ATANÁSIO SERAFIM VIDANE

Isolamento e Caracterização das Células Mesenquimais Derivadas da Membrana Amniótica dos Gatos Domésticos

SÃO PAULO
2012

ATANÁSIO SERAFIM VIDANE

Isolamento e Caracterização das Células Mesenquimais Derivadas da Membrana Amniótica dos Gatos Domésticos

SÃO PAULO

2012

ATANÁSIO SERAFIM VIDANE

Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

SÃO PAULO

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
16/7/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2622
FMVZ

Vidane, Atanásio Serafim
Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos / Atanásio Serafim Vidane. -- 2012.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Âmnio. 2. Gatos. 3. Células mesenquimais. 4. Tecidos fetais. 5. Diferenciação. 6. Célula tronco. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – Área: Animal

Processo USP nº: 2011.1.1658.74.6

Data de entrada: 10/11/2011

Pesquisadores: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Currículo(s) do(s) pesquisador(es): O orientador possui currículo Lattes. O currículo do aluno consta como Atanasio Vidane.

Parecer

Título do Projeto: Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos.

Apreciação Geral:
A proposta é pertinente por se tratar, segundo os autores, de produção de linhagem de célula tronco de gatos no Brasil.

Introdução:
As referências são atuais.

Metodologia:
1) A metodologia está adequada à execução do projeto.

Aspectos Éticos:
O material biológico será coletado em campanhas de castração de animais domésticos.

Outros Comentários:
1) O cronograma de atividades está adequado a execução do projeto.

Esclarecimentos Necessários:
A proposta foi corrigida e as modificações realizadas pelos autores foram satisfatórias.

Pelo Comitê de Ética:

☒ **Referendado.**

☐ **Não referendado.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 9 de abril de 2012.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Presidente em Exercício do CEP/FZEA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VIDANE, Atanásio Serafim

Título: Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos.

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/2012

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

*À memória do meu pai **Serafim Vidane**, que não pôde presenciar essa etapa tão importante da minha vida! Sempre fez de tudo para que eu conseguisse tudo o que sou hoje.*

*Ao meu filho **Wamy**, e à minha esposa **Dércia** que mesmo sofrendo com a distância me apoiaram a cada momento. Foram a minha maior motivação.*

A vocês todos o meu amor e eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos, pela força e saúde ao longo de toda minha carreira estudantil.

Ao CNPq-Brasil e MCT- Moçambique, pelo apoio financeiro concedido durante toda a minha formação.

Ao Prof. Carlos Eduardo Ambrósio e Prof[a]. Maria Angélica Miglino, por terem me concedido esta oportunidade de frequentar o Mestrado no programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres – FMVZ-USP.

Ao Prof. Carlos Eduardo Ambrósio, pela orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pela oportunidade de tê-lo como grande mestre em ensino de Anatomia e como grande amigo. Agradeço também pelo grande apoio nos momentos mais difíceis da minha vida que por destino coincidiram ao seu lado.

À Juliana Casals pelo fornecimento incondicional do material para investigação e por ter permitido a coleta em suas dependências.

A todos os professores e funcionários da FMVZ e FZEA-USP em especial ao Prof. Dr. Flávio Meirelles, Prof[a]. Dr[a]. Daniele Martins e Prof. Felipe Perecin, pelo conhecimento transmitido e pela confiança que sempre depositaram em mim.

À Dra. Rose pela ajuda na análise em microscopia de varredura e ao Dr. Marcos pela ajuda na editoração das imagens.

Aos funcionários do CEPTOX-FMVZ, Adilson Baladore e Elaine Martinelli, pelo todo apoio durante a realização dos experimentos.

Ao Nilton dos Santos pelo todo apoio e ajuda no processamento histológico.

A todos meus colegas de pós-graduação do LMMD-FZEA em atenção especial a Aline, Dra. Celina, Juliano, Rafael, Cury, Lindsay, Helena, Fabiana, Naira, Natália, Paulinho, Laís, pela amizade, carinho e acima de tudo companheirismo durante a realização de todas as atividades durante o curso. Agradeço também pelo apoio moral que sempre me concederam.

Ao pessoal da secretaria de pós-graduação da FMVZ e do programa de anatomia dos animais domésticos e silvestres em nome de Maicon Silva e Jaqueline, pela paciência e toda orientação.

Aos docentes Mohamed Harun, Mário Elias, Custódio Bila, Bentecourt Capece, Catarina Tivane, Carmen Garrine, Laurinda Augusto, Alberto Pondja, Julio Come pela orientação e ajuda para a realização deste mestrado.

Aos demais colegas e amigos da FZEA-USP em especial ao Rogério Augusto, Uanderson Pateis, Dr. Max Vicente, Gonçalo Junior, Bárbara Ramos, Adélia Motta, Paloma Yuri, Mariana Zanata, Saritcha e Camila, pela amizade, carinho e companheirismo ao longo de todo o curso.

Ao pessoal da Coordenadoria da Cooperação internacional em nome da Clélia Godoy, pelo todo apoio e orientação para minha integração.

À Tânia, assistente social da moradia estudantil do Campus FZEA-USP, pela orientação e todo apoio concedido.

Ao meu filho Wamy, minha esposa Dércia, meus pais Serafim e Joana, a minha avó Alice, tia Arlete, meus irmãos Dércia, Fino, Stélia, Anatólia, Paulo e Dinha e demais familiares, que sem seus incentivos, ajuda, amor e carinho tenho certeza que jamais conseguiria cumprir esta etapa da minha vida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e, em especial para a elaboração deste trabalho, o meu muito obrigado.

«Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu»

Eclesiastes 3:1

RESUMO

VIDANE, A.S. Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos. [Isolation and characterization of Mesenchymal cells from cat amniotic membrane]. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As células tronco mesenquimais derivadas do âmnio (AMSCs) são células multipotentes com alto potencial para se diferenciar em múltiplas linhagens. Podem ser isoladas sem recurso a procedimentos invasivos e usadas sem levantar quaisquer implicações éticas. O presente estudo visa isolar e caracterizar as células mesenquimais progenitoras da membrana amniótica de gatos domésticos para futura aplicação em terapia celular. As células foram isoladas de quatro membranas fetais, coletadas durante as campanhas rotineiras de castração em gatas no último terço de gestação, após anestesia geral. A porção dorsal do âmnio foi separada mecanicamente, lavada com PBS e submetida à digestão com colagenase. As células coletadas foram propagadas em cultivo (DMEN-F12/α-MEM) e criopreservadas em várias passagens enquanto se efetuava a avaliação da cinética de crescimento e das características morfológicas. Em cultivo, as AMSCs demonstraram aderência à placa e uma morfologia similar a dos fibroblastos. A análise imunofenotípica revelou presença de marcadores específicos de MSCs CD73 e CD90 e ausência de marcadores hematopoiéticos CD34, CD45 e CD79 sugerindo a presença de células mesenquimais multipotentes na membrana amniótica de gatos domésticos. Em condições apropriadas, estas células diferenciaram-se em linhagens específicas osteogênica e adipogênica. Entretanto, após inoculação em camundongos imunodeficientes não foi registrado formação de teratomas. Estes achados sugerem que o âmnio de gatos domésticos pode ser considerado uma importante fonte de MSCs com maior atração para medicina regenerativa.

Palavras-chave: Âmnio. Gatos. Células mesenquimais. Tecidos fetais. Diferenciação. Célula tronco.

ABSTRACT

VIDANE, A.S. Isolation and characterization of Mesenchymal cells from cat amniotic membrane [Isolamento e caracterização das células mesenquimais derivadas da membrana amniótica dos gatos domésticos]. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The amnion derived mesenchymal stem cells (AMSCs) are multipotent cells with a high ability to differentiate into multiple lineages. They can be obtained by non-invasive methods and therefore are exempt from the normal ethical problems involving stem cell use. The aim of this study was to isolate and characterize the progenitor mesenchymal cells from the cat amniotic membrane for future application in cell therapy. The cells were isolated from four fetal membranes collected after a routine ovarian hysterectomy process from cats in their third gestational trimester, under general anesthesia. The dorsal portion of amnion was mechanically separated, washed with PBS and subjected to collagenase digestion. The isolated cells were propagated in culture media (DMEMF12 or α-MEM) and frozen in various passages while the growing kinetics and cell morphology were analyzed. In culture medium, AMSCs were adherent to the plastic culture dish and had a morphology similar to fibroblasts. Immunophenotyping assays showed the presence of MSCs specific markers CD73 and CD90 and absence of hematopoietic markers CD34, CD45 and CD79 suggesting the presence of multipotent mesenchymal cells in the cat amniotic membrane. Under appropriate conditions, these cells differentiated into osteogenic and adipogenic cell lineages. Moreover, after injection into immunodeficient mice, no tumors were generated. These findings suggest that the cat amniotic membrane can be considered an important and useful source of MSCs for regenerative medicine.

Keywords: Amnion. Cats. Mesenchymal cells. Fetal tissues. Differentiation. Stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Separação da membrana amniótica de gatos domésticos. A: Feto coberto pelo âmnio contendo líquido transparente (*) após a completa remoção das restantes membranas e da placenta zonaria (>). B: Dissecação cautelosa do âmnio de cobertura dorso lateral (*) evitando-se a região em torno do cordão umbilical altamente vascularizado (>). C: Membrana amniótica completamente dissecada, transparente e avascularizada (*). D: Filtros de malha estéreis 40µm (cat. # 352340). Todo conteúdo digerido foi filtrado (*) para uma placa de petri estéril (>) com o intuito de separar as AMCs e descarte dos *debris*, muco e fragmentos epiteliais não digeridos.....39

Figura 2 - Fotomicrografia da morfologia das células mesenquimais indiferenciadas derivadas do âmnio. Após 24horas de cultivo inicial (A), as células apresentavam-se aderentes a placa de cultivo com uma morfologia similar a fibroblastos. Esse fenótipo foi mantido nas passagens subsequentes P1 em baixa densidade (B) e mesmo a quase 100% de confluência (C). Em D, esta ilustrada em baixa resolução células em P3, com mesmas características, na sua maioria pareadas como indicativo de intensa proliferação (>). A, B e C: 20x (Barra: 20µm); D: 5x (Barra: 100µm).....40

Figura 3 - A: Fotomicrografia demonstrando a percentagem de células viáveis após o congelamento na P2 - coloração com *Trypan Blue*. As células não viáveis encontram-se escassamente distribuídas e apresentam-se numa coloração azulada (>). Fotomicrografias de unidades formadoras de colônias obtidas após plaqueamento das células mesenquimais do âmnio de gatos domésticos e coloração com Giemsa. A, C, D: 10x (Barra: 50µm); B: 5x (Barra: 100µm).....42

Figura 4 - Fotomicrografias de análise imunocitoquímica das células mesenquimais derivadas do âmnio. As células indiferenciadas expressaram em seu todo marcadores específicos de células tronco mesenquimais CD90 e CD73. 20x (Barra: 50µm).....44

Figura 5 - Fotomicrografias de análise imunocitoquímica das células mesenquimais derivadas do âmnio. Os marcadores de células hematopoiéticas CD34, CD45 e CD79 não foram detectados nesta linhagem celular. 20x (Barra: 50µm).....45

Figura 6 - Histogramas da análise em citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície. Esta linhagem respondeu positivamente aos marcadores específicos das MSCs (CD90 e CD73). Em contra partida, revelaram baixa reatividade para marcadores hematopoiéticos (CD34, CD45, CD79). Os histogramas representam o número relativo de células em relação à intensidade de fluorescência.....47

Figura 7 - Diferenciação osteogênica. A: Aparecimento de inúmeros focos de ossificação caracterizados pela deposição da matriz óssea (14 dias de cultivo). B e C: Coloração com *alizarin red* (21 dias de cultivo), presença da matriz mineralizada em tom avermelhado. D: Células em meio de crescimento, mantendo a morfologia fibroblastóide. C e F: Células do grupo em meio de crescimento coradas com *alizarin red*, sem evidencia da deposição da matriz óssea. A, D, e E: 20x (Barra: 50µm); B: 10x (Barra: 100µm); C e F: 40x (Barra: 20µm).....48

Figura 8 - Diferenciação adipogênica. A: Após adição do suplemento de diferenciação adipogênica, registrou uma marcada deposição de inúmeras gotículas lipídicas. B e C: Coloração com *oil red*, as gotículas lipídicas apresentaram uma coloração avermelhada. E: Quando coradas com *sudan black*, os vacúolos lipídicos se destacaram com uma coloração preta. F: Células em meio de crescimento coradas com *olil red*, não apresentam nenhuma marcação para vacúolos lipídicos. A, B, D: 20x (Barra: 50µm); C e E: 40x (Barra: 20µm).....49

Figura 9 - Análise do potencial carcinogênico. A: Injeção intraperitoneal das MSCs. B: Quatro semanas após inoculação, não houve formação de carcinomas nos 3 camundongos tratados. C, D e E: Exposição dos pontos de inoculação (>), SC-subcutâneo (dorso), IM-intramuscular (musculatura da coxa) e IP-intaperitoneal, respectivamente. F: Análise macroscópica dos órgãos do animal tratado via intraperitoneal, sem alterações morfológicas.....50

Figura 10 - Fotomicrografias de diferentes órgãos (IP: tratado via intraperitoneal, IM: tratado via intramuscular, Crt: não tratado). A: Corte longitudinal da musculatura do coração revelando uma disposição normal fibras musculares com núcleos centralizados. B: Fotomicrografia do fígado, veias centrais (vc) com números cordões hepáticos (cd) limitando os capilares sinusóides (>). C: Fotomicrografia do pulmão, alvéolos pulmonares (av) em continuidade com os ductos alveolares (dv). D: Corte transversal do córtex renal, visão geral dos glomérulos (gl) e túbulos renais. E: Corte do baço, trabéculas (tb) invadindo o parênquima. Nódulos (nd) disseminados no estroma tecidual. F: Fotomicrografia mostrando diferentes camadas do córtex cerebral. G: Corte longitudinal da musculatura esquelética da coxa, núcleos localizados na periferia das fibras musculares com numerosas estrias transversais. H: Corte do intestino mostrando numerosas glândulas imersas na submucosa tecidual. I: Fotomicrografia de um linfonodo mostrando números cordões medulares de células imunológicas (cd) que separam os seios medulares (>), ad: adipócitos na periferia. A, B, C, E e G: 40x (Barra: 20µm); D, F e H: 20x (Barra: 20µm); I: 20x (Barra: 50µm).....51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição da natureza e procedência dos anticorpos primários e secundários utilizados nas provas moleculares de imunocitoquímica e citometria de fluxo.....34

Quadro 2 - Análise FACS da expressão dos marcadores específicos das células tronco mesenquimais e células hematopoiéticas em células mesenquimais derivadas dos gatos domésticos em comparação com as células homólogas derivadas do tecido adiposo humano.....46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica do perfil de crescimento das células mesenquimais derivadas do âmnio de gato. A: As células demonstraram um crescimento bastante acelerado durante as primeiras duas passagens e uma queda logo em seguida com uma tendência estacionária. B: Doubling time expresso em números de dias necessários para que as células se dupliquem. O DT tende a aumentar à medida que o número de passagens também aumenta, alcançando o seu pico por volta da oitava passagem.....41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....21
2.1 CÉLULA TRONCO: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO.....21
2.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....21
2.3 O ÂMNIO: CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS E APLICAÇÃO EM MEDICINA.....23
2.4 CÉLULAS PROGENITORAS DERIVADAS DO ÂMNIO E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA.....24
3 OBJECTIVOS.....28
3.1 OBJETIVO GERAL.....28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....30
4.1 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR.....30
4.1.1 **Coleta e transporte das amostras**.....30
4.1.2 **Isolamento e cultivo das células mesênquimais do âmnio**.....31
4.1.3 **Propagação em cultura: Repique celular**.....31
4.1.4 **Avaliação da cinética de crescimento celular**.....32
4.1.5 **Avaliação da capacidade de formação de colônias**.....32
4.1.6 **Criopreservação**.....33
4.2 MÉTODOS MOLECULARES.....33
4.2.1 **Citometria de fluxo**.....33
4.2.2 **Imunocitoquímica**.....35
4.3 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*.....35
4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO.....36
5 RESULTADOS.....38
5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESÊNQUIMAIS DO ÂMNIO.....38
5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR.....40
5.3 CRIOPRESERVAÇÃO.....41
5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS.....43
5.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS AMCS.....43
5.6 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*.....47
5.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO.....49
6 DISCUSSÃO.....53
7 CONCLUSÕES......58
REFERÊNCIAS.....60

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças crônico-degenerativas de declaração não obrigatória, como as doenças cardiovasculares, a diabetes, a obesidade, o cancro e as doenças respiratórias, representam cerca de 60% do total de 57 milhões de mortes por ano, ultrapassando em mortalidade as doenças infecciosas. Diversos trabalhos com intuito de descobrir futuras terapias destinadas a salvar vidas vem sendo desenvolvidos em diversos laboratórios de pesquisas biomédicas do mundo. A descoberta do potencial de célula tronco na regeneração dos tecidos ou órgãos irremediavelmente lesados virou o centro de atenções nos dias atuais na expectativa de contornar os problemas mais intrincados da medicina, tornando-se um dos temas mais abordados da atualidade (SILVA, 2001; SOUZA; ELIAS, 2005; LUNA, 2007).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos por vários investigadores no sentido de esclarecer e tornar realidade a aplicação de células tronco na terapia celular. Apesar da sua totipotência, a destruição do blastocisto para a derivação ou isolamento das células tronco embrionárias (ESCs) acarreta inúmeras implicações de ordem ética, moral e religiosa, tornando impraticável e polêmica o uso desta linhagem celular. Além disso, estudos recentes demonstraram que as ESCs requerem células de sustentação e diversas citocinas para o seu crescimento, durante a qual alterações genômicas e/ou aberrações cromossômicas podem ser registradas com frequência (FAUZA, 2004; HANSON; CAISANDER 2005; MAITRA et al., 2005).

Das células tronco derivadas de vários tecidos fetais ou adultos, as mesenquimais (MSC) isoladas da medula óssea representam as células mais amplamente estudadas para aplicação em medicina veterinária regenerativa. Contudo, os procedimentos invasivos majoritariamente necessários para o seu isolamento estão associados a altas taxas de morbidade, sendo que a quantidade e as características das células obtidas variam consideravelmente com a idade do doador (SONCINI et al., 2007; COLLEONI et al., 2009). Em análise dos aspirados da medula óssea, foi registrado uma baixa frequência destas células em relação ao total das células que constituem o estroma da medula óssea. Estudos também apontam uma depreciação da funcionalidade destas células a longo prazo, associado a considerável diminuição do potencial proliferativo e de diferenciação em múltiplas linhagens (BYDLOWSKI et al., 2009; CONSIGLIO et al., 2011). Devido a sua alta heterogeneidade, as suas propriedades imunogênicas podem ser altamente influenciadas por

vários fatores como os métodos de isolamento, superfície e meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com produtos químicos, entre outros (BYDLOWSKI et al., 2009). Portanto, a identificação de novas fontes de células progenitoras como as membranas fetais representa uma alternativa bastante promissora com potencial para contornar muitas dessas limitações, abrindo novas perspectivas para a medicina regenerativa.

Neste contexto, com a evidência da sua diversidade celular e de distintas características biológicas das células que apresenta, o âmnio é consagrado como uma importante fonte de células tronco com maior atração para a terapia celular e engenharia de tecidos. As células mesenquimais da membrana amniótica são conhecidas por possuir propriedades imunomoduladoras o que as torna mais acessíveis para transplantes alogênicos (MIHU et al., 2009; HUO; SHI; PANG, 2010). Entretanto, o âmnio é comumente descartado após o nascimento, podendo ser usado sem levantar quaisquer conflitos éticos ou morais, além de que permite o isolamento das MSCs com alta eficiência sem recurso a procedimentos invasivos (HUO; SHI; PANG, 2010; CONSIGLIO et al., 2011; DIAZ-PRADO et al., 2011, FERNANDES et al., 2012). Além dessas diferenças, estas células possuem propriedades primitivas, baixa tumorigenicidade e maior multipotencialidade que as restantes células homólogas (ABDULRAZZAK et al., 2010).

Até a atualidade, existem escassos relatos de caracterização destas células em animais domésticos. Alguns trabalhos relatam com sucesso o isolamento de MSCs derivados do âmnio, na sua maioria em humanos (ILANCHERAN et al., 2007; SONCINI et al., 2007; DIAZ-PRADO et al., 2010; DIAZ-PRADO et al., 2011), ratos (MARCUS et al., 2008), equídeos (CONSIGLIO et al., 2011), suínos (CHEN J et al., 2011) e ovinos (MAURO et al., 2010). Porém, escassos trabalhos referentes a carnívoros são relatados, alegando-se dificuldades de isolamento nestes animais. O presente estudo tem como objetivo fundamental isolar e caracterizar as células tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica de gatos domésticos com vista estabelecimento desta linhagem celular no Brasil para futuras pesquisas da sua viabilidade terapêutica. Os carnívoros são considerados como modelo animal ideal para estudo de disfunções ou doenças que acometem os seres humanos (SEO et al., 2009; URANIO et al., 2011; VALENTINI et al., 2011). Para além da similaridade de inúmeras desordens de ordem genética ou doenças crônicas e degenerativas com os humanos, os carnívoros podem ser facilmente manipulados abrindo possibilidades de condução dos experimentos com maior número de animais garantindo maior segurança nos resultados.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULA TRONCO: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

As células-tronco são vagamente conhecidas como células com capacidade de gerar diferentes tipos celulares e reconstituir diversos tecidos. Possuem propriedades específicas o que as tornam muito interessantes para a medicina regenerativa: a capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se propagar mantendo o seu fenótipo indiferenciado proporcionando a reposição da sua população por longos períodos; e a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens celulares (HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; KUIJK et al., 2011; GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). Acredita-se, no entanto que a utilização de células indiferenciadas injetadas na circulação ou no local da lesão possam se diferenciar em células especializadas daquele tecido ou órgão, substituindo as células defeituosas ou destruídas.

De acordo com o tecido de origem e a sua capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens, distinguem-se dois tipos de células tronco. As células tronco embrionárias (ESCs) derivadas da massa celular interna do blastocisto pré-implantado e as células tronco adultas (ASCs) derivadas de diferentes órgãos de tecidos fetais ou adultos (SEMB, 2005; GATTEGNO-HO; ARGYLE; ARGYLE, 2012). Devido a inúmeras controvérsias de ordem ética, política e religiosa do uso das células tronco embrionárias, as células tronco adultas em especial as células tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea tornam-se as mais privilegiadas para aplicação em terapia celular, sendo as mais amplamente estudadas nos últimos dias.

2.2 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco mesenquimais (MSCs) são células somáticas adultas derivadas de vários tecidos adultos (medula óssea, cérebro, polpa dental, músculo, pele, etc.) ou de tecidos fetais (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo e pulmão) (BIANCHI et al.,

2001; MARTIN et al., 2002; MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; HAYASHI et al., 2008; ABREU et al., 2011; VALENTINI et al., 2011). Na sua maioria, fornecem suporte estrutural em vários órgãos além de regular o transporte de substâncias. A sua natureza estromal pode ser caracterizada pela rápida aderência após cultivo bem como a sua aparência com fibroblastos (BYDLOWSKI et al., 2009). A sua habilidade em se propagar e se diferenciar em múltiplas linhagens como osteócitos, condrócitos e adipócitos em definidas condições de cultivo, gerou um grande interesse para a aplicação destas células na terapia celular (DEANS; MOSELEY, 2000; BIANCO et al., 2001; BITTENCOURT et al., 2006; DE COPPI et al., 2007; HOYNOWSKI et al., 2008; BAE et al., 2011; LIN; HANKENSON, 2011). Embora possuam menor capacidade de diferenciação que as células-tronco embrionárias, apresentam enormes vantagens levando-se em conta a facilidade de isolamento, a capacidade de propagação em cultura, baixa imunogenicidade, podendo ser teoricamente usadas em transplantes alogênicos (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006; ALDAHMASH, 2012). A plasticidade das células tronco mesenquimais depende majoritariamente do microambiente onde são plaqueadas bem como da densidade de plaqueamento (BIANCO; ROBEY, 2001; MCBEATH et al., 2004; SCHNEIDER et al., 2011). Na ausência de fatores solúveis e da sinalização celular, a plasticidade e a taxa de proliferação podem estar reduzidas. Estes achados sugerem que diferentes fatores interagem de forma sinérgica para regular a proliferação e a diferenciação bem como a manutenção do estado diferenciado das MSCs (BIANCHI et al., 2001; GRASSEL; AHMED, 2007).

Contudo, a frequência destas células em aspirados da medula óssea é bastante reduzida o que diminui a sua atratividade. Além disso, diferentes fatores como o método de isolamento, idade e fisiologia do doador, tipo e condições de cultivo podem interferir nas suas propriedades imunogênicas bem como na sua capacidade de se expandirem e se diferenciarem.

Neste contexto, as células tronco derivadas de tecidos fetais, isoladas do sangue do cordão umbilical, placenta e âmnio surgem com vantagens intermediárias entre as células tronco embrionárias e mesenquimais da medula óssea contornando as limitações de ambos (GUCCIARDO et al., 2008; DEV et al., 2011).

2.3 O ÂMNIO: CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS E APLICAÇÃO EM MEDICINA

O desenvolvimento e a morfologia da placenta e das membranas fetais dos carnívoros domésticos tem sido alvo de inúmeras investigações (MIGLINO et al., 2006). O âmnio é a membrana fetal mais interna que entra em contato com o conteúdo do saco amniótico, nomeadamente, o fluido amniótico, o feto e o cordão umbilical. É completamente composto pelo tecido fetal, fato bastante importante que caracteriza a natureza primitiva das suas células (BOURNE, 1962; TIEDEMANN, 1979).

Durante o desenvolvimento embrionário, a massa celular interna (embrioblasto) se diferencia em duas camadas de células, o hipoblasto e o epiblasto. As células do epiblasto adjacentes ao citotrofoblasto, também denominadas amnioblastos, se diferenciam em células amnióticas epiteliais circundando a cavidade amniótica em alargamento progressivo. Concomitantemente, a camada mesenquimal extraembrionária ao redor das células epiteliais se especializa em tecido conjuntivo amniótico (MIKI; STROM, 2006).

Em cerca de 20 dias de gestação em gatos domésticos o âmnio está completamente formado em forma de membrana avascular em íntimo contato com o embrião. A escassa vascularização prevalece durante toda a gestação sendo que a nutrição das células amnióticas ocorre por provável difusão a partir do alantoide (MIGLINO et al., 2006). Este fato é bastante importante quando se considera o isolamento das células progenitoras do âmnio, pela redução de contaminação com *debris*, células hematopoiéticas e endoteliais.

Basicamente, a membrana amniótica é composta de dois tipos celulares. As células amnióticas epiteliais (AECs), cuboides a colunares, são de origem epiblástica que compõem a camada epitelial interna em contato direto com o fluido amniótico. As células amnióticas mesenquimais (AMCs), encontram-se aleatoriamente distribuídos na matriz extracelular, tendo uma origem mesodérmica extraembrionária. São ricas em colágeno e laminina e com um aspecto fibroblastóide (CHANG et al., 2010). Estudos apontam que ambos os tipos celulares do âmnio, se originam durante o estágio de pré-gastrulação da embriogênese prior ao delineamento dos três folhetos embrionários o que sugere que retém propriedades primitivas e características de células tronco pluripotentes (ILANCHERAN et al., 2007; MANUELPILLAI et al., 2011). Estas propriedades justificam a maior atração por estas células, sendo alvo de maior investigação nos últimos dias.

Desde a primeira descoberta do uso da membrana amniótica em 1910, em transplantes de pele para o tratamento de feridas graves, muitos estudos vêm sendo

desenvolvidos no sentido de esclarecer a importância da sua aplicação em medicina moderna (DUA et al., 2004). Atualmente, o âmnio é tido como uma das feramentas mais privilegiadas em transplantes biológicos para o curativo de diversas patologias como feridas graves e úlceras não cicatrizantes (LEE; TSENG, 1997; NIKNEJAD et al., 2008; INSAUSTI et al., 2010; KLEIN et al., 2011), cirurgia de reconstituição vaginal (DHALL, 1984), reparação da hérnia abdominal (GHARIB; URE; KLOSE, 1996), prevenção da adesão cirúrgica (YOUNG et al., 1991; RENNEKAMPFF et al., 1994), fechamento do pericárdio (MURALIDHARAN et al., 1991) dentre outras.

Contudo, nos últimos anos o âmnio tem sido amplamente aplicado em cirurgias oftálmicas para o tratamento de diversas desordens oculares superficiais para a reconstituição de vários órgãos como a conjuntiva, a esclera e a córnea (DUA et al., 2004; KALPRAVIDH et al., 2009; LIANG et al., 2009; BARACHETTI; GIUDICE; MORTELLARO, 2010; SHEHA et al., 2010; MEHENDALE; DAGI, 2011; PLUMMER et al., 2011; STRUBE et al., 2011).

Na temática de engenharia tecidual, o grande desafio está no desenho e seleção do material adequado para o transplante. A compatibilidade que dita o sucesso de todo o processo, depende em grande parte da natureza e da fonte do material bem como da natureza da matriz receptora. Como descrito anteriormente, o âmnio é o biomaterial de eleição de longa data. O relevo do âmnio na engenharia tecidual reside na sua habilidade de reduzir a inflamação e a formação da cicatriz para além de possuir propriedades antimicrobianas o que a torna molde ideal para proliferação e diferenciação celular (NIKNEJAD et al., 2008).

2.4 CÉLULAS PROGENITORAS DERIVADAS DO ÂMNIO E SUA APLICAÇÃO EM MEDICINA REGENERATIVA

A membrana do âmnio possui duas populações distintas de células. As células amnióticas epiteliais que constituem a camada epitelial interna em contato direto com o líquido amniótico e as células amnióticas mesenquimais distribuídos na matriz extracelular. Estas apresentam distintas características morfológicas embora pela sua natureza primitiva, o seu comportamento em cultivo e a expressão de marcadores moleculares tendem a ser similar.

Eficientes protocolos para o isolamento das AECs e AMCs vêm sido desenvolvidos e baseiam-se especificamente na identificação da membrana, separação cautelosa dos restantes tecidos fetais e subsequente digestão enzimática. De acordo com estudos reportados por Soncini et al. (2007), Diaz-Prado et al. (2010), Mauro et al. (2010), Consiglio et al. (2011), Diaz-Prado et al. (2011), Manuelpillai et al. (2011) e Uranio et al. (2011), para o isolamento e distinção das células derivadas do âmnio, as membranas coletadas e previamente lavadas devem ser digeridas primeiramente em colagenase por mais de 3horas. As células colhidas deste processo são as AMCs. Os fragmentos do âmnio não digeridos devem ser novamente incubados com 0,25% de tripsina para a obtenção das AECs. Em cultivo, as AECs são células cuboides ou colunares enquanto que as AMCs tem uma morfologia similar a fibroblastos. Contudo, reporta-se uma grande variação do comportamento de cultivo bem como da expressão de marcadores moleculares de acordo com a passagem, tendo maior desempenho nas fases iniciais do crescimento.

No geral, tanto as AECs como as AMCs respondem positivamente a marcadores de pluripotência como Oct4, fator de transcrição que joga um papel importante na manutenção de pluripotência e da capacidade de auto-renovação. A expressão deste fator em MSCs derivadas da medula óssea é bastante reduzida (JIANG et al., 2002), contudo, o padrão de expressão em células amnióticas é similar ao das ESCs o que sustenta a hipótese da natureza primitiva e maior pluripotencialidade destas células.

Estudos também reportam reatividade positiva a vários marcadores de superfície característicos de células tronco mesenquimais como CD73 [enzima de alta especificidade ao substrato responsável pela desfosforilação das purinas e pirimidinas ribo- e desoxirribonucleotídeos em nucleotídeos correspondentes (COLGAN et al., 2006)] e CD90 [antígenos de superfície inicialmente descoberto em timócitos supostamente envolvido em vários processos como interação celular e regeneração neural (IACONO et al., 2012)]. Contudo, revelam baixa expressão de marcadores hematopoiéticos como CD79 [encontrados quase que exclusivamente em linfócitos B (CHU; ARBER 2001)] CD34 [marcador de células hematopoiéticas primitivas e endoteliais (KRAUSE et al., 1996)] e CD 45 [antígeno comumente encontrado nos leucócitos (TROWBRIDGE; THOMAS, 1994)]

Além disso, estas células demonstraram capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens tanto *in vitro* assim como após transplantes *in vivo*. Acreditava-se, no entanto que estas células tinham apenas a capacidade de gerar células diferenciadas de linhagem mesodérmica como osteócitos, adipócitos e condrócitos. Em estudos recentes foi reportada a diferenciação em cardiomiócitos (ZHAO et al., 2005; TSUJI et al., 2010), neurônios para o

tratamento de lesões cerebrais, medulares e degeneração neural (SAKURAGAWA et al., 2004; PAN et al., 2006; REHNI et al., 2007; MANOCHANTR et al., 2010; SHINYA et al., 2010; CHEN, Z et al., 2011), hepatócitos (TAMAGAWA et al., 2007; MARONGIU et al., 2011), células endoteliais (ALVIANO et al., 2007) e também a aplicação no tratamento de fibrose e cirrose pulmonar (MOODLEY et al., 2010; VOSDOGANES et al., 2011; ZHANG; JIANG; MIAO, 2011). Após os transplantes, demonstraram efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos (MANUELPILLAI et al., 2011) características aliciantes para a medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

Objetivos

3 OBJETIVOS

O presente estudo visa testar a seguinte hipótese:

A linhagem celular derivada da membrana amniótica dos gatos domésticos apresenta características típicas de células tronco mesenquimais.

3.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar as células derivadas da membrana amniótica de gatos domésticos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de crescimento celular
- Analisar a capacidade de formação de colônias
- Avaliar a viabilidade celular pós-criopreservação
- Avaliar a expressão de marcadores específicos de MSCs
- Avaliar a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens
- Avaliar o potencial carcinogênico desta linhagem celular

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com os princípios de ética em investigação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, processo USP número: 2011.1.1658.74.6.

Todo material usado neste experimento foi adquirido na *Sigma-Aldrich Chemical Company* (St. Louis, MO, USA) salvo menção específica.

4.1 ESTABELECIMENTO DO CULTIVO CELULAR

4.1.1 Coleta e transporte das amostras

As membranas amnióticas foram separadas de quatro (4) fetos coletadas durante as campanhas rotineiras de castração na cidade de Pirassununga-SP em gatas no último terço de gestação, após uma anestesia geral. Os úteros que apareceram grávidos foram lavados com solução tampão (PBS: *phosphate buffering solution*) e transportadas sob condições ambientais até ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD-FZEA-USP) onde todas as etapas subsequentes foram realizadas dentro do fluxo laminar. O âmnio foi cuidadosamente isolado das restantes membranas fetais e acondicionado em placas de petri contendo solução tampão (PBS) e penicilina/estreptomicina.

4.1.2 Isolamento e cultivo das células mesênquimais do âmnio

As amostras foram lavadas com PBS e penicilina/estreptomicina para remoção de *debris*, muco e coágulos, em seguida manualmente maceradas em placas de petri estéreis com recurso a lâmina de bisturi. Os fragmentos foram posteriormente transferidos para tubos tipo falcon e digeridos com colagenase 0,1% (w/v) durante 3horas a 38,5^{o}C. Após a digestão enzimática, o material foi centrifugado por 5minutos a 1500rpm, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1ml de meio de cultivo: DMEM/Ham´s F12 (1:1, LGC Biotecnologia, cat. # 30004-05) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 1% de aminoácidos não essenciais (cat. # M-7145), 1% de L-glutamina (cat. # G7513), 1% penicilina/estreptomicina, 0,5% gentamicina e 0,1% de mistatina. Em seguida o conteúdo foi filtrado em filtros de malha estéreis (BD-Falcon, cell strainer 40µm nylon, cat. # 352340) e cultivado em placas de petri a 38,5^{o}C numa atmosfera de 5% de CO_2. Os cultivos subsequentes foram efetuados sob mesmas condições à exceção de gentamicina e mistatina no meio de cultivo. Também foi testado o perfil de crescimento celular em meio α-MEM, sob mesmas condições.

4.1.3 Propagação em cultivo: Repique celular

Quando as células atingiram uma confluência de cerca de 80% (24horas pós-cultivo), todo o meio foi cuidadosamente removido da placa. Em seguida, foi acrescida tripsina a 0,25% (Tryple Express: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e incubadas por 15 minutos a 38,5ºC. Após completa desagregação enzimática das células aderentes, todo o conteúdo da placa foi transferido para um tubo tipo Falcon para posterior centrifugação durante 5 minutos a 1500rpm. O pellet resultante foi ressuspendido em 1ml do meio de cultivo para contagem celular, posteriormente transferidos para uma placa de petri e cultivadas sob mesmas condições descritas anteriormente.

4.1.4 Avaliação da cinética de crescimento celular

Para avaliar a capacidade de propagação em cultivo e o perfil de replicação celular, foram plaqueadas numa densidade de $3x10^4$ células por placa de petri (10mm). A cada 72horas (período em que atingem confluência de 80-90%), as células foram tripsinizadas como foi descrito anteriormente, e o número total determinado pela contagem celular na câmara de Neubauer. Em cada repique, foi plaqueado igual número de células $3x10^4$, num volume determinado com a seguinte fórmula.

$$Vp = \frac{ni * Vs}{nf/4}$$

Onde: Vp- volume a plaquear, ni- número de células cultivadas, Vs – volume de suspensão e nf- número total de células no fim de cada cultivo.

Com os dados colhidos durante várias passagens, foi estabelecido o padrão da curva de crescimento desta linhagem celular bem como o tempo de geração (*doubling time*) com base na seguinte fórmula (CONSIGLIO et al., 2011).

$$Dt = \frac{Ct}{Cd}$$

Onde: Dt – tempo de geração/duplicação, Ct – tempo de cultivo, Cd – células duplicadas, sendo que:

$$Cd = \frac{\ln (nf/ni)}{ln2}$$

4.1.5 Avaliação da capacidade de formação de colônias

Para testar a capacidade de formação de unidade de colônia (UFC), foram plaqueadas diferentes densidades de células $1,5x10^3$, 10^4 e 10^5 em placas de petri e incubadas a 38,5°C numa atmosfera de 5% de CO_2. Foi efetuada a reposição do meio de cultivo e o monitoramento do cultivo a cada 4 dias num período de 2 semanas. As colônias foram fixadas com paraformaldeído, coradas com Giemsa (0,1%) durante 15minutos a temperatura

ambiente e lavadas duas vezes com PBS. Apenas colônias formadas por mais de 50 células nucleadas foram contabilizadas no microscópio.

4.1.6 Criopreservação

O congelamento celular foi efetuado em todas as passagens. Após desagregação enzimática do cultivo com tripsina á 0,25% e centrifugação (como foi descrito anteriormente), o *pellet* resultante foi ressuspendido no meio de congelamento composto por 45% de DMEM, suplementado com 45% de SFB, 10% (v/v) dimetil sulfóxido (DMSO) e 1% penicilina/estreptomicina. Após determinação da densidade celular, foram posteriormente distribuídas em criotubos por sua vez alocados em dispositivos próprios para congelamento (Mr. Frosty). Este dispositivo permite o congelamento de -1°C por minuto após serem colocados a temperatura de -80°C. Após 24horas, foram transferidos para o tanque com nitrogênio líquido no qual permaneceram armazenados e criopreservados por tempo indeterminado para utilização posterior. Após o descongelamento, foi determinada a viabilidade celular mediante contagem de células vivas *versus* células mortas na câmara de Neubauer depois de efetuada coloração com *Trypan blue*. Estas células foram posteriormente usadas em testes imunológicos para avaliar a expressão de marcadores celulares específicos de MSCs e avaliar a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens.

4.2 MÉTODOS MOLECULARES

4.2.1 Citometria de fluxo

Foi testado o padrão de expressão dos marcadores de superfície característicos de células tronco mesenquimais e a marcação específica de células hematopoiéticas como

controlo de reatividade negativa. Células (P3/P4) em suspensão foram distribuídas em tubos *eppendorf*, lavadas duas vezes com PBS e fixadas em paraformaldeído (4%) por 15min a temperatura ambiente. O quadro1 ilustra detalhadamente o tipo de anticorpo, a natureza, a procedência e o padrão de distribuição.

Quadro 1 - Descrição da natureza e procedência dos anticorpos primários e secundários utilizados nas provas moleculares de imunocitoquímica e citometria de fluxo

Anticorpos primários	Fonte	Anticorpos Secundários
CD34 (C-18): sc-7045 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. **CD73** (V-20): sc-14682 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY INC. **CD90** (K-16): sc-6071 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	GOAT polyclonal antibody	Alexa Fluor® 488 rabbit anti-goat IgG (H+L) *2 mg⁄mL* Cat # A11078. Invitrogen
CD45 (CC171): sc-101839 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC **CD79A** (HM47): sc-20064 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.	MOUSE monoclonal antibody	Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) *2 mg⁄mL* Cat # A11001. Invitrogen

Após a segunda lavagem com PBS, foram centrifugadas a 500g por 5min em *eppendorf* e incubadas com tampão de bloqueamento (BSA a 2%) a temperatura ambiente. Transcorrido 45 minutos, as células foram novamente centrifugadas a 500g por 5min, lavadas duas vezes com tampão BSA (0,2%) e incubadas com o anticorpo primário diluído em tampão BSA a 0,2% (1:300) *overnight* a 4°C. Nas amostras de controle negativo foi adicionada apenas uma solução de BSA (0,2%) ao invés do anticorpo.

Após este período, as células foram novamente lavadas com PBS para remoção do excesso do anticorpo, para posterior incubação com anticorpo secundário diluído em tampão BSA a 0,2% (1:300) em temperatura ambiente e no escuro por 45 min.

Em seguida, foi efetuada nova lavagem e o *pellet* ressuspendido com 100nM de *mito tracker* diluído em tampão BSA a 0,2% durante 45min a temperatura ambiente. O conteúdo

foi finalmente distribuído em tubos tipo Falcon específicos para citometria de fluxo para posterior análise.

4.2.2 Imunocitoquímica

Para realização desta prova as células foram cultivadas em lamínulas em placas de cultivo celular de 6 poços numa densidade de $3x10^4$ células por poço. Após atingirem 80% de confluência, foi efetuada lavagem do cultivo com PBS 3vezes e a fixação com paraformol (4%) por 15 minutos. O bloqueio foi efetuado com 2% de BSA por 30 minutos a temperatura ambiente para posterior incubação *overnight* a 4^oC com anticorpo primário diluído a 0,2% de tampão BSA. As etapas subsequentes foram realizadas na ausência da luz. As células foram em seguida incubadas com anticorpo secundário conjugado a uma substância fluorescente, diluído a 0,2% de tampão BSA, durante 2horas a temperatura ambiente. Por fim foi efetuada a marcação específica do núcleo com 10µg/ml Hoechst 33342 e a montagem das lamínulas em lâminas microscópicas para posterior visualização em microscopia de fluorescência. Nesta etapa foi testado o grau de expressão de marcadores específicos para células tronco mesenquimais CD90 e CD73 e de células tronco de natureza hematopoiética CD34, CD45 e CD79.

4.3 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*

Os testes de diferenciação osteogênica e adipogênica foram efetuados em células na P3/P4 com a utilização de *kits* de diferenciação StemX VivoTM da R&D. Foram rigorosamente seguidos os protocolos de acordo com orientações do fabricante. Em resumo, as células foram plaqueadas numa densidade de $2,1x10^4$ células/cm^2 (para diferenciação adipogênica) e $4,2x10^3$ células/cm^2 para diferenciação osteogênica) em meio básico (StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media, R&D Systems, Catalog # CCM007). Ao atingir 100% de confluência (adipogênica) e 50-70% (osteogênica) o meio básico foi substituído pelo meio específico de diferenciação adipogênica [StemXVivo

Adipogenic Supplement (R&D Systems, Catalog # CCM011)] e osteogênica [StemXVivo Human Osteogenic Supplement (R&D Systems, Catalog # CCM008)] o qual era reposto a cada 4 dias durante 21 dias. A deposição dos vacúolos lipídicos foi testada mediante coloração com OIL RED enquanto que a diferenciação osteogênica mediante a coloração com ALIZARIN RED.

4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO

O ensaio para análise do potencial carcinogênico das células progenitoras mesenquimais do âmnio de gatos domésticos foi efetuado em quatro camundongos imunodeprimidos (Balb/c - Nude). Cerca de $2,5x10^4$ células (P4) foram inoculadas via intramuscular (musculatura da coxa), subcutânea (flanco dorsal) e via intraperitoneal. Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados em câmaras de gás (CO_2) de acordo com as normas de bioética em vigência. Os pontos de transplante foram cuidadosamente expostos para averiguar possível formação de teratomas. Foram coletados para análise histopatológica fragmentos do músculo, encéfalo, pulmão, coração, fígado, rim, baço, intestino e gânglios linfáticos. O material coletado foi fixado em formol 10% tamponado, incluídos em parafina e processados para coloração com hematoxilina e eosina.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESÊNQUIMAIS DO ÂMNIO

Após a coleta, os envoltórios fetais incluindo a placenta foram cuidadosamente abertos e removidos restando apenas o âmnio envolvendo em contato íntimo o feto (Figura 1A). Em seguida procedeu-se a dissecação cuidadosa da membrana amniótica com privilégio a cobertura dorsal do feto no intuito de evitar contaminação pelos *debris* e células hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical (Figura 1B e 1C).

Após a maceração e digestão enzimática, o conteúdo foi filtrado para separação das AMCs usando filtros de malha estéreis (Figura 1D) e cultivadas em condições controladas (38,5^{o}C, 5% CO_2). O cultivo foi monitorado a cada 24horas e após atingirem 80% de confluência foram tripsinizadas e recultivadas em várias passagens para analisar o seu comportamento fenotípico. Após 24horas de cultivo, as células apresentavam-se aderentes a placa de cultivo com uma morfologia similar a fibroblastos. Células pareadas eram claramente visíveis indicando o processo de proliferação celular. Todas as passagens até a P10 foram devidamente documentadas como mostram as figuras 2A-2D.

Figura 1- Separação da membrana amniótica de gatos domésticos. A: Feto coberto pelo âmnio contendo líquido transparente (*) após a completa remoção das restantes membranas e da placenta zonaria (>). B: Dissecação cautelosa do âmnio de cobertura dorso lateral (*) evitando-se a região em torno do cordão umbilical altamente vascularizado (>). C: Membrana amniótica completamente dissecada, transparente e avascularizada (*). D: Filtros de malha estéreis 40µm (cat. # 352340). Todo conteúdo digerido foi filtrado (*) para uma placa de petri estéril (>) com o intuito de separar as AMCs e descarte dos *debris*, muco e fragmentos epiteliais não digeridos

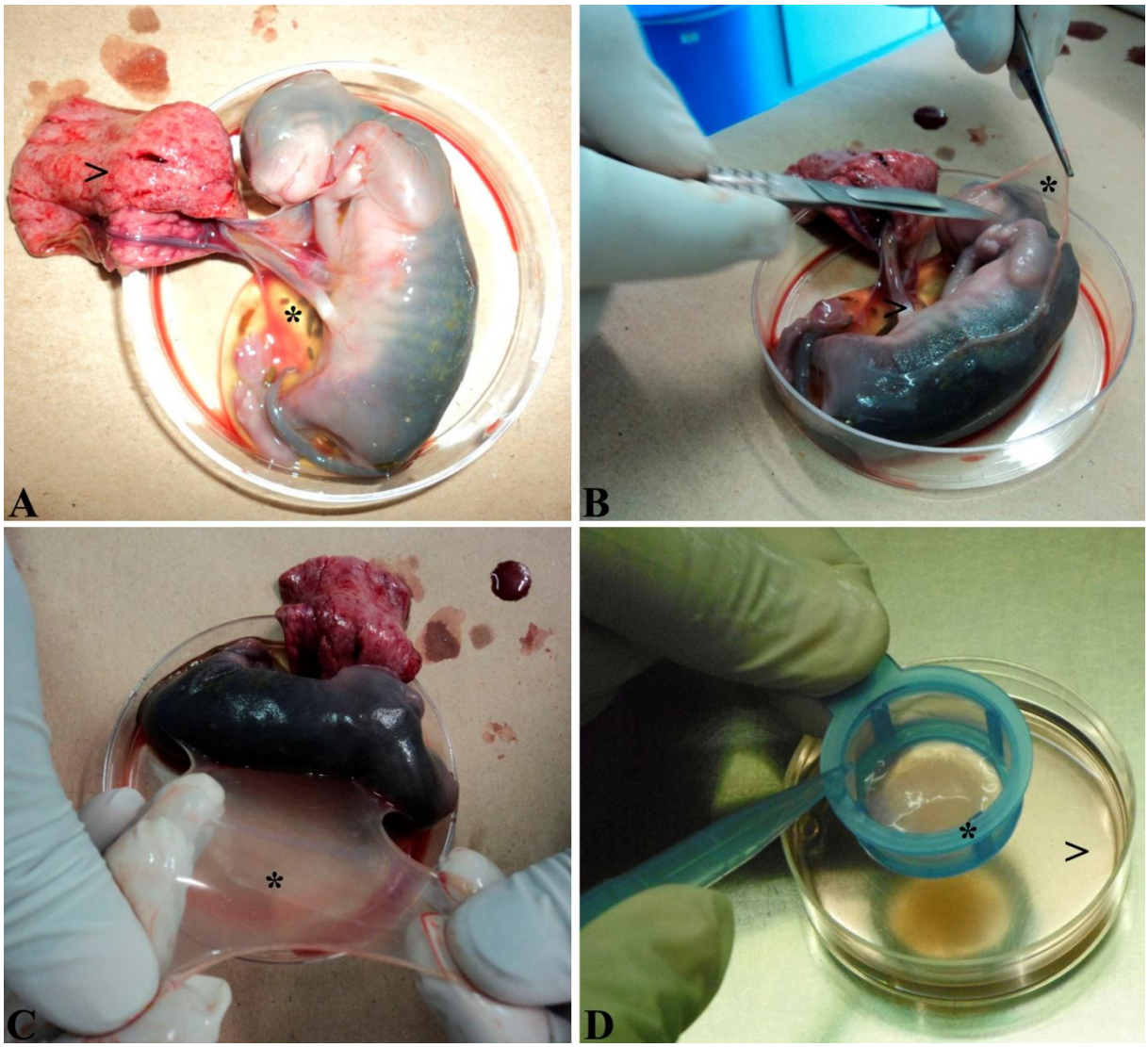
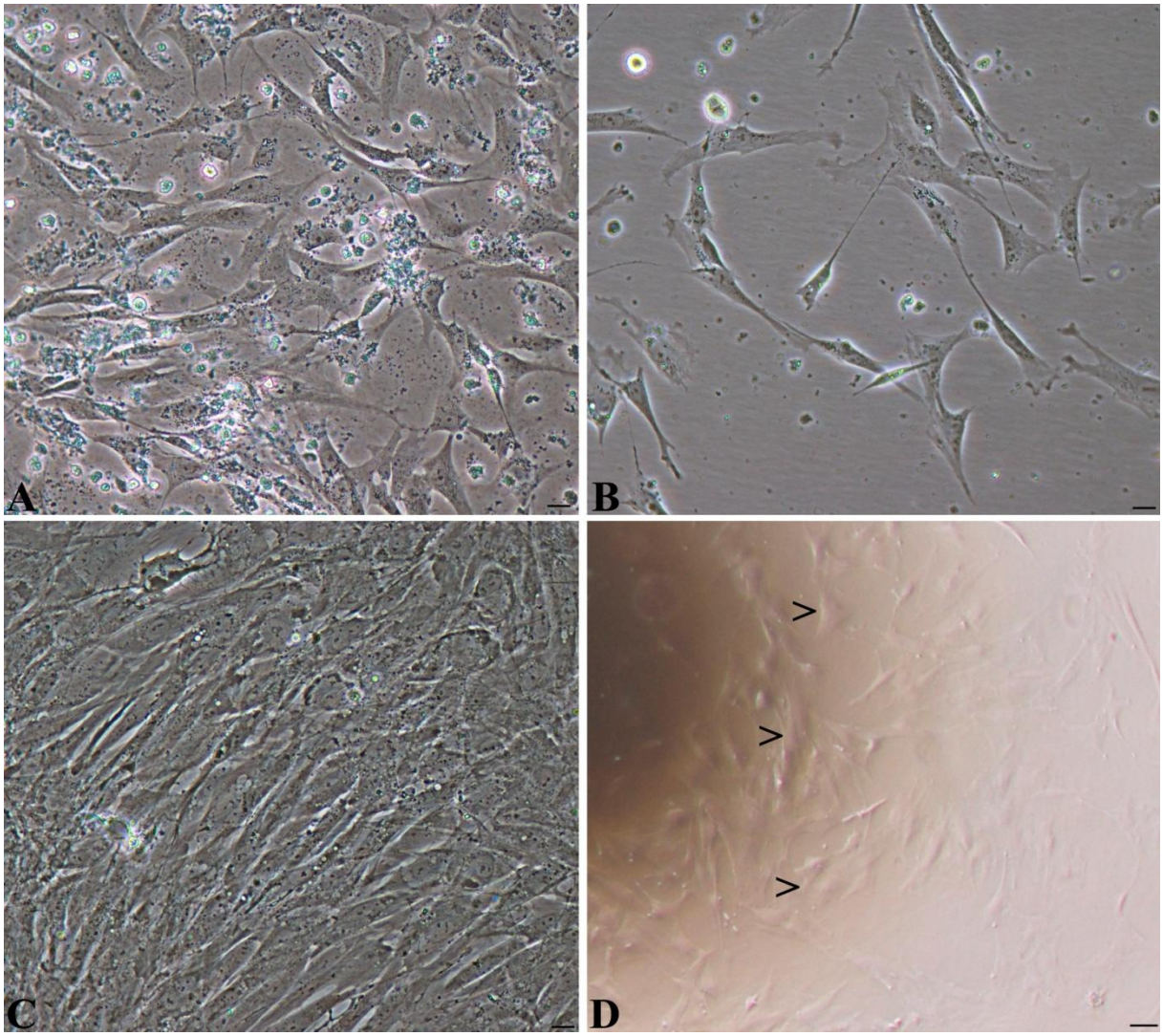


Figura 2 - Fotomicrografia da morfologia das células mesenquimais indiferenciadas derivadas do âmnio. Após 24horas de cultivo inicial (A), as células apresentavam-se aderentes a placa de cultivo com uma morfologia similar a fibroblastos. Esse fenótipo foi mantido nas passagens subsequentes P1 em baixa densidade (B) e mesmo a quase 100% de confluência (C). Em D, esta ilustrada em baixa resolução células em P3, com mesmas características, na sua maioria pareadas como indicativo de intensa proliferação (>). A, B e C: 20x (Barra: 20µm); D: 5x (Barra: 100µm)

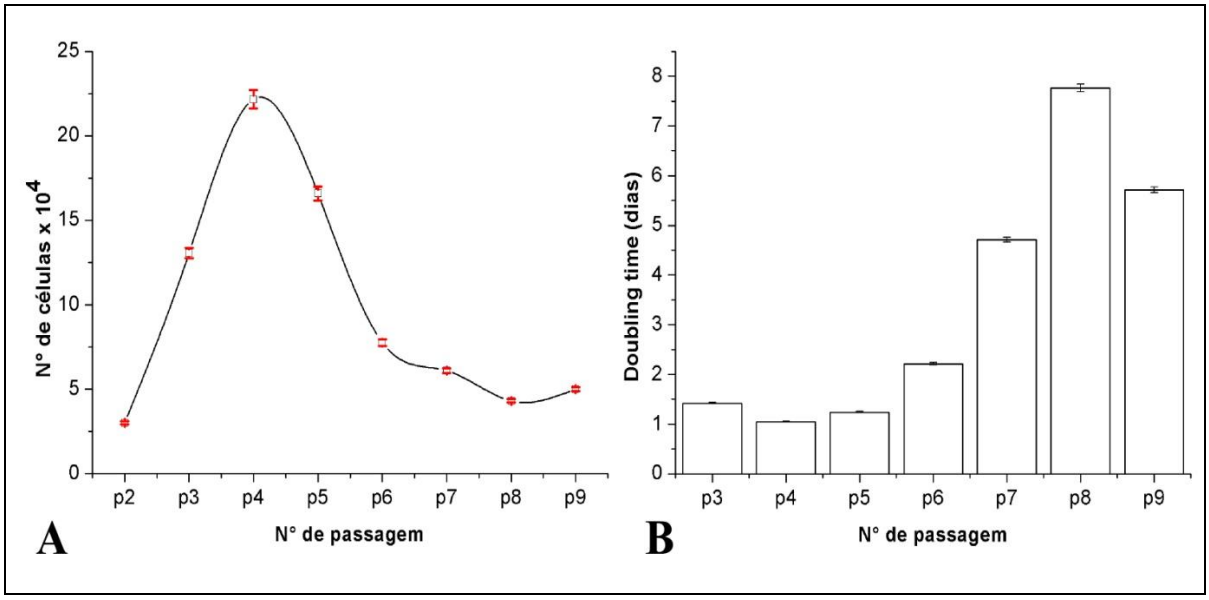


5.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO CELULAR

Para a avaliação do perfil de crescimento, as células foram plaqueadas em triplicatas e monitoradas a cada 72horas durante várias passagens. Em cada repique, foi determinado o número total de células mediante a contagem celular na câmara de Neubauer e em seguida foi estabelecido o padrão da curva de crescimento desta linhagem celular como mostra a

gráfico 1A. As células demonstraram um crescimento bastante acelerado logo no início do cultivo, alcançando o seu pico por volta da quarta passagem. O tempo de geração (*doubling time*) foi calculado e encontra-se detalhadamente ilustrado no gráfico 1B. Nesta linhagem celular, a taxa de proliferação celular reduziu consideravelmente com o tempo, um aumento significativo do DT foi registrado quando comparado o P3 versus P7/8/9. Na passagem1, 1,42±0,99 dias foram necessários para a duplicação do número da população inicial enquanto que na passagem P8 foram necessários cerca de 7,76±0,99 dias.

Gráfico 1 - Representação gráfica do perfil de crescimento das células mesenquimais derivadas do âmnio de gato. A: As células demonstraram um crescimento bastante acelerado durante as primeiras duas passagens e uma queda logo em seguida com uma tendência estacionária. B: Doubling time expresso em números de dias necessários para que as células se dupliquem. O DT tende a aumentar à medida que o número de passagens também aumenta, alcançando o seu pico por volta da oitava passagem

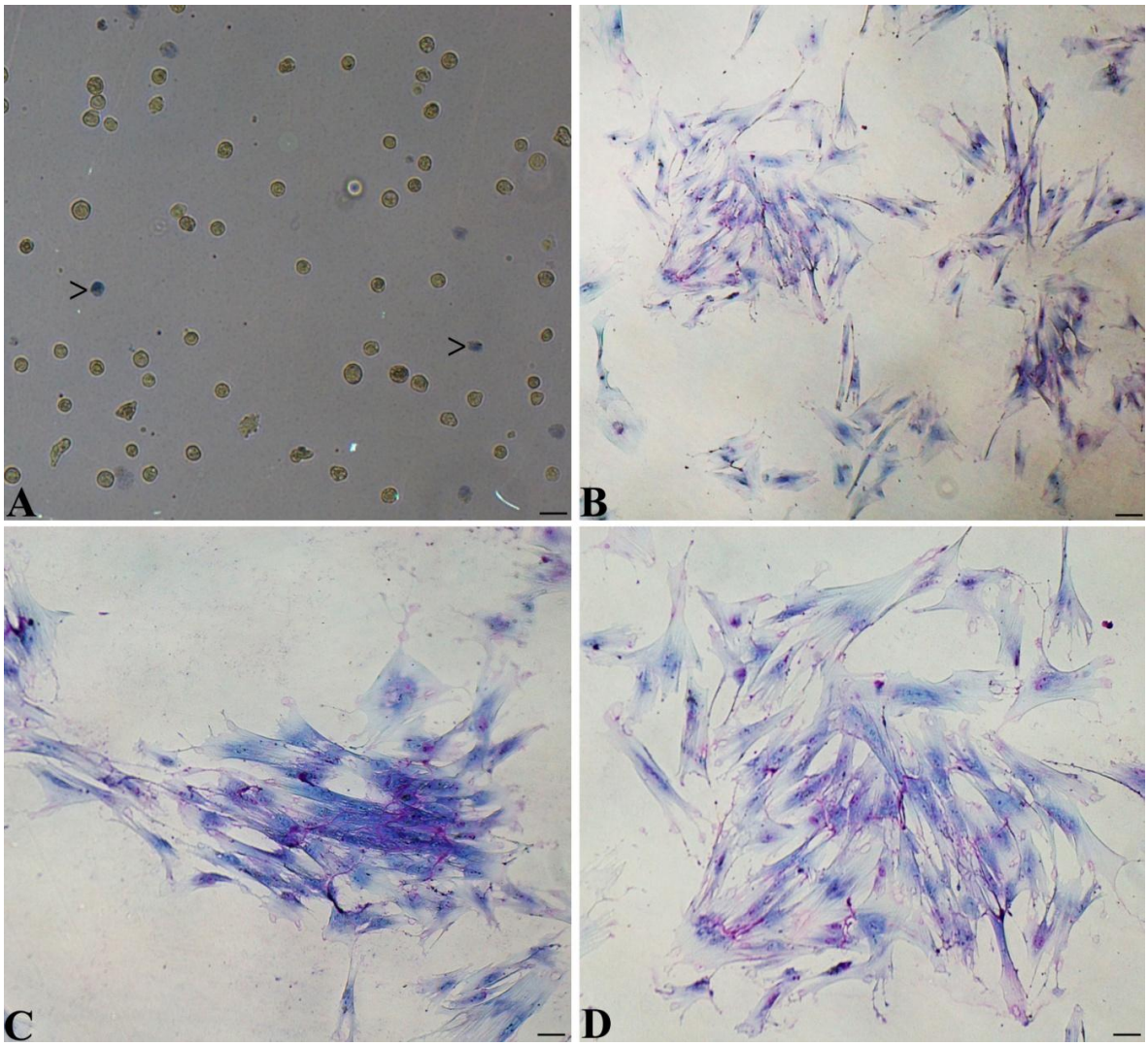


5.3 CRIOPRESERVAÇÃO

O congelamento celular foi efetuado em criotubos a uma temperatura inicial de -80°C durante 24horas em seguida transferidos para o tanque com nitrogênio líquido no qual permaneceram armazenados e criopreservados por tempo indeterminado para utilização posterior. A percentagem das células viáveis foi determinada após coloração com *Trypan*

blue e a contagem celular em câmara de Neubauer. Estas células demonstraram uma alta viabilidade pós-congelamento (Figura 3A) que varia de 90,09% (estágios iniciais de cultivo) a 85,7% (acima de P6).

Figura 3 - A: Fotomicrografia demonstrando a percentagem de células viáveis após o congelamento na P2 - coloração com *Trypan Blue*. As células não viáveis encontram-se escassamente distribuídas e apresentam-se numa coloração azulada (>). Fotomicrografias de unidades formadoras de colônias obtidas após plaqueamento das células mesenquimais do âmnio de gatos domésticos e coloração com Giemsa. A, C, D: 10x (Barra: 50µm); B: 5x (Barra: 100µm)



5.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

As células foram plaqueadas em várias densidades para avaliar a capacidade formadora de colônias. Após 14 dias foram fixadas com paraformaldeído e coradas com Giemsa. Apenas colônias formadas por mais de 50 células nucleadas foram contabilizadas e registradas como detalhadamente ilustram as figuras 3B-3D.

5.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS AMCS

A análise imunofenotípica foi conduzida para avaliar a expressão de marcadores associados a células tronco mesenquimais pluripotentes e células hematopoiéticas. Para a imunofenotipagem, células em várias passagens (P3/P4) foram plaqueadas e processadas para análise imunocitoquímica e citometria de fluxo. Na imunocitoquímica, esta linhagem revelou expressão de marcadores característicos de MSCs incluindo CD73, CD90 (Figura 4) e ausência de marcadores específicos para células hematopoéticas CD34, CD45 e CD79 (Figura 5).

Na análise FACS das MSCs derivadas do âmnio em várias passagens demonstraram expressão positiva para CD73 (89,50%) e CD 90 (91,90%) dados consistentes ao grupo controle das MSCs derivadas do tecido adiposo de humanos com 86,60% e 86,70% respectivamente, ver quadro2. A expressão de marcadores de células hematopoiéticas foi igualmente negativa o que sustenta a ausência de contaminação por células hematopoiéticas (Figura 6).

Figura 4 - Fotomicrografias de análise imunocitoquímica das células mesenquimais derivadas do âmnio. As células indiferenciadas expressaram em seu todo marcadores específicos de células tronco mesenquimais CD90 e CD73. 20x (Barra: 50µm)

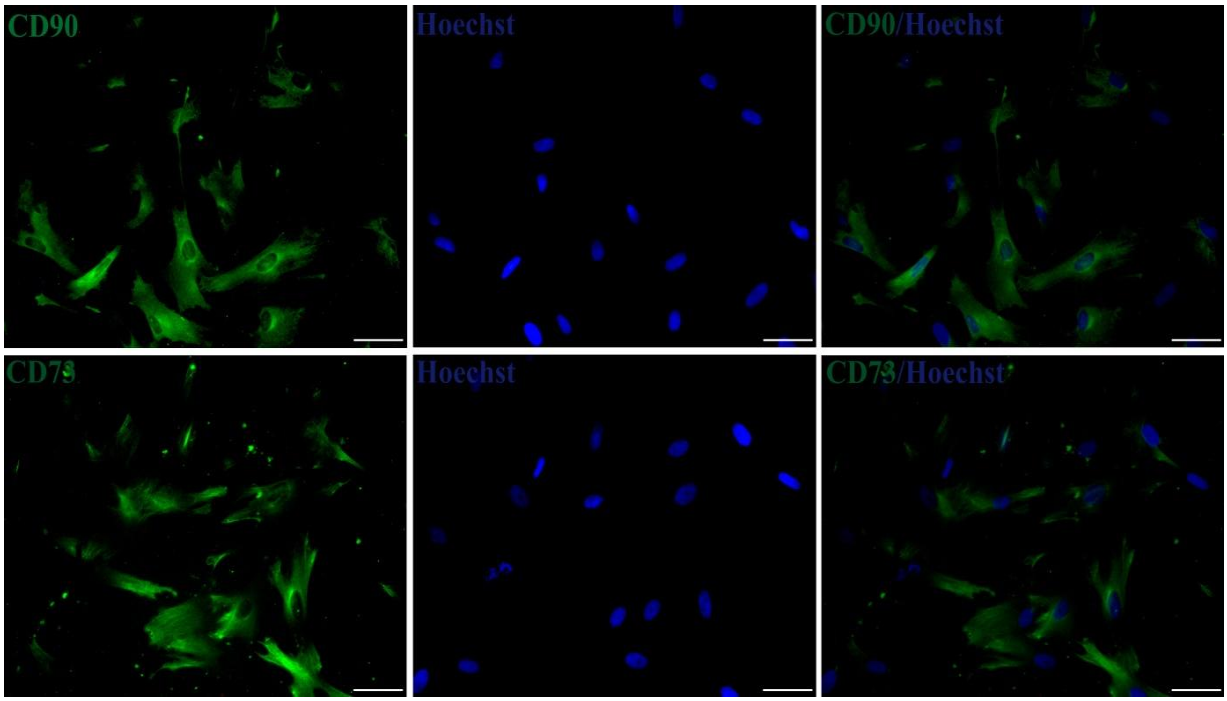
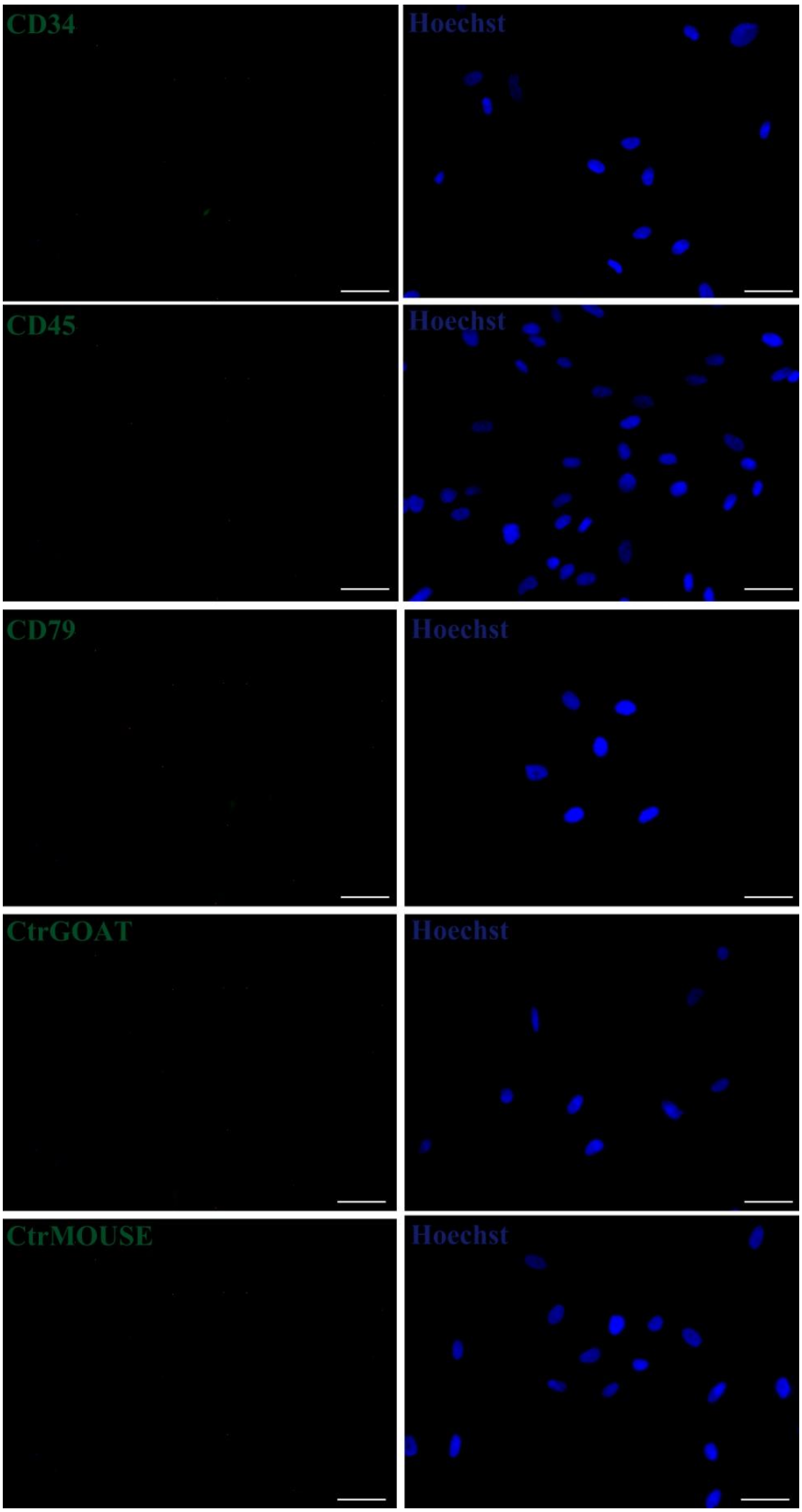


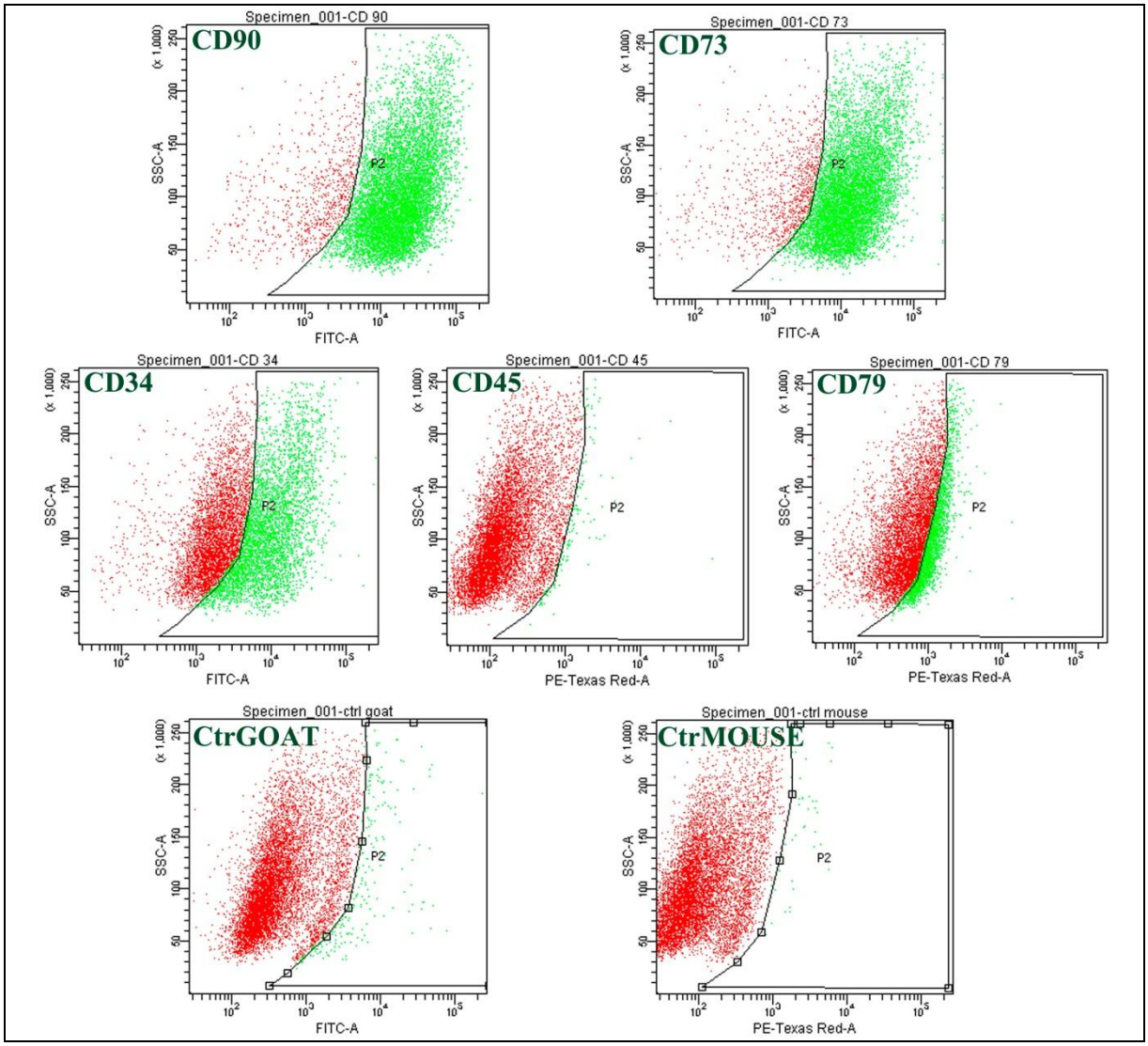
Figura 5 - Fotomicrografias de análise imunocitoquímica das células mesenquimais derivadas do âmnio. Os marcadores de células hematopoiéticas CD34, CD45 e CD79 não foram detectados nesta linhagem celular. 20x (Barra: 50µm)



Quadro 2 - Análise FACS da expressão dos marcadores específicos das células tronco mesenquimais e células hematopoiéticas em células mesenquimais derivadas dos gatos domésticos em comparação com as células homólogas derivadas do tecido adiposo humano

Marcador	**Percentagem (%)**	
	AMC derivadas de Gatos	**AMC derivadas de humanos**
CD90	91,90	86,70
CD73	89,50	86,60
CD34	47,00	84,20
CD45	1,70	0,50
CD79	31,50	25,60
Control Goat	2,70	5,50
Control Mouse	0,50	0,30

Figura 6 - Histogramas da análise em citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície. Esta linhagem respondeu positivamente aos marcadores específicos das MSCs (CD90 e CD73). Em contra partida, revelaram baixa reatividade para marcadores hematopoiéticos (CD34, CD45, CD79). Os histogramas representam o número relativo de células em relação à intensidade de fluorescência



5.6 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*

Osteogênica: Durante o período de diferenciação, registrou se aparecimento de inúmeros pontos de ossificação com tendência a aumentar há medida que aumenta o tempo de cultivo (Figuras 7A e 7B). Os focos osteogênicos tomaram uma coloração avermelhada

após a coloração com *alizarin red* sustentando a deposição da matriz mineralizada (Figura 7C).

Adipogênica: A diferenciação adipogênica foi marcada pela deposição de inúmeros vacúolos de gordura aproximadamente 10 dias após o cultivo (Figura 8A). Estes vacúolos aumentam com o progresso do cultivo a medida que se expendem. Após a coloração com corante específico para gotículas lipídicas (*oil red*) estes apresentaram uma coloração avermelhada (Figura 8B e 8C).

Figura 7 - Diferenciação osteogênica. A: Aparecimento de inúmeros focos de ossificação caracterizados pela deposição da matriz óssea (14 dias de cultivo). B e C: Coloração com *alizarin red* (21 dias de cultivo), presença da matriz mineralizada em tom avermelhado. D: Células em meio de crescimento, mantendo a morfologia fibroblastóide. C e F: Células do grupo em meio de crescimento coradas com *alizarin red*, sem evidencia da deposição da matriz óssea. A, D, e E: 20x (Barra: 50µm); B: 10x (Barra: 100µm); C e F: 40x (Barra: 20µm)

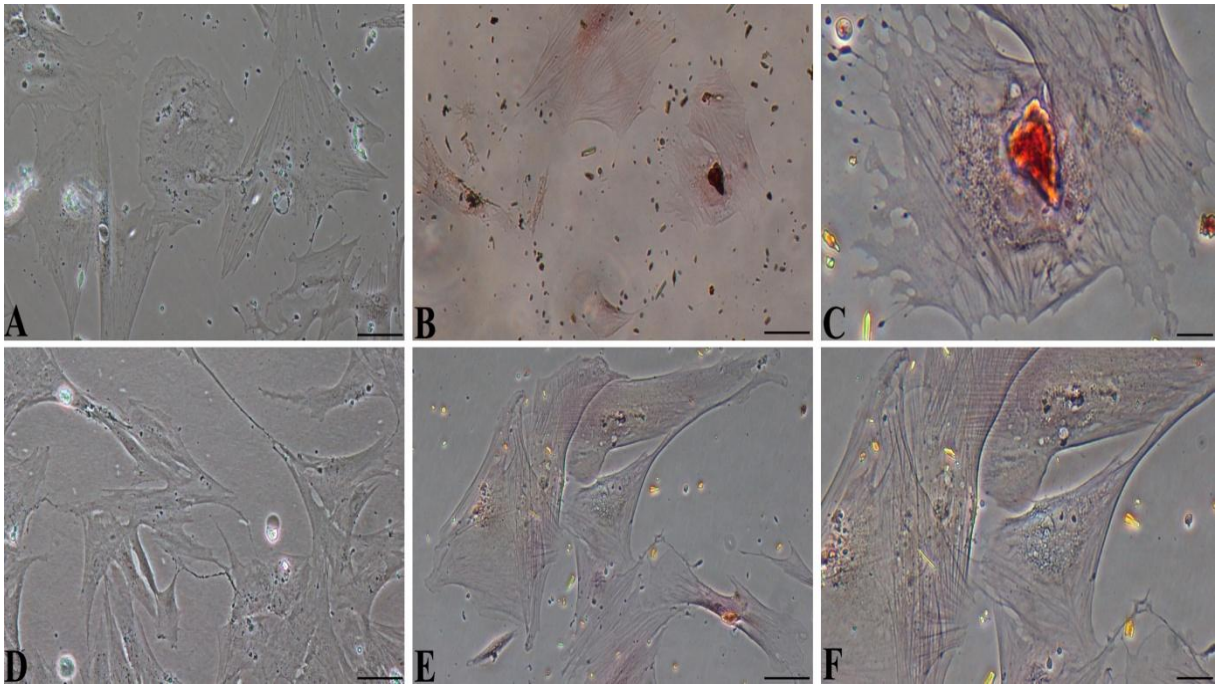
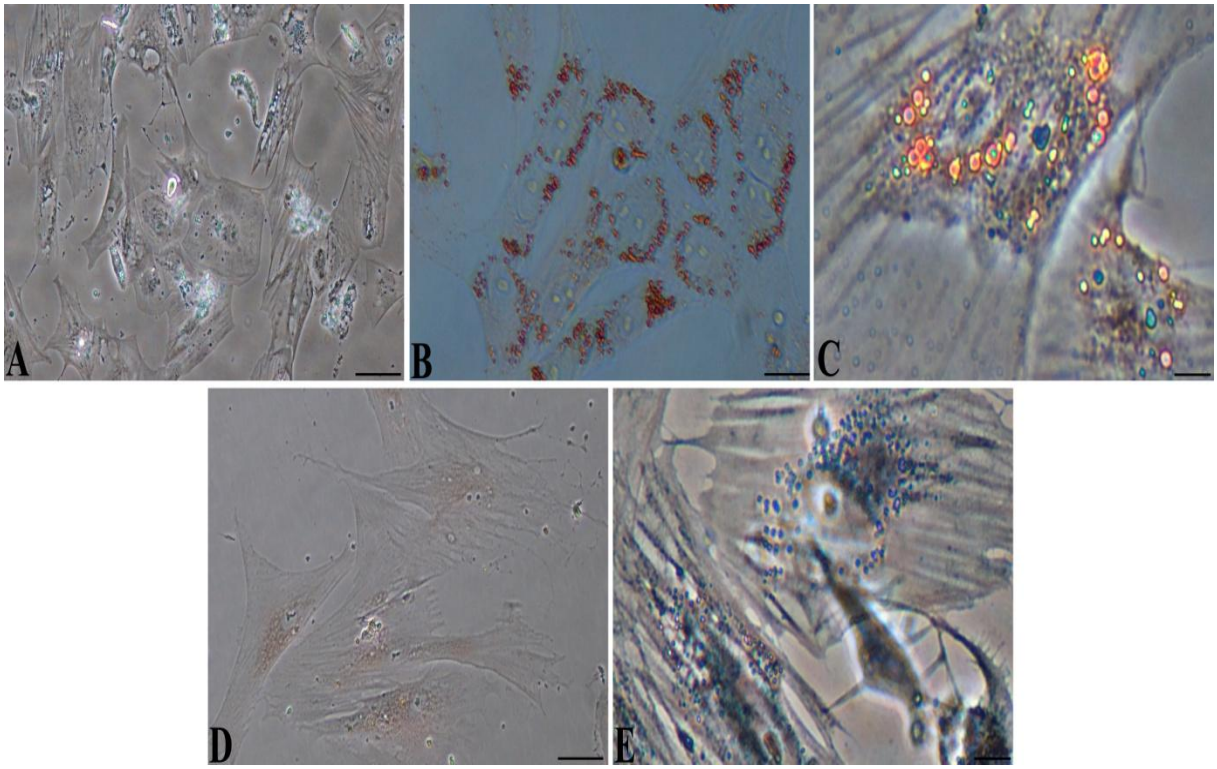


Figura 8 - Diferenciação adipogênica. A: Após adição do suplemento de diferenciação adipogênica, registrou uma marcada deposição de inúmeras gotículas lipídicas. B e C: Coloração com *oil red*, as gotículas lipídicas apresentaram uma coloração avermelhada. E: Quando coradas com *sudan black*, os vacúolos lipídicos se destacaram com uma coloração preta. F: Células em meio de crescimento coradas com *olil red*, não apresentam nenhuma marcação para vacúolos lipídicos. A, B, D: 20x (Barra: 50µm); C e E: 40x (Barra: 20µm)



5.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO

O ensaio carcinogênico foi conduzido em 3 camundongos imunodeprimidos (Balb/c - Nude), inoculados via intramuscular (musculatura da coxa), subcutânea (flanco dorsal) e via intraperitoneal respectivamente (Figura 9A e 9B). Após 4 semanas, os animais foram eutanasiados em câmaras de gás e os pontos de inoculação foram expostos para averiguar possível formação de teratomas (Figuras 9C-9D). Não foi registrada qualquer formação de teratomas nos pontos de injeção e os animais transplantados mantiveram se saudáveis durante todo o período experimental.

A análise histopatológica dos fragmentos do músculo, encéfalo, pulmão, coração, fígado, rim, baço, intestino e gânglios linfáticos não revelaram quaisquer alterações morfológicas (Figuras 9F e 10A-10I)

Figura 9 - Análise do potencial carcinogênico. A: Injeção intraperitoneal das MSCs. B: Quatro semanas após inoculação, não houve formação de carcinomas nos 3 camundongos tratados. C, D e E: Exposição dos pontos de inoculação (>), SC-subcutâneo (dorso), IM-intramuscular (musculatura da coxa) e IP-intaperitoneal, respectivamente. F: Análise macroscópica dos órgãos do animal tratado via intraperitoneal, sem alterações morfológicas

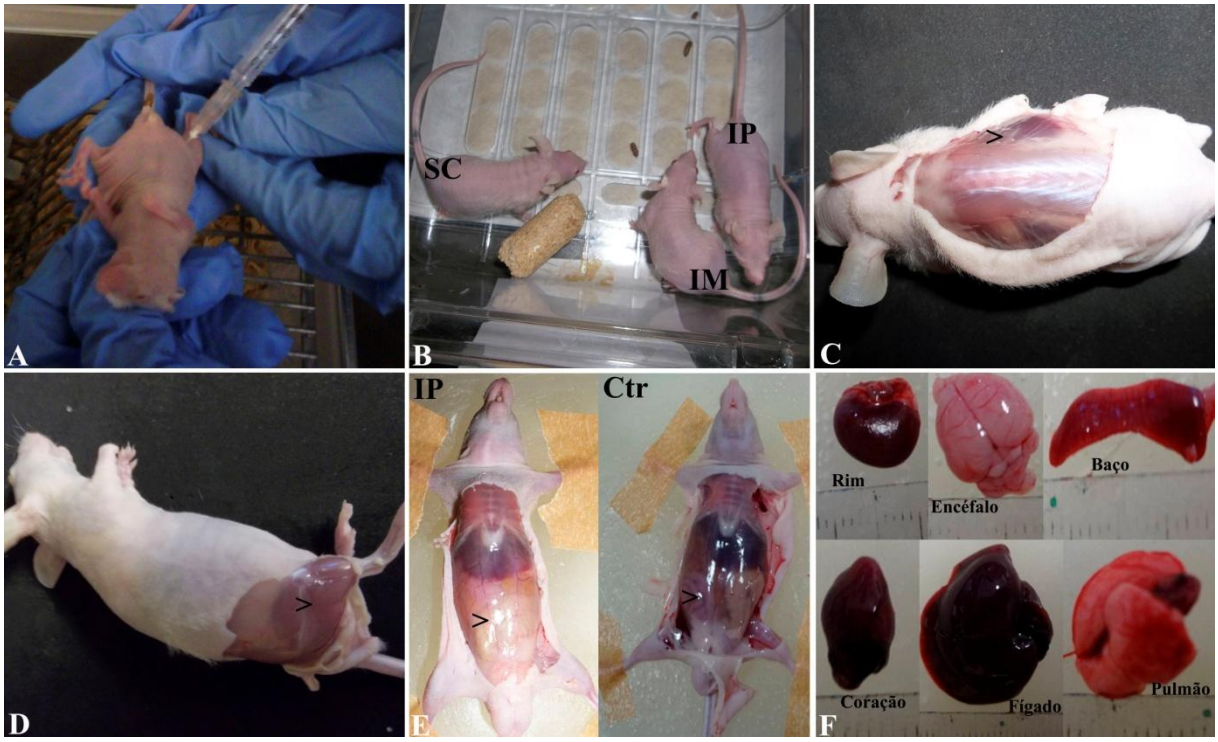
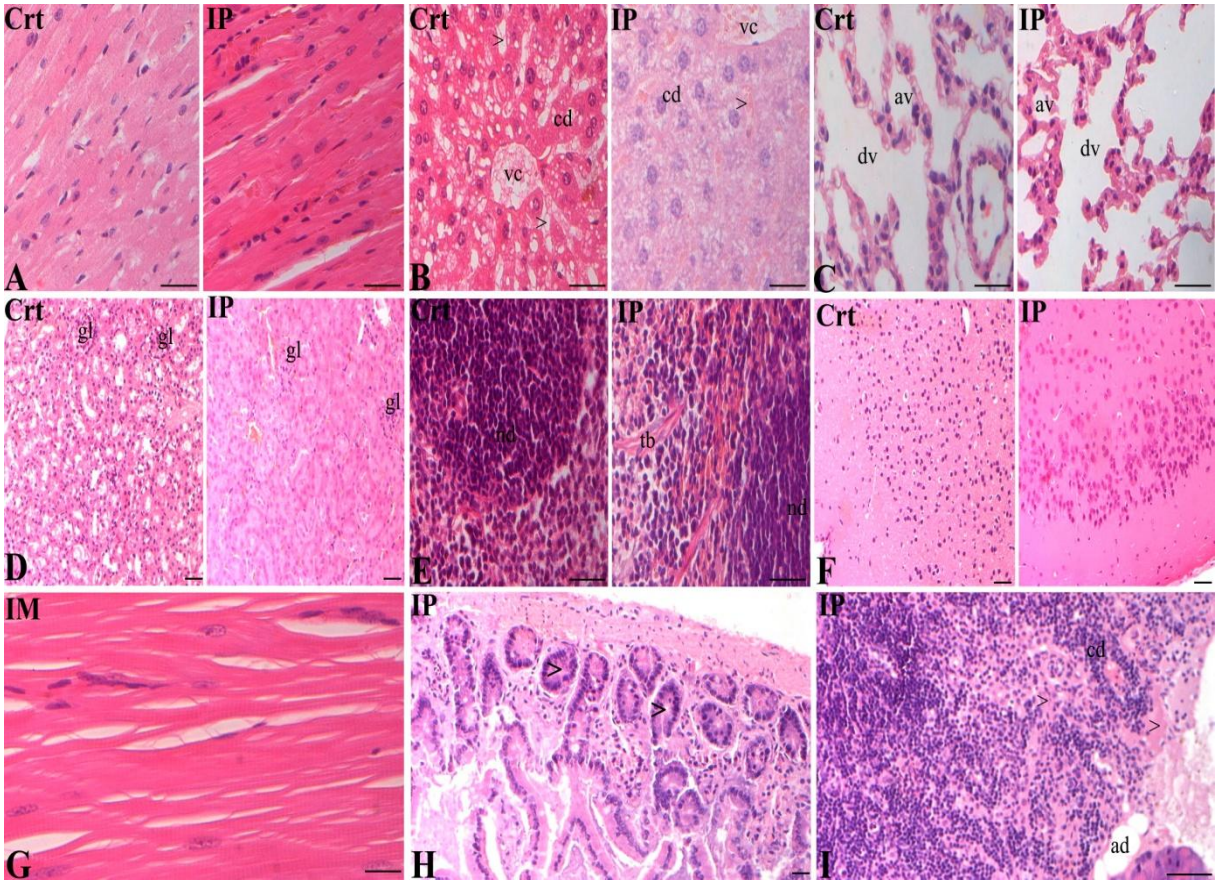


Figura 10 - Fotomicrografias de diferentes órgãos (IP: tratado via intraperitoneal, IM: tratado via intramuscular, Crt: não tratado). A: Corte longitudinal da musculatura do coração revelando uma disposição normal fibras musculares com núcleos centralizados. B: Fotomicrografia do fígado, veias centrais (vc) com números cordões hepáticos (cd) limitando os capilares sinusóides (>). C: Fotomicrografia do pulmão, alvéolos pulmonares (av) em continuidade com os ductos alveolares (dv). D: Corte transversal do córtex renal, visão geral dos glomérulos (gl) e túbulos renais. E: Corte do baço, trabéculas (tb) invadindo o parênquima. Nódulos (nd) disseminados no estroma tecidual. F: Fotomicrografia mostrando diferentes camadas do córtex cerebral. G: Corte longitudinal da musculatura esquelética da coxa, núcleos localizados na periferia das fibras musculares com numerosas estrias transversais. H: Corte do intestino mostrando numerosas glândulas imersas na submucosa tecidual. I: Fotomicrografia de um linfonodo mostrando números cordões medulares de células imunológicas (cd) que separam os seios medulares (>), ad: adipócitos na periferia. A, B, C, E e G: 40x (Barra: 20µm); D, F e H: 20x (Barra: 20µm); I: 20x (Barra: 50µm)



Discussão

6 DISCUSSÃO

O âmnio é a membrana mais interna que envolve diretamente o feto em desenvolvimento. Embora usado na engenharia tecidual para a reconstituição de vários órgãos, é comumente descartado logo após o parto. É também conotado por apresentar células progenitoras primitivas, com alto potencial proliferativo e capazes de se diferenciar em várias linhagens de células adultas. Seguindo o protocolo descrito por Soncini et al. (2007), igualmente sugerido por Consiglio et al. (2011), Diaz-Prado et al. (2011) e Uranio et al. (2011), na base da digestão enzimática com tripsina ou colagenase, foi possível neste estudo o isolamento de células com características morfológicas típicas de fibroblastos, aderentes a superfície de cultivo e proliferação indefinida em cultivo. Estas características são similares às observadas e descritas em vários estudos de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (KOLF; CHO; TUAN, 2007; PAPATHANASOPOULOS; GIANNOUDIS, 2008). Em contrapartida, Consiglio et al. (2011), observou que as células epiteliais do âmnio apresentam uma morfologia epitelial poligonal a colunar, o que não foi constatado em cultivos primários do presente estudo. Estes achados sustentam o sucesso de isolamento das MSCs do âmnio de gatos domésticos.

Após 24 horas de cultivo primário, foi observada a presença de inúmeras células tipo fibroblastóide, em intensa atividade mitótica indicada pela presença de células pareadas ou binucleadas. Estas foram extensivamente cultivadas em inúmeras passagens para avaliar o seu perfil de crescimento. A fase inicial foi marcada por uma alta taxa de proliferação a qual registrou ligeira diminuição a partir da quinta e sexta passagem. Portmann-Lanz et al. (2006) e Soncini et al. (2007) reportaram que as células mesenquimais do âmnio e córion sofrem degeneração e morte após quarta a quinta passagem. Contudo, apesar da queda de proliferação registrada, as células se propagaram em inúmeras passagens (acima de P10) mantendo as suas características morfológicas e funcionais. Sugere-se, no entanto que a quando do cultivo e propagação das células progenitoras mesenquimais derivadas dos tecidos fetais devem ser observados condições particulares como meio e densidade de cultivo. Diversos estudos relatam o isolamento e propagação indefinida in vitro desta linhagem celular sem registro de exaustão proliferativa (MARCUS et al., 2008; MAURO et al., 2010; CHEN, J et al., 2011; CONSIGLIO et al., 2011; DIAZ-PRADO et al., 2011). À semelhança dos achados reportados por Uranio et al. (2011) e Consiglio et al. (2011) em células mesenquimais isoladas da membrana amniótica canina e equina respectivamente, o

doubling time destas células tende a aumentar com o aumento da passagem. Resultados contraditórios foram relatados por Hoynowski et al. (2008) ao estudar as células tronco derivadas da matriz do cordão umbilical do equino, no qual registrou uma ligeira queda do DT a partir da P3 o qual se manteve em até por volta da P8.

A análise da viabilidade celular pós-congelamento revelou que em MSCs derivadas do âmnio de gatos domésticos, a viabilidade tende a ser constante variando de 86% (>P6) e 90% (estágios iniciais de cultivo). Em células homólogas caninas Uranio et al. (2011) constatou uma viabilidade em torno dos 89 a 94% sem variação significativa ao longo da passagem. Uma queda de cerca de 50% foi registrado no mesmo estudo em células mesenquimais caninas derivadas da matriz do cordão umbilical. Estes resultados sustentam a hipótese de que estas células podem ser conservadas a frio por longos períodos em bancos de células para estudos posteriores ou aplicação na terapia celular sem registrar nenhuma depreciação das suas características morfológicas e funcionais.

Outra característica importante observada foi a capacidade que esta linhagem celular tem de formar agregados celular em meio básico de cultivo (unidades formadoras de colônias), com características morfológicas similares a de fibroblastos.

A caracterização imunofenotípica destas células revelou a expressão dos marcadores específicos de células tronco mesenquimais CD73 e CD90. Estes marcadores foram igualmente descritos em MSCs derivadas da medula óssea (MARTIN et al., 2002). Em contrapartida, não foi observado na imunocitoquímica nenhuma marcação para os antígenos específicos de células hematopoiéticas, CD34, CD45 e CD79. O padrão de expressão foi similar em análise em citometria do fluxo, tanto em MSCs derivadas do âmnio de gatos domésticos bem como em células controlo derivadas do tecido adiposo humano. Este padrão de expressão dos marcadores observado neste estudo é condizente aos achados publicados em vários estudos descrevendo células tronco isoladas de várias regiões da placenta (MIAO et al, 2006; PORTMANN-LANZ et al., 2006; SONCINI et al., 2007; STEIGMAN; FAUZA, 2007; GUCCIARDO et al., 2008; HOYNOWSKI et al., 2008; YOU et al., 2008; DIAZ-PRADO et al., 2010; HUO; SHI; PANG, 2010; MIHU et al., 2009; CHEN, J et al., 2011; DIAZ-PRADO et al., 2011). Os resultados confirmam o sucesso no isolamento da membrana amniótica de gatos domésticos sem contaminação com células hematopoiéticas. Para além da sua natureza avascular, as células mesodérmicas do âmnio tem uma natureza fetal primitiva e não hematopoiética, e preservam as características mesenquimais típicas dos seus progenitores. Contudo, foi observado resultado contraditório com a imunomarcação do CD34 em células mesenquimais do âmnio de gatos domésticos (47%) sugerindo

inespecificidade do anticorpo primário com a espécie felina ou a modificações da expressão dos marcadores de membrana que ocorrem com aumento da passagem de cultivo como foi igualmente reportado por Consiglio et al. (2011) e Iacono et al. (2012). Esta constatação sugere também que as células amnióticas possuem um alto potencial angiogênico (ALVIANO et al., 2007).

Nos últimos anos, as células tronco mesenquimais derivadas membrana amniótica tornaram-se a maior atração para a medicina regenerativa devido ao seu fácil acesso e por possuírem propriedades imunomoduladoras. Além disso, são conotadas por possuírem uma elevada taxa de proliferação e capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens específicas. Na presença de estímulos específicos, foi possível no presente estudo a indução da diferenciação *in vitro* das células mesenquimais derivadas do âmnio de gatos domésticos em linhagem específica osteogênica e adipogênica. Estes resultados sustentam a presença de células mesenquimais progenitoras. A capacidade de propagação indefinida em cultivo com retenção da capacidade de diferenciação em linhagem mesenquimal foi igualmente reportado em vários estudos em células isoladas do âmnio de humanos (SONCINI et al., 2007; CHANG et al., 2010; HUO; SHI; PANG, 2010; DIAZ-PRADO et al., 2011), equinos (CONSIGLIO et al., 2011), ratos (MARCUS et al., 2008) e em diferentes regiões da placenta de caninos (URANIO et al., 2011).

Nos últimos dias tem se registrado grandes avanços em medicina regenerativa focalizando o estudo de células tronco e desenvolvimento de técnicas para a regeneração de tecidos, órgãos irremediavelmente lesados ou para restituição terapêutica de partes não funcionais do organismo. Para tal é imprescindível dispor de células tronco com alta taxa de propagação e alto potencial para se diferenciar em múltiplas linhagens específicas. Neste estudo foi possível isolar com sucesso as células tronco mesenquimais derivadas da membrana do âmnio de gatos domésticos. Para além da sua alta capacidade proliferativa que as restantes células mesenquimais, elas são dotadas de propriedades imunomoduladoras e propriedades primitivas o que as torna acessíveis para serem usadas na regeneração de órgãos e tecidos bem como em transplantes alogênicos. Ademais, as membranas fetais são descartadas normalmente após o nascimento, podendo ser usadas para isolamento desta linhagem celular com eficiência sem levantar quaisquer questões de ordem ética e sem recurso a procedimentos contundentes. A membrana do âmnio tem sido usada para o tratamento de várias desordens com destaque a feridas por queimaduras graves e úlceras. O estabelecimento de um banco de células mesenquimais do âmnio providenciará uma maior

disponibilidade de células para pesquisa da sua viabilidade terapêutica para tratamento com eficiência de diversas patologias em modelos animais.

Entretanto, após inoculação em camundongos imunodeficientes não foi registrado formação de teratomas. A não formação de teratomas é o fator mais importante e vantajoso para aplicação de células tronco em medicina regenerativa.

Os carnívoros possuem uma grande similaridade nas doenças genéticas e degenerativas e podem ser facilmente manipulados garantindo uma condução de experimentos com alta segurança.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

A membrana amniótica de gatos domésticos apresenta células mesenquimais com características morfológicas e fenotípicas típicas de células progenitoras, capazes de se propagar indefinidamente em cultivo sem alterar as suas qualidades funcionais e de se diferenciar em múltiplas linhagens específicas.

O protocolo seguido mostrou-se viável para o isolamento com eficiência das células tronco mesenquimais da membrana amniótica.

Esta linhagem celular reage a marcadores específicos das MSCs e apresentam alta capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens em determinadas condições.

As células mesenquimais de âmnio de gato doméstico, no último terço de gestação não são carcinogênicos, abrindo a possibilidade de sua coleta e uso após o parto normal ou cesárea.

O presente estudo incrementa o nosso conhecimento em relação à origem e potencial das células mesenquimais derivadas do âmnio de gatos domésticos, constituindo uma fonte bastante promissora de células para a medicina regenerativa.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDULRAZZAK, H.; MOSCHIDOU, D.; JONES, G.; GUILLOT, P. V. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, p. S689-S706, Dec 6 2010. ISSN 1742-5689.

ABREU, S. C.; ANTUNES, M. A.; PELOSI, P.; MORALES, M. M.; ROCCO, P. R. M. Mechanisms of cellular therapy in respiratory diseases. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1421-1431, Sep 2011. ISSN 0342-4642.

ALDAHMASH, A.; ZAHER, W.; AL-NBAHEEN, M.; KASSEM, M. Human stromal (mesenchymal) stem cells: Basic biology and current clinical use for tissue regeneration. **Annals of Saudi Medicine**, v. 32, n. 1, p. 68-77, Jan-Feb 2012.

ALVIANO, F.; FOSSATI, V.; MARCHIONNI, C.; ARPINATI, M.; BONSI, L.; FRANCHINA, M.; LANZONI, G.; CANTONI, S.; CAVALLINI, C.; BIANCHI, F.; TAZZARI, P. L.; PASQUINELLI, G.; FORONI, L.; VENTURA, C.; GROSSI, A.; BAGNARA, G. P.Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. **Bmc Developmental Biology**, v. 7, Feb 21 2007.

BAE, K. S.; PARK, J. B.; KIM, H. S.; KIM, D. S.; PARK, D. J.; KANG, S. J. Neuron-like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 401-412, May 1 2011.

BARACHETTI, L.; GIUDICE, C.; MORTELLARO, C. M. Amniotic membrane transplantation for the treatment of feline corneal sequestrum: pilot study. **Veterinary Ophthalmology**, v. 13, n. 5, p. 326-330, Sep 2010.

BIANCHI, G.; MURAGLIA, A.; DAGA, A.; CORTE, G.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. **Wound Repair Regeneration**, v. 9, n. 6, p. 460-466, 2001.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P. G. Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells,** v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. **Nature,** v. 414, n. 6859, p. 118-121, Nov 01 2001.

BITTENCOURT, R. A. C.; PEREIRA, H. R.; FELISBINO, S. L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A. P. E.; DEFFUNE, E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. **Acta Ortopédica. Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 22-24, 2006.

BOURNE, G. The foetal membranes. a review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. **Postgraduate Medical Journal,** v. 38, p. 193-201, 1962.

BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v. 31, n. 1, p. 25- 35, 2009.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica,** v. 44, n. 4, p. 215-230, 2006 2006.

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,** v. 192, n. 2, p. 93-105, 2010

CHEN, J.; LU, Z.; CHENG, D.; PENG, S.; WANG, H. Isolation and characterization of porcine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. **Plos One,** v. 6, n. 5, May 19 2011.

CHEN, Z.; LU, X. C. M.; SHEAR, D. A.; DAVE, J. R.; DAVIS, A. R.; EVANGELISTA, C. A.; DUFFY, D.; TORTELLA, F. C. Synergism of human amnion-derived multipotent progenitor (AMP) cells and a collagen scaffold in promoting brain wound recovery: Pre-clinical studies in an experimental model of penetrating ballistic-like brain injury. **Brain Research,** v. 1368, p. 71-81, Jan 12 2011.

CHU, P. G.; ARBER, D. A. CD79: A Review. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 9, n. 2, p. 97-106, Jun 2001.

COLGAN, S. P.; ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T.; THOMPSON, L.F. Physiological roles for ecto-50-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal**, v. 2, n. 2, p. 351–360, Jun 2006.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications,** v. 33, n. 8, p. 811-821, Dec 2009.

CONSIGLIO, A. L.; 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**, Set 2011. Pré-print.

DE COPPI, P.; BARTSCH JR., G.; SIDDIQUI, M. M.; XU, T.; SANTOS, C. C.; PERIN, L.; MOSTOSLA,V. S. K. Y. G.; SERRE, A. C.; SNYDER, E. Y.; YOO, J. J.; FURTH, M. E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology,** v. 25, n. 1, p. 100-106, Jan 2007.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology,** v. 28, n. 8, p. 875-884, Aug 2000.

DEV, K.; GIRI, S. K.; KUMAR, A.; YADAV, A.; SINGH, B,; GAUTAM, S. K. Derivation, characterization and differentiation of buffalo (bubalus bubalis) amniotic fluid derived stem cells. **Reprodution in Domestic Animals**, Nov 2011. Pré-print.

DHALL, K. Amnion graft for treatment of congenital absence of the vagina. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology,** v. 91, n. 3, p. 279-282, 1984.

DIAZ-PRADO, S.; MUINOS-LOPEZ, E.; HERMIDA-GOMEZ, T.; ESTHER RENDAL-VAZQUEZ, M.; FUENTES-BOQUETE, I.; DE TORO, F. J.; BLANCO, F. J. Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane. **Journal of Cellular Biochemistry,** v. 111, n. 4, p. 846-857, Nov 1 2010.

_____. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. **Tissue Engineering Part C-Methods,** v. 17, n. 1, p. 49-59, Jan 2011.

DUA, H. S.; GOMES, J. A. P.; KING, A. J.; MAHARAJAN, V. S. The amniotic membrane in ophthalmology. **Survey of Ophthalmology,** v. 49, n. 1, p. 51-77, Jan-Feb 2004.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology,** v. 18, n. 6, p. 877-891, Dec 2004.

FERNANDES, R. A.; WENCESLAU, C. V.; REGINATO, A. L.; KERKIS, I.; MIGLINO, M. A. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation. **Placenta,** Mar 2012. Pré-print.

GATTEGNO-HO, D,; ARGYLE, S. A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. **The Veterinary Journal,** v. 191, n. 1, p. 19–27, Jan 2012.

GHARIB, M.; URE, B. M.; KLOSE, M. Use of amniotic grafts in the repair of gastroschisis. **Pediatric Surgery International,** v. 11, n. 2-3, p. 96-99, Feb 1996.

GRASSEL, S.; AHMED, N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4946-4956, Sep 1 2007.

GUCCIARDO, L.; LORIES, R.; OCHSENBEIN-KÖLBLE, N.; DONE, E.; ZWIJSEN, A.; DEPREST, J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. **An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 116, n. 2, p. 166–172, 2009.

HANSON, C.; CAISANDER, G. Human embryonic stem cells and chromosome stability. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 11-12, p. 751-755, Nov 2005.

HAYASHI, Y.; TSUJI, S.; TSUJII, M.; NISHIDA, T.; ISHII, S.; IIJIMA, H.; NAKAMURA, T.; EGUCHI, H.; MIYOSHI, E.; HAYASHI, N.; KAWANO, S. Topical transplantation of mesenchymal stem cells accelerates gastric ulcer healing in rats. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 778–786. Jan 2008.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood,** v. 102, n. 10, p. 3483-3493, Nov 15 2003.

HOYNOWSKI, S. M.; FRY, M. M.; GARDNER, B. M.; LEMING, M. T.; TUCKER, J. R.; BLACK, L.; SAND, T.; MITCHELL, K.E. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells (vol 362, pg 347, 2007). **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 373, n. 1, p. 177-177, Aug 15 2008.

HUO, S.; SHI, P.; PANG, X. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. **Chinese Medical Sciencs Journal,** v. 25, n. 4, p. 211-214, December 2010.

IACONO, E.; CUNTO, M.; ZAMBELLI, D.; RICCI, F.; TAZZARI, P. L.; MERLO, B. Could fetal fluid and membranes be an alternative source for Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in the feline species? A preliminary study. **Veterinary Research Communications**, v. 36, n. 2, p. 107‑118, Jun 2012.

ILANCHERAN, S.; MICHALSKA, A.; PEH, G.; WALLACE, E. M.; PERA, M.; MANUELPILLAI, U. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. **Biology of Reproduction,** v. 77, n.3, p. 577–588. May 2007.

INSAUSTI, C. L.; ALCARAZ, A.; GARCIA-VIZCAINO, E. M.; MROWIEC, A.; LOPEZ-MARTINEZ, M. C.; BLANQUER, M.; PINERO, A.; MAJADO, M. J.; MORALEDA, J.M.; CASTELLANOS, G.; NICOLAS, F.J. Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. **Wound Repair and Regeneration,** v. 18, n. 4, p. 368-377, Jul-Aug 2010.

JIANG, Y. H.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J. B.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature,** v. 418, n. 6893, p. 41-49, Jul 4 2002.

KALPRAVIDH, M.; TUNTIVANICH, P.; VONGSAKUL, S.; SIRIVAIDYAPONG, S. Canine amniotic membrane transplantation for corneal reconstruction after the excision of dermoids in dogs. **Veterinary Research Communications,** v. 33, n. 8, p. 1003-1012, Dec 2009.

KLEIN, J. D.; TURNER, C. G. B.; STEIGMAN, S. A.; AHMED, A.; ZURAKOWSKI, D.; ERIKSSON, E.; FAUZA, D. O. Amniotic mesenchymal stem cells enhance normal fetal wound healing. **Stem Cells and Development,** v. 20, n. 6, p. 969-976, Jun 2011.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells - Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy,** v. 9, n. 1, 2007.

KRAUSE, D. S.; FACKLER, M. J.; CIVIN, C. I.; MAY, W. S. CD34: Structure, biology, and clinical utility. **Blood**, v. 87, n. 1, p. 1-13, Jan 1996.

KUIJK, E. W.; LOPES, S. M. C. S.; GEIJSEN, N.; MACKLON, N.; ROELEN, B. A. J. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update,** v. 17, n. 2, p. 254-271, Mar-Apr 2011.

LEE, S. H.; TSENG, S. C. G. Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. **American Journal of Ophthalmology,** v. 123, n. 3, p. 303-312, Mar 1997.

LIANG, L.; LI, W.; LING, S.; SHEHA, H.; QIU, W.; LI, C.; LIU, Z. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. **Clinical and Experimental Ophthalmology,** v. 37, n. 9, p. 855-863, Dec 2009.

LIN, G. L.; HANKENSON, K. D. Integration of BMP, Wnt, and Notch Signaling Pathways in Osteoblast Differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry,** v. 112, n. 12, p. 3491-3501, Dec 2011a.

LUNA, N. Stem cells: basic research on health, from ethics to panacea. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, v. 11, n. 23, p. 1-8, 2007.

MAITRA, A.; ARKING, D. E.; SHIVAPURKAR, N.; IKEDA, M.; STASTNY, V.; KASSAUEI, K.; SUI, G. P.; CUTLER, D. J.; LIU, Y.; BRIMBLE, S. N.; NOAKSSON, K.; HYLLNER, J.; SCHULZ, T. C.; ZENG, X. M.; FREED, W. J.; CROOK, J.; ABRAHAM, S.; COLMAN, A.; SARTIPY, P.; MATSUI, S. I.; CARPENTER, M.; GAZDAR, A. F.; RAO, M.; CHAKRAVARTI, A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. **Nature Genetics,** v. 37, n. 10, p. 1099-1103, Oct 2005.

MANOCHANTR, S.; TANTRAWATPAN, C.; KHEOLAMAI, P.; U-PRATYA, Y.; SUPOKAWEJ, A.; ISSARAGRISIL, S. Isolation, characterization and neural differentiation potential of amnion derived mesenchymal stem cells. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v. 93, n. 7, p. S183-91, Dec 2010.

MANUELPILLAI, U.; MOODLEY, Y.; BORLONGAN, C. V.; PAROLINI, O. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis?. **Placenta,** v. 32, n. 4, p. S320eS325, Oct 2011.

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,** v. 76, n. 2, p. 130-144, Feb 2008.

MARONGIU, F.; GRAMIGNOLI, R.; DORKO, K.; MIKI, T.; RANADE, A. R.; SERRA, M. P.; DORATIOTTO, S.; SINI, M.; SHARMA, S.; MITAMURA, K.; SELLARO, T. L, TAHAN, V.; SKVORAK, K. J.; ELLIS, E. C. S.; BADYLAK, S. F.; DAVILA, J. C.; HINES, R.; LACONI, E.; STROM, S. C. Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. **Hepatology,** v. 53, n. 5, p. 1719-1729, May 2011.

MARTIN, D.R.; COX, N. R.; HATHCOCK, T. L.; NIEMEYER, G. P.; BAKER, H. J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology,** v. 30, n. 8, p. 879-886, Aug 2002.

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,** v. 34, p. S25-S28, Jun 2010.

McBEATH, R.; PIRONE, D. M.; NELSON, C. M.; BHADRIRAJU, K.; CHEN, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. **Developmental Cell,** v. 6, n. 4, p. 483-495, Apr 2004.

MEHENDALE, R. A.; DAGI, L. R. Amniotic membrane implantation to reduce extraocular muscle adhesions to a titanium implant. **Journal of Aapos,** v. 15, n. 4, p. 404-406, Aug 2011.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International,** v. 30, n. 9, p. 681-687, Sep 2006.

MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MARTINS, D. D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER. R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology,** v. 66, n. 6-7, p. 1699-1702, Oct 2006.

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

MIKI, T.; STROM, S. C. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. **Stem Cell Reviews,** v. 2, n. 2, p. 133-141, Jun 2006.

MOODLEY, Y.; ILANCHERAN, S.; SAMUEL, C.; VAGHJIANI, V.; ATIENZA, D.; WILLIAMS, E. D.; JENKIN, G.; WALLACE, E.; TROUNSON, A.; MANUELPILLA, U. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine,** v. 182, n. 5, p. 643-651, Sep 1 2010.

MURALIDHARAN, S.; GU, J.; LAUB, G. W.; CICHON, R.; DALOISIO, C.; McGRATH, L. B. A new biological membrane for pericardial closure. **Journal of Biomedical Materials Research,** v. 25, n. 10, p. 1201-1209, Oct 1991.

NIKNEJAD, H.; PEIROVI, H.; JORJANI, M.; AHMADIANI, A.; GHANAVI, J.; SEIFALIAN, A. M. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. **European Cells & Materials,** v. 15, p. 88-99, Jan-Jun 2008.

PAN, H. C.; YANG, D. Y.; CHIU, Y. T.; LAI, S. Z.; WANG, Y. C.; CHANG, M. H.; CHENG, F. C. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. **Journal of Clinical Neuroscience,** v. 13, n. 5, p. 570-575, Jun 2006.

PAPATHANASOPOULOS, A.; GIANNOUDIS, P. V. Biological considerations of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells. **Injury-International Journal of the Care of the Injured,** v. 39, p. S21-S32, Sep 2008.

PLUMMER, C. E.; OLLIVIER, F.; KALLBERG, M.; BROOKS, D.; BARRIE, K.; UTTER, M.; GELATT, K. The use of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction: a review and series of 58 equine clinical cases (2002-2008) (vol 12, pg 17, 2009). **Veterinary Ophthalmology,** v. 14, n. 2, p. 142-142, Mar 2011.

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 preand perinatal neuroregeneration. **American Journal of Obstetrics & Gynecology,** v. 194, n. 3, p. 664–673. Mar 2006.

REHNI, A. K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S.; SINGH, M. Amniotic fluid derived stem cells ameliorate focal cerebral ischaemia-reperfusion injury induced behavioural deficits in mice. **Behavioural Brain Research,** v. 183, n. 1, p. 95-100, Oct 1 2007.

RENNEKAMPFF, H. O.; DOHRMANN, P.; FÖRY, R.; FÄNDRICH, F. Evaluation of amniotic membrane as adhesion prophylaxis in a novel surgical gastroschisis model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 7, n. 3, p. 187– 93, May 1994.

SAKURAGAWA, N.; KAKINUMA, K.; KIKUCHI, A.; OKANO, H.; UCHIDA, S.; KAMO, I.; KOBAYASHI, M.; YOKOYAMA, Y. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. **Journal of Neuroscience Research,** v. 78, n. 2, p. 208-214, Oct 15 2004.

SCHNEIDER, P. R. A.; BUHRMANN, C.; MOBASHERI, A.; MATIS, U.; SHAKIBAEI, M. Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research,** v. 29, n. 9, p. 1351-1360, Sep 2011.

SEMB, H. Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 11-12, p. 743-750, Nov 2005. ISSN 0903-4641.

SEO, M. S.; JEONG, Y. H.; PARK, J. R.; PARK, S. B.; RHO, K. H.; KIM, H. S.; YU, K. R.; LEE, S. H.; JUNG, J. W.; LEE, Y. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science,** v. 10, n. 3, p. 181-187, Sep 2009.

SHEHA, H.; HASHEM, H.; LIANG, L.; RAMZY, M.; ZAKI, A. Amniotic membrane extract for acute ocular chemical burns. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 427-433, 2010.

SILVA, E. A pesquisa de células-tronco no brasil. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 21, p. 4-7, 2001.

SHINYA, M.; KOMURO, H.; SAIHARA, R.; URITA, Y.; KANEKO, M.; LIU, Y. Neural differentiation potential of rat amniotic epithelial cells. **Fetal and Pediatric Pathology,** v. 29, n. 3, p. 133-143, 2010.

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

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. Manual de instrução programada: princípios de hematologia e hemoterapia. **Educação Continuada em Biomedicina e Biotecnologia**. p. 1-14, 2005.

STEIGMAN, S. A.; FAUZA, D. O. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Fluid and Placenta. **Current Protocols in Stem Cell Biology,** Unit.1E.2.1-1E.2.12, June 2007.

STRUBE, Y. N. J.; CONTE, F.; FARIA, C.; YIU, S.; WRIGHT, K. W. Amniotic membrane transplantation for restrictive strabismus. **Ophthalmology,** v. 118, n. 6, p. 1175-1179, Jun 2011.

TAMAGAWA, T.; OI, S.; ISHIWATAI, I.; ISHIKAWA, H.; NAKAMURA, Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. **Human Cell,** v. 20, n. 3, p. 77-84, Aug 2007.

TIEDEMANN, K. The amniótica, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. **Anatomy and Embryology,** v. 158, p. 75-94, 1979.

TROWBRIDGE, I. S.; THOMAS, M. L. CD45: An emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 85-116, 1994.

TSUJI, H.; MIYOSHI, S.; IKEGAMI, Y.; HIDA, N.; ASADA, H.; TOGASHI, I.; SUZUKI, J.; SATAKE, M.; NAKAMIZO, H.; TANAKA, M.; MORI, T.; SEGAWA, K.; NISHIYAMA, N.; INOUE, J.; MAKINO, H.; MIYADO, K.; OGAWA, S.; YOSHIMURA, Y.; UMEZAWA, A. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. **Circulation Research,** v. 106, n. 10, p. 1613-1623, May 28 2010.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; CONSIGLIO, A, L.; 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,** v. 78, n. 5, p. 361-373, May 2011.

VALENTINI, L.; URANIO, M. F.; CONSIGLIO, A. L.; GUARICCI, A. C.; CAIRA, M.; VENTURA, M.; L'ABBATE, A.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, and characterization of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix in the dog. **Reproduction Fertility and Development,** v. 23, n. 1, p. 252-253, 2011 2011.

VOSDOGANES, P.; HODGES, R. J.; LIM, R.; WESTOVER, A. J.; ACHARYA, R. Y.; WALLACE, E. M.; MOSS, T. J. M. Human amnion epithelial cells as a treatment for inflammation-induced fetal lung injury in sheep. **American Journal of Obstetrics and Gynecology,** v. 205, n. 2, Aug 2011.

YOU, Q.; CAI, L.; ZHENG, J.; TONG, X.; ZHANG, D.; ZHANG, Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. **International Journal of Gynecology & Obstetrics,** v. 103, n. 2, p. 149-152, Nov 2008.

YOUNG, R. L.; COTA, J.; ZUND, G.; MASON, B. A.; WHEELER, J. M. The use of an amniotic membrane graft to prevent postoperative adhesions. **Fertility and Sterility,** v. 55, n. 3, p. 624-628, Mar 1991.

ZHANG, D.; JIANG, M.; MIAO, D. Transplanted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in mouse. **Plos One,** v. 6, n. 2, Feb 4 2011.

ZHAO, P.; ISE, H.; HONGO, M.; OTA, M.; KONISHI, I.; NIKAIDO, T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. **Transplantation,** v. 79, n. 5, p. 528-535, Mar 15 2005.