aumento na sua expressão ao longo das passagens, com aproximadamente 9,7% de aumento da passagem 4 para a 8, estes dados corroboram com as análises observadas em cultura e no ensaio de MTT, onde as células nas primeiras passagens apresentaram uma proliferação mais rápida, no entanto, com o decorrer das passagens sua proliferação continua de maneira mais contida em relação as outras, semelhante ao observado para membrana amniótica de equino (FRANCIOLLI, 2012).

A expressão de marcadores de pluripotência como já esperado demonstrou alta expressão, como observado para SSEA-4, Sox-2 (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; RUTIGLIANO et al., 2013, ZHU et al., 2013). No entanto, o Nanog teve alta expressão na passagem 4 e expressão insignificante na passagem 8 (2,73%), assim como observado para o TRA-1 (2,76%). O gene Nanog é capaz de manter a pluripotência e as características de auto renovação de células tronco embrionárias, porém os fatores que controlam a expressão desses genes ainda permanecem desconhecidos (CHAMBERS et al., 2003), no entanto TRA-1 também é expresso na superfície de células embrionárias e durante a diferenciação ele deixa de ser expresso, havendo também expressão desse gene em células de carcinoma embrionário (PERA; RAUBINOFF; TROUNSON, 200). Com isso, podemos presumir em relação aos nossos resultados, que as células de membrana amniótica na passagem 4 possuem características mais acentuadas de pluripotência, do que as células na passagem 4.

A capacidade da célula se diferenciar em linhagens específicas é um dos itens necessários para sua caracterização como uma célula tronco. Em nosso estudo, induzimos as células através de meios específicos a se diferenciarem em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas. As células se diferenciaram nas três linhagens como esperado devido a resultados semelhantes em membrana amniótica

de humanos (SONCINI et al., 2007; PAROLINI et al., 2008; CHANG et al.,2010; DIAZ-PRADO et al.,2011), equino (SEO et al., 2012), gato (RUTIGLIANO et al.,2013; VIDANE et al.,2014) e cão (PARK et al.,2012). Nosso tempo de indução de diferenciação foi de 21 dias, o mesmo dos trabalhos de membrana amniótica referidos anteriormente, porém diferente de trabalhos de células tronco oriundas de tecidos adultos, onde o tempo de diferenciação foi de 14 dias (CSAKI et al., 2007; NEUPANE et al., 2008). Este tempo para as células se diferenciarem possui relação direta com a origem da célula que esta sendo induzida a diferenciação. Células tronco de tecidos adultos já estão maduras e determinadas a se diferenciarem em linhagens celulares específicas, por isso se diferenciam mais rápido, no entanto células de tecidos embrionários ou fetais são imaturas por isso levam um tempo maior para se diferenciarem.

Após o isolamento, caracterização e diferenciação das células, pré-requisitos necessários para definir as células como células tronco, realizamos o teste de potencial tumorigênico, a fim de avaliar se estas células possuem potencial para serem utilizadas na medicina regenerativa. As células de membrana amniótica de coelho na passagem 4 e 8 foram injetadas no membro pélvico esquerdo de dois camundongos nude, e após 8 semanas não foi observada nenhuma formação tumoral macroscópica no local de inoculação das células, e as análises histopatológicas da musculatura e dos órgãos coletados também não demonstraram potencial metastático. Resultado este compatível com os encontrados que demonstram que células de membrana amniótica não possuem a capacidade de formação tumoral como em nossos achados (WINCK, 2012; FRANCIOLLI, 2012; VIDANE et al., 2014).

7 CONCLUSÃO

Após a realização de todas as análises de isolamento, caracterização e diferenciação celular, podemos concluir que estas células progenitoras de membrana amniótica de coelho podem ser classificadas como células tronco mesenquimais multipotentes, uma vez que estas apresentam capacidade de expressar marcadores de células tronco mesenquimais, de pluripotência e não expressaram marcadores de células hematopoiéticas, além de se diferenciaram em linhagens celulares mesenquimais distintas, como definido por Dominici et al. (2006). Todavia a análise do potencial tumorigênico foi o ponto chave deste trabalho, uma vez que estas células devidamente caracterizadas e diferenciadas não apresentaram potencial tumoral, sendo esta avaliação fundamental para terapias futuras.

Devido a todas as características mencionadas sobre a caracterização destas células, elas também possuem alta capacidade de expansão e proliferação *in vitro*, itens fundamentais para a criação de um banco de células. No entanto, a principal característica dessas células derivadas da membrana amniótica, é o fato desta membrana se encontrar na interface materno-fetal, possuindo assim uma baixa resposta imunológica, característica relacionada a expressão de MHC de classe I e estudos mais recentes demonstraram sua capacidade de imunomodulação (FERNANDES et al., 2012; PAROLINI et al., 2008). Com isso podemos sugerir que estas células apresentam características desejáveis que podem assim, garantir a sua utilização com sucesso na medicina regenerativa para reconstituição, tratamento ou reparo de órgãos ou tecidos lesados.

REFERENCIA

- ABUMAREE, M. H.; AL JUMAH, M. A.; KALIONIS, B.; JAWDAT, D.; AL KHALDI, A.; ALTALABANI, A. A.; KNAWY, B. A. Phenotypic and functional characterization of mesenchymal stem cells from chorionic villi of human term placenta. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, v. 9, n. 1, p. 16-31, Feb. 2013.
- AJAYI, F. O.; BALOGUN, O. O.; OVURU, S. S.; MGBERE, O. O. Reproductive performance of rabbits fed maize – milling waste based diets. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 4, n. 5, p. 439-443, 2005.
- AKLE, C. A.; ADINOLFI, M.; WELSH, K. I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. **Lancet**, London, v. 2, n. 8254, p. 1003–1005, Nov. 1981.
- ALVES, P. **Estudo da reprodução e do estado de condição física de duas populações portuguesas de Coelho-bravo**. 1994. Dissertação - Faculdade de Ciências Universidade do Porto, 1994.
- ALVES, P. M. M.; CARRONDO, M. J. T.; CRUZ, P. E. Introdução à tecnologia de cultivo de células animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais de biofármacos a terapia celular**. Roca: São Paulo, 2007. Cap.1, p. 2-14.
- ARORA, R.; PAPAIOANNOU, V. E. The murine allantois: a model system for the study of blood vessel formation. **Blood**, New York, v. 120, n. 13, p. 2562-2572, Sept. 2012.
- ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Endothelial progenitor cells for postnatal. Vasculogenesis. American journal of physiology. **Cell Physiology**, Bethesda, v. 287, n. 3, p. C572–C579, Sept. 2004
- BARON, M.H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 31, n. 12, p.1160-1169. Dec. 2003.
- BAILO, M.; SONCINI, M.; VERTUA, E.; SIGNORONI, P.B; SANZONE, S.; LOMBARDI, G.; ARIENTI, D.; CALAMANI, F.; ZATTI, D.; PAUL, P.; ALBERTINI, A.; ZORZI, F.; CAVAGNINI, A.; CANDOTTI, F.; WENGLER, G.S.; PAROLINI, O. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta. **Transplantation**, Baltimore, v. 78, n.10, p.439–448, Nov. 2004.
- BANAS, R. A.; TRUMPOWER, C.; BENTLEJEWSKI, C.; MARSHALL, V.; SING, G.; ZEEVI, A. Immunogenicity and immunomodulatory effects of amnion-derived multipotent progenitor cells. **Human Immunology**, New York, v.69, n. 6, p. 321-328, June. 2008.
- BELTRAMI, A. P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, H.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K; LERI, A.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P. Adult cardiac stem cells are

multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, Cambridge, v. 114, n. 6, p. 763-776, Sept. 2003.

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

BOLLEROT, K.; POUGET, C.; JAFFREDO, T. The embryonic origins of hematopoietic stem cells: a tale of hemangioblast and hemogenic endothelium. **APMIS : Acta Pthologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 113, n. 11-12, p. 790-803, Nov-Dec. 2005

BORGHESI, J. **Phenotype and multipotentiality of progenitor cells from the amniotic membrane Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)**. [Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho (*Oryctolagus cuniculus*)]. 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

BRIGHTON, C. T.; HOZACK, W. J.; BRAGER, M. D.; WINDSOR, R. E.; POLLACK, S. R.; VRESLOVIC, E. J.; KOTWICK, J. E. Fracture healing in the rabbit fíbula when subjected to various capacitively electrical fields. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 3, n. 3, p. 331-340, 1985.

CALVIN, S. E.; OYEN, M. L. Microstructure and mechanics of the chorioamnion membrane with an emphasis on fracture properties. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1101, p. 166-185, Apr. 2007.

CAPLAN, A. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 213, n. 2, p. 341-347, Nov. 2007.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. Functional expression cloning of Nanog; a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, Cambridge, v. 113, n. 4, p. 643-655, May. 2003.

CHANG, Y. J.; HWANG, S. M.; TSENG, C. P.; CHENG, F. C.; HUANG, S. H.; HSU, L. F.; HSU, L. W.; TSAI, M. S. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 192, n. 2, p. 93-105, Mar. 2010.

CIUCĂ, D. R.; SORIȚĂU, O.; ȘUȘMAN, S.; POP, V. I.; MIHU, C. M. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Bucuresti, v. 52, n. 3, p. 803-808, 2011.

COLI, A.; NOCCHI, F.; LAMANNA, R.; IORIO, M. C.; LAPI, S.; URCIUOLI, P.; SCATENA, F.; GIANNESI, E.; STORNELLI, M. R.; PASSERI, S. Isolation and characterization of equine amnion mesenchymal stem cells. **Cell Biology International Reports**, v. 18, n. 1, p. e00011, Sept. 2011.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical,

morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 128, n. 6, p. 507-520, Dec. 2007.

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

DIELBOLD, J. M.; MOLINA, T.; CAMILLERI-BROET, S.; LE TOURNEAU, U.; AUDOUIN, J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. **Histopathology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 199-211, Sept. 2000.

DÍAZ-PRADO, S.; MUIÑOS-LÓPEZ, E.; HERMIDA-GÓMEZ, T.; RENDAL-VÁZQUEZ, M.E.; FUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F. J.; BLANCO, F. J. Stem cells from human amniotic membrane. **Tissue Engineering: part C**, New York, v. 17, n. 1, p. 49-59, Jan. 2011.

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

FAVARON, P. O.; MESS, A.; WILL, S. E.; MAIORKA, P. C.; OLIVEIRA, M.F.; MIGLINO, M. A. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from new world Mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. **PLoS ONE**, San Francisco, v.9, n.6, p.e95575, June. 2014.

FERNANDES, R. A.; COSTOLA-SOUZA, C.; SARMENTO, C. A. P.; GONÇALVES, L.; FAVARON, P. O.; MIGLINO, M. A. Placental tissues as sources of stem cells—Review. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 2, n. 3, p.166-173, June. 2012.

FISCHER, B.; CHAVATTE-PALMER, P.; VIEBAHN, C.; SANTOS, A. N.; DURANTHON, V. Rabbit as a reproductive model for human health. **Reproduction**, Cambridge, v. 144, n. 1, p. 1–10, July. 2012.

FRANCIOLLI, A. L. R. **Medicina veterinária regenerativa**: multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelino no modelo equino (*Equus caballus*, Linnaeus 1758). 2012. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

HILTUNEN, A.; VUORIO, E.; ARO, H. T. A standardized experimental fracture in mouse tibia. **Journal of Orthopaedic Research**, New York, v. 11, n. 2, p. 305-312, Mar.1993.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUE, K.; OGURA, A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 41, p. 31362-31369, Oct. 2010.

HORI, J.; WANG, M.; KAMIYA, K.; TAKAHASHI, H.; SAKURAGAWA, N. Immunological characteristics of amniotic epithelium. **Cornea**, New York, v. 25, n. 10, p. S53-58, Dec. 2006.

HU, M. J.; RUAN, G.P.; YAO, X.; RUAN, G. H.; WANG, J. X.; PANG, R. Q.; CAI, X. M.; ZHU, X. Q.; HE, J.; PAN, X. H. Induced autologous stem cell transplantation for treatment of rabbit type 1 diabetes. **Cell Biology International**, London, v. 37, n. 6, p. 624–632, June. 2013.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E. M.; PERA, M.; MANUELPIILLAI, U. Stem cells derived from human fetal membranes display multi-lineage differentiation potential. **Biology of Reproduction**, New York, v. 77, n. 3, p. 577-588, Sept. 2007.

INSAUSTI, C. L.; ALCARAZ, A.; GARCIA-VIZCAINO, E. M.; MROWIEC, A.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C.; BLANQUER, M.; PIÑERO, A.; MAJADO, M. J.; MORALEDA, J. M.; CASTELLANOS, G.; NICOLÁS, F. J. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. **Wound Repair and Regeneration**, St.Louis, v. 18, n. 4, p. 368–377, July-Aug. 2010.

IN 'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E.; KANHAI, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, Dayton, v.22, n.7, p.1338–1345, Dec. 2004.

ISMAIL, A.; RAMSIS, R.; SHERIF, A.; THABET, A.; EL-GHOR, H.; SELIM, A. Use of human amniotic stem cells for common bile duct reconstruction: Vascularized support of a free amnion graft. **Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, Warsaw, v. 15, n. 9, p. BR243-247, Sept. 2009.

KAKISHITA, K.; NAKAO, N.; SAKURAGAWA, N.; ITAKURA, T. Implantation of human amniotic epithelial cells prevents the degeneration of nigral dopamine neurons in rats with 6-hydroxydopamine lesions. **Brain Research**, Amsterdam, v. 980, n. 1, p. 48-56, Aug. 2003.

KANYSHKOVA, T. G.; BUNEVA, V. N.; NEVINSKY, G. A. Lactoferrin and its biological functions. **Biochemistry**, New York, v. 66, n. 1, p. 1-7, Jan. 2001.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research Therapy**, v. 9, p. 204, 2007.

KONG, X .Y.; CAI, Z.; PAN, L.; ZHANG, L.; SHU, J.; DONG, Y. L.; YANG, N.; LI, Q.; HUANG, X. J.; ZUO, P. P. Transplantation of human amniotic cells exerts neuroprotection in MPTP-induced Parkinson disease mice. **Brain Research**, Amsterdam, v. 1205, p. 108-115, Apr. 2008.

KUBO, M.; SONODA, Y.; MURAMATSU, R.; USUI, M. Immunogenicity of human amniotic membrane in experimental xenotransplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 42, n. 7, p. 1539-1546, June. 2001.

LANGE-CONSIGLIO, A.; CORRADETTI, B.; BIZZARO, D.; MAGATTI, M.; RESSEL, L.; TASSAN, S.; PAROLINI, O.; CREMONESI, F. "Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane," **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, v. 6, n. 8, p. 622–635, Aug. 2012.

LI, H.; NIEDERKORN, J. Y.; NEELAM, S.; MAYHEW, E.; WORD, R. A.; MCCULLEY, J. P.; ALIZADEH, H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, St. Louis, v. 46, n. 3, p. 900-907, Mar. 2005

LI, W.; HE, H.; KAWAKITA, T.; ESPANA, E. M.; TSENG, S.C. Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages *in vitro*. **Experimental Eye Research**, London, v. 82, n. 2, p. 282-292, Feb. 2006.

LIU, H. G.; LING-LING, E.; WANG, D. S.; WU, F. S. X.; SHI, Z. P.; YAN, L.V.; WANG, J. Z. Reconstruction of Alveolar Bone Defects Using Bone Morphogenetic Protein 2 Mediated Rabbit Dental Pulp Stem Cells Seeded on Nano-Hydroxyapatite/Collagen/Poly(L-lactide). **Tissue Engineering: Part A**, New Rochelle, v. 17, n. 19-20, p. 2417-2433, Oct. 2011.

MAGATTI, M.; DE MUNARI, S.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, n. 1, p. 182–92, Jan. 2008.

MARCUS, A. J.; COYNE, T. M.; RAUCH, J.; WOODBURY, D.; BLACK, I. B. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, London, v.76, n.2, p.130–144, July. 2008.

MARCUS, A. J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 12, n. 3, p. 730-742, June. 2008.

MARDONES, R.; MARTÍNEZ, R.; PAREDES, M. J.; ZALAQUETT, E. Chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. First successful Latin-American report. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 3, p. 749-754, Sept. 2010.

MATTIOLI, M.; GLORIA, A.; TURRIANI, M.; MAURO, A.; CURINI, V.; RUSSO, V.; TETÈ, S.; MARCHISIO, M.; PIERDOMENICO, L.; BERARDINELLI, P.; COLOSIMO, A.; MUTTINI, A.; VALBONETTI, L.; BARBONI, B. Stemness characteristics and osteogenic potential of sheep amniotic epithelial cells. **Cell Biology International**, London, v. 36, n. 1, p. 7-19, Jan. 2012.

MAURO, A.; TURRIANI, M.; IOANNONI, A.; RUSSO, V.; MARTELLI, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINOCCHI, D.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. S25–S28, June. 2010.

MIHU, C. M.; CIUCA, D. R.; SORITAU, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Bucuresti, v. 50, n. 1, p. 73–77, 2009.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, Dayton, v.23, n.10, p.1549–1559, Nov-Dec. 2005.

MIKI, T.; MITAMURA, K.; ROSS, M.A.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. **Journal of Reproductive Immunology**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 91-96, Oct. 2007.

MIKI, T.; STROM, S. C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, v. 2, n. 2, p. 133–142, 2006.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Concise review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells**, Dayton, v. 24, n. 11, p. 2319–2345, Nov. 2006.

MINGUELL, J. J.; PEREIRA, A.; BARTHOLOMEW, P.; LASALA, G. P. The intrathecal Infusion of mesenchymal stem cells into healthy rabbits is safe and devoid of neurological or clinical complications. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n. 1, p. 2-11, July. 2011.

MITHOEFER, K.; WILLIAMS, R. J.; WARREN, R. F.; POTTER, H. G.; SPOCK, C. R.; JONES, E. C.; WICKIEWICZ, T. L.; MARX, R. G. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, Boston, v. 87, n. 9, p. 1911-1920, Sept. 2005.

MOORE, K. L.; PERSUAD, T. V. N. **Embriologia clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 609 p.

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

MRUGALA, D.; DOSSAT, N.; RINGE, J.; DELORME, B.; COFFY, A.; BONY, C.; CHARBORD, P.; HA" UPL, T.; DAURES, J. P.; NOE" L, D.; JORGENSEN, C. Gene expression profile of multipotente mesenchymal stromal cells: identification of pathways common to TGFb3/BMP2-induced chondrogenesis. **Cloning Stem Cells**, Larchmont, v. 11, n. 1, p. 61-76, Mar. 2009.

MUKAIDA, T.; YOSHIDA, K.; KIKYOKAWA, T.; SOMA, H. Surface structure of the placental membranes. **Journal Clinical Electron Microscopy**, v. 10, p. 447–448, 1977.

NEUPANE, M.; CHANG, C. C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal Stem Cells. **Tissue Engineering Part A**, New York, v. 14, n. 6, p. 1007-1015, June. 2008.

NUNAMAKER, V. M. D. Experimental model of fracture repair. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, v. 355S, p. 57- 65, Oct. 1998.

OKAZAKI, T.; CASEY, M. L.; OKITA, J. R.; MACDONALD, P. C.; JOHNSTON, J. M. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 139, n. 4, p. 373-381, Feb. 1981.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 9, p. e44693, Sept. 2012.

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P.; BILIC, G.; BÜHRING, H.J.; EVANGELISTA, M.; HENNERBICHLER, S.; LIU, B.; MAGATTI, M.; MAO, N.; MIKI, T.; MARONGIU, F.; NAKAJIMA, H.; NIKAIIDO, T.; PORTMANN-LANZ, C.B.; SANKAR, V.; SONCINI, M.; STADLER, G.; SURBEK, D.; TAKAHASHI, T.A.; REDL, H.; SAKURAGAWA, N.; WOLBANK, S.; ZEISBERGER, S.; ZISCH, A.; STROM, S.C. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, n. 2, p. 300-311, Feb. 2008.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. **Placenta**, London, v. 32, n. 2, p. S186–95, Mar. 2011.

PAROLINI, O.; SONCINI, M. Human placenta: a source of progenitor/stem cells? **Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology**, v. 3, n. 3, p. 117–126, Nov. 2006.

PAROLINI, O.; SONCINI, M.; EVANGELISTA, M.; SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? **Regenerative Medicine**, London, v. 4, n. 2, p. 275–291, Mar. 2009.

PAROLINI, O.; SOUZA-MOREIRA, L.; O'VALLE, F.; MAGATTI, M.; HERNANDEZ-CORTES, P.; GONZALEZ-REY, E.; DELGADO, M. Therapeutic effect of human amniotic membrane-derived cells on experimental arthritis and other inflammatory disorders. **Arthritis Rheumatol**, Malden, v. 66, n.2, p. 327-339, Feb. 2014.

PERA, M.F.; REUBINOFF B, TROUNSON A. Human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**. London, v.13, p.5-10, Jan. 2000.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 194, n. 3, p. 664–673, Mar. 2006.

ROSSI, D.; PIANTA, S.; MAGATTI, M.; SEDLMAYR, P.; PAROLINI, O. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: Prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. e46956, Oct. 2012.

RUTIGLIANO, L.; CORRADETTI, B.; VALENTINI, L.; BIZARRO, D.; MEUCCI, A.; CREMPNESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. **Stem Cell Research and Therapy**, London, v. 4, n. 5, p. 133, Oct. 2013.

SAKURAGAWA, N.; ELWAN, M. A.; UCHIDA, S.; FUJII, T.; KAWASHIMA, K. Non-neuronal neurotransmitters and neurotrophic factors in amniotic epithelial cells: expression and function in humans and monkey. **Japanese Journal of Pharmacology**, Kyoto, v. 85, n. 1, p. 20–23, Jan. 2001.

SAKURAGAWA, N.; ENOSAWA, S.; ISHII, T.; THANGAVEL, R.; TASHIRO, T.; OKUYAMA, T.; SUZUKI, S. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. **Journal of Human Genetics**, Tokyo, v. 45, n. 3, p. 171–176, Jan. 2000.

SANKAR, V.; MUTHUSAMY, R. “Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research”. **Neuroscience**, Oxford, v. 118, n. 1, p. 11–17, Apr. 2003.

SEJPAL, K.; BAKHTIARI, P.; DENG, S. X. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. **Middle East African Journal of Ophthalmology**, Mumbai, v. 20, n. 1, p. 5–10, Jan-Mar. 2013.

SEO, M. S.; PARK, S. B.; KIM, H. S.; KANG, J. G.; CHAE, J. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, Suwon, v. 14, n. 2, p. 151–159, Feb. 2013.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; ZORZI, F.; DENEGRİ, M.; ALBERTINI, A.; WENGLER, G. S.; PAROLINI, O. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human foetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, v. 1, n. 4, p. 296–305, July-Aug. 2007.

SOUTHERN, H. N. The ecology and population dynamic of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Annals of Applied Biology**, v. 27, n. 4, p. 509–526, Nov. 1940.

TABATABAEI, M.; MOSAFFA, N.; NIKOO, S.; BOZORGMEHR, M.; GHODS, R.; KAZEMNEJAD, S.; REZANIA, S.; KESHAVARZI, B.; AREFI, S.; RAMEZANI-TEHRANI, F.; MIRZADEGAN, E.; ZARNANI, A. H. Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, Tehran, v. 6, n. 1, p. 10–20, Jan. 2014.

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**, Kyoto, v. 105, n. 3, p. 215-228, Nov. 2007.

TIEDEMANN, K. The Amniotic, Allantoic and Yolk Sac Epithelia of the Cat: SEM and TEM Studies. **Anatomy and Embryology**, v. 158, p. 75-94, 1979.

TROUNSON, A. The production and directed differentiation of human Embryonic stem cells. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 27, n. 2, p. 208–219, Jan. 2006.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 9, p. 726–736, Sept. 2008.

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

VIDANE, A. S.; SOUZA, A. F.; SAMPAIO, R. V.; BRESSAN, F. F.; PIERI, N. C.; MARTINS, D. S.; MEIRELLES, F.V.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem Cells and Cloning: advances and applications**, Auckland, v. 27, n. 7, p. 71-78, Aug. 2014.

VILLAFUERTE, R. *Oryctolagus cuniculus*. In: PALOMO, L.J.; GISBERT, J. (Ed). **Atlas de los mamíferos terrestres de España. dirección general de conservación de la naturaleza**. Madrid: Secem-Secemv, 2002.

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**, New York, v. 111, n. 4, p. 2436-2443, Feb. 2008.

WANG, Z. J.; AN, R. Z.; ZHAO, J. Z.; ZHANG, Q.; YANG, J.; WANG, J. B.; WEN, G. Y.; YUAN, X. H.; QI, X. W.; LI, S.J.; YE, X. Z. Repair of articular cartilage defects by tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 2, p.4599-4606, June. 2014.

WEISSBERG, P. L.; QASIM, A. Stem cell therapy for myocardial repair, **Heart**, v. 91, n. 5, p. 696-702, June. 2005.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; AMBROSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal

tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering: Part A**, New York, v. 17, n. 18, p. 2164-2176, Sept. 2011.

WINCK, C. P. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

WOLBANK, S.; PETERBAUER, A.; FAHRNER, S.; VAN GRIENSUEN, M.; STADLER, G.; REDL, H.; GABRIEL, C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Tissue Engineering**, New York, v. 13, n. 6, p. 1173–1183, June. 2007.

YOUNG, H.E. Existence of reserve quiescent stem cells in adults, From amphibians to humans. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 280, p. 71-109, 2004

ZHANG, W.; ZHANG, F.; SHI, H.; TAN, H.; HAN, S.; YE, G.; PAN, S.; SUN, F.; LIU, X. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. e88794, Feb. 2014.

ZHANG, H.; IWAMA, M.; AKAIKE, T.; URRY, D. W.; PATTANAIK, A.; PARKER, T. M.; KONISHI, I.; NIKAIDO, T. Human amniotic cell sheet harvest using a novel temperature-responsive culture surface coated with protein-based polymer. **Tissue Engineering**, New York, v. 12, n. 2, p. 391-401, Feb. 2006.

ZHOU, S.; CHEN, J.; FENG, J. The effects of amniotic membrane on polymorphonuclear cells. **Chinese Medical Journal**, Pekinj, v. 116, n. 5, p. 788-790, May. 2003.

ZHU, X.; WANG, X.; CAO, G.; LIU, F.; YANG, Y.; LI, X.; ZHANG, Y.; MI, Y.; LIU, Y.; ZHANG, L. Stem cell properties and neural differentiation of sheep amniotic epithelial cells. **Neural Regeneration Research**, Shenyang, v. 8, n. 13, p. 1210-1219, May. 2013.