CAROLINE PINHO WINCK

**Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana
amniótica canina em diferentes estágios gestacionais**

São Paulo

2012

CAROLINE PINHO WINCK

**Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica
canina em diferentes estágios gestacionais**

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão
Braga

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2719
FMVZ

Winck, Caroline Pinho

Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em
diferentes estágios gestacionais / Caroline Pinho Winck. -- 2012.
73 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: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Células-tronco. 2. Membrana amniótica. 3. Cão. 4. Terapia celular. I. Título.

WINCK, C. P. Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha	4º	73 f.	68 f.
catalográfica

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estabelecimento e caracterização de células-tronco de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais", protocolado sob o nº 2810/2012, utilizando 2 (dois) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Establishment and characterization of stem cells from the amniotic membrane of dog in diferente gestational stages", protocol number 2810/2012, utilizing 2 (two) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WINCK, Caroline Pinho

Título: Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Rosane, meus avós Lourdes e Augusto e meu irmão Caio. Pois sem seu apoio incondicional dos que amo, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dr.^a Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga pelo aprendizado que me foi passado e orientação.

À minha co-orientadora Dr.^a Graciela Pignatari pelo aprendizado, orientação e ensinamentos que me foram passados para que este trabalho pudesse ser concretizado.

À Prof.^a.Dr.^a. Maria Angélica Miglino por abrir as portas do departamento para que meu mestrado fosse realizado.

Aos meus colegas Fabiele Russo, Isabela Fernandes, João Leonardo Mendonça Dias e Leandro Rui pelo companheirismo e ajuda para a realização dessa dissertação.

Às IC Jeniffer Farias pela amizade, carinho, ajuda e toda atenção que sempre pude contar.

À IC Thais Trevisan e Gabriele Miranda por toda a ajuda que nos deu para que esse trabalho pudesse ser finalizado.

Aos funcionários Jaqueline, Maincon, Bernadete, Paula, Ronaldo e todos mais que de alguma forma contribuíram no dia a dia para a realização do meu trabalho.

Ao IPEN e seus funcionários pelo cuidado e fornecimento dos animais para a realização de nossa pesquisa.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos Marcos Vinicius Mendes Silva e Silvia Amélia Ferreira Lima pelo apoio, motivação e ajuda para a realização desta dissertação.

Ao meu namorado Leonardo Barros Vigena pela compreensão, motivação e paciência em todas as horas.

Às minhas melhores amigas Barbara Flaire e Amanda de Sá pelos conselhos, motivação e por ouvir minhas aflições.

E por fim agradeço a toda minha família, pais, avós, tios, tias e irmão que foram essenciais para que pudesse dar mais esse grande passo.

“Em minhas preces de todo dia, sempre peço coragem e paciência. Coragem para continuar superando as dificuldades do caminho naqueles que não me compreendem. E paciência, para não me entregar ao desânimo diante das minhas fraquezas.”

(Chico Xavier)

RESUMO

WINCK, C.P. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais**. [Establishment and characterization of stem cells from fetal canine amniotic membrane at different stages of gestation]. 2012. 68f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A membrana amniótica é uma membrana translúcida sendo a membrana mais interna da cavidade amniótica, formada por uma monocamada de células epiteliais disposta sobre uma membrana basal. Com o crescente interesse na utilização de células-tronco provenientes de anexos fetais, esta se torna uma promissora fonte de células-tronco. Sendo assim em trabalho anterior realizado pelo nosso grupo tivemos como objetivo, o estabelecimento da cultura celular e caracterização das células-tronco fetais de membrana amniótica de cão para verificar se a mesma pudesse ser uma nova fonte celular a ser usada nos protocolos de terapia celular, uma vez que os cães têm sido considerados modelos animais atraentes para avaliar novas drogas ou realizar ensaios pré-clínicos. As células de membrana amniótica obtidas a partir do trabalho anterior foram caracterizadas *in vitro*, observando-se características semelhantes a outras células-tronco mesenquimais. Porém, quando foi analisado o seu potencial carcinogênico observamos a formação de um tumor de crescimento rápido, aproximadamente um mês, após o inóculo dessas células em 10 camundongos imunossuprimidos nude, sendo o tumor identificado histologicamente como um carcinoma embrionário. Diante deste comportamento acreditamos ser de extrema importância analisar células provenientes de novas coletas verificando se as mesmas podem se comportar como as anteriormente estudadas. Com isso, temos como objetivo deste trabalho estabelecer e caracterizar as células provenientes de duas novas coletas em diferentes períodos gestacionais visando verificar se estas células se comportam da mesma que as anteriores isso é se quando inoculadas nos animais formam tumor e assim poder ter certeza de que essas células são ou não, boas alternativas para terapia celular. As células obtidas nestas novas coletas têm características de células-tronco mesenquimais expressando alguns marcadores, tem curva de crescimento semelhante às células-tronco mesenquimais, se aderem ao plástico e se diferenciaram em adipócitos. Diferentemente das células obtidas no estudo anterior estas células não geraram tumor quando injetadas em camundongos imunossuprimidos, nude em até 60 dias após inoculação.

Palavras-chave: Células-tronco. Membrana amniótica. Cão. Terapia celular.

ABSTRACT

WINCK, C.P. **Establishment and characterization of stem cells from fetal canine amniotic membrane at different stages of gestation.** [Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica canina em diferentes estágios gestacionais]. 2012. 68f Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Amniotic membrane is a membrane translucent with the inner membrane of the amniotic cavity, formed by a monolayer of epithelial cells disposed on a basal membrane. With the growing interest in the use of stem cells from fetal membranes, this becomes a promising source of stem cells. So in a previous study conducted by our group we aim, the establishment of cell culture and characterization of fetal stem cells from amniotic membrane from dog to see if it could be a new source cell to be used in cell therapy protocols, Once the dogs have been considered attractive animal models to evaluate new drugs or performing pre-clinical tests. The cells from amniotic membrane obtained from previous work were characterized in vitro, observing characteristics similar to other mesenchymal stem cells. But when it was analyzed its its carcinogenic potential observed the formation of a fast-growing tumor, approximately one month after inoculation of these cells into immunocompromised nude mice 10, and the tumor identified histologically as embryonal carcinoma. Given this behavior we believe is extremely important to analyze cells from new collections by checking if the same can behave like those previously studied. With this, we aim of this work to establish and characterize the cells from two new collections at different gestational periods to verify whether these cells behave the same as the previous ones is that when inoculated into animals form tumor and thus be able to make sure that these cells are either not good alternatives for cell therapy. The cells obtained in these new collections has characteristics of mesenchymal stem cells expressing some markers, growth curve is similar to mesenchymal stem cells, adhere to plastic and differentiated into adipocytes. Unlike the cells obtained in the previous study these cells did not generate tumors when injected into immunocompromised mice, nude within 60 days after inoculation.

Keywords: Amniotic membrane. Dog. Cellular therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotomicrografia do das células-tronco de membrana amniótica 40d e 50d obtidas pelo método de digestão enzimática utilizando collagenase I.....	33
Figura 2- Cultura de células de membrana amniótica 40d.....	34
Figura 3- Cultura de células de membrana amniótica de 50d.....	35
Figura 4 - Fotomicrografia de coloração de HE das células-tronco de membrana amniótica 40d.....	38
Figura 5 - Fotomicrografia de coloração HE das células-tronco de membrana amniótica 50 d	38
Figura 6- Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina de células-tronco de membrana amniótica 40d.....	39
Figura 7 - Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina de células-tronco de membrana amniótica 50d.....	39
Figura 8 – Análise do perfil de expressão de marcadores mesenquimais das células de membrana amniótica de 40 d.....	41
Figura 9 - Analise do perfil de expressão de marcadores de pluripotencia das células de membrana amniótica de 40d.....	42
Figura 10 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 e vimentina das células-tronco de membrana amniótica 40d.....	43
Figura 11 - Análise do perfil de expressão de marcadores mesenquimais das células de membrana amniótica 50d.....	44
Figura 12 - Análise do perfil de expressão de marcadores de pluripotencia das células de membrana amniótica 50d.....	45
Figura 13 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 e vimentina das células-tronco de membrana amniótica 50d.....	46
Figura 14 – Fotomicrografia da diferenciação em adipócitos das células-tronco de membrana amniótica 40d após coloração com <i>oil red</i>	47
Figura 15 – Fotomicrografia da diferenciação em adipócitos das células-tronco de membrana amniótica 50d após coloração com <i>oil red</i>	47
Figura 16 – Fotomicrografia da diferenciação em osteócitos das células de membrana amniótica 40d após coloração com alizarina red.....	48

Figura 17 – Fotomicrografia da diferenciação em osteócitos das células de membrana amniótica 50d após coloração com alizarina red.....	48
Figura 18 – Fotomicrografia da Diferenciação em condrócitos das células-tronco de membrana amniótica 40d.....	49
Figura 19 – Fotomicrografia da diferenciação em condrócitos das células-tronco de membrana amniótica 50d.....	49
Figura 20 – Análise macroscópica da região do inóculo de células-tronco de membrana amniótica 40d.....	50
Figura 21 – Análise macroscópica da região do inóculo de células de membrana amniótica de 50d.....	51
Figura 22 – Análise macroscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula-tronco de membrana amniótica 40 d e 50d.....	51
Figura 23 – Análise microscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula de membrana amniótica de 40d e 50d.....	52
Figura 24 – Análise microscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula de membrana amniótica de 40d e 50d.....	53
Figura 25 – Fotomicrografia da membrana amniótica de 40 dias após coloração com HE.....	54
Figura 26 – Fotomicrografia da membrana amniótica de 50 dias após coloração com HE.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Ensaio de proliferação das células-tronco de membrana amniótica 40d pelo método colorimétrico de MTT.....	36
Gráfico 2 – Ensaio de proliferação das células-tronco de membrana amniótica 50d pelo método colorimétrico de MTT.....	36

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	JUSTIFICATIVA.....	13
2.	OBJETIVOS.....	14
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1	O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E ORIGEM DA MEMBRANA AMNIÓTICA.....	15
3.2	CÉLULAS-TRONCO.....	16
3.2.3	Células-Tronco e a Membrana Amniótica.....	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1	ANIMAIS.....	22
4.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	22
4.3	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MTT.....	24
4.4	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	25
4.4.1	Caracterização Morfológica.....	25
4.4.1.1	Análise morfológica das células-tronco de membrana amniótica em microscopia de luz.....	25
4.4.1.2	Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e azul de toluidina.....	25
4.4.2	Caracterização Celular.....	26
4.4.2.1	Análise imunocitoquímica das células de membrana amniótica canina.....	26

4.4.3	Caracterização Funcional.....	27
4.4.3.1	Diferenciações adipogênica e osteogênica.....	27
4.4.3.2	Diferenciação condrogênica.....	28
4.5	ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES.....	29
4.5.1	Inoculação das células 40d e 50d nos camundongos imunossuprimidos (nude).....	29
4.5.2	Avaliação macroscópica.....	30
4.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE 40 E 50 DIAS DE GESTAÇÃO.....	30
5.	RESULTADOS.....	32
5.1	OBTENÇÃO E CULTIVOS DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA.....	32
5.2	ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO POR MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MTT.....	35
5.3	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CANINA.....	37
5.3.1	Caracterização Morfológica.....	37
5.3.1.1	Analise morfológica das células de membrana amniótica de cães por coloração de Hematoxilina- Eosina (HE) e Azul de Toluidina..	37
5.3.2	Caracterização Celular.....	40
5.3.2.1	Análise imunocitoquímica das células de membrana amniótica.....	40
5.3.3	Caracterização Funcional.....	46
5.3.3.1	Diferenciação adipogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d.....	46

5.3.3.2 Diferenciação osteogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d.....	48
5.3.3.3 Diferenciação condrogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d.....	49
5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA.....	50
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE 40 DIAS E 50 DIAS DE GESTAÇÃO.....	54
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

O interesse na pesquisa com células-tronco na medicina veterinária cresceu muito nos últimos anos devido ao seu alto potencial na regeneração de tecidos, órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico (VIOLINI et al., 2009). Pesquisas que utilizam animais como modelos experimentais são de extrema importância para a medicina humana, sendo um pré-requisito para sua utilização clínica (BARRY et al., 2010).

As células-tronco se diferem de outras células por serem indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação ilimitada e diferenciação em células maduras (ASAHARA; KAWAMOTO, 2004; TROUNSON; THAKAR; LOMAX; GIBBONS, 2011). A terapia celular com células-tronco pode ser uma estratégia de estudo promissor para doenças que ainda não se tem um tratamento efetivo (KORBLING; ESTROV, 2003).

Com a dificuldade de utilização das células-tronco embrionárias por questões éticas e a limitada plasticidade das células-tronco adultas, as células-tronco fetais aparecem como uma alternativa cujos estudos demonstram apresentarem boa plasticidade e pouco empecilho ético uma vez que essas células são provenientes de tecido extra-embrionários que são descartados após o nascimento, como a membrana amniótica (MARCUS et al., 2008; MIHU et al., 2009).

A membrana amniótica de humanos já foi amplamente caracterizada revelando ser uma boa fonte de células para terapia celular, apresentando marcadores celulares encontrados em células pluripotentes e mesenquimais, sendo suas células capazes de se diferenciarem *in vitro* em osteócitos, adipócitos e condrócitos. Urânio et al (2011) e Park et al (2012) estudaram células-tronco de membrana amniótica provenientes de cães e analisaram que as mesmas se comportam *in vitro* com as mesmas propriedades das células em humanos, com marcação positiva para análise de expressão de células mesenquimais, marcadores de pluripotência e diferenciação adipócitos, osteócitos e condrócitos, mas não realizaram nenhum estudo de comportamento dessas células *in vivo*.

Com base no existente na literatura, verificamos a necessidade de aprofundar os estudos sobre as células-tronco de membrana amniótica de cão e nesse trabalho analisamos duas novas linhagens de células-tronco provenientes de membrana amniótica canina em dois períodos gestacionais distintos avaliando seu comportamento tanto *in vitro* como *in vivo*.

1.1 JUSTIFICATIVA

Os tecidos extra-embrionários surgem nos últimos anos como uma fonte alternativa de células-tronco, uma vez que são facilmente acessíveis a partir de tecidos que são descartados após o nascimento, além disso diversos estudos vem comprovando a alta plasticidade das células provenientes de tecidos extra-embrionários além da presença de alguns marcadores de pluripotência que são expressos em células embrionárias. A membrana amniótica livre de células já é amplamente utilizada para a reconstrução de tecidos lesionados como em queimaduras e reconstituição córnea, e as células-tronco provenientes da membrana amniótica humana vem demonstrando plasticidade e potencial para aplicação na medicina regenerativa. Entretanto, em relação à membrana amniótica de animais pouco se sabe, tornando clara a necessidade de estudos nessa área, visando sua aplicação na medicina veterinária regenerativa.

Em um trabalho anterior intitulado “Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão” protocolado sob o nº 1210/2007, nosso grupo analisou células-tronco de membrana amniótica em dois períodos gestacionais, 35 e 56 dias de gestação e as mesmas demonstraram não serem indicadas para protocolos de Terapia Celular, pois quando injetadas em camundongos imunossuprimidos levaram a formação de um tumor. Sendo assim, neste projeto temos como objetivo dar continuação a este trabalho e isolar novas linhagens provenientes de células-tronco de membrana amniótica em períodos gestacionais distintos visando nos certificar se estas células levam ou não a formação de tumores. Já existem trabalhos recentes demonstrando o isolamento e cultivo das células-tronco de membrana amniótica, porém em nenhum trabalho o potencial carcinogênico foi avaliado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho o objetivo principal foi isolar, caracterizar e testar o potencial carcinogênico de duas novas coletas de células-tronco provenientes de membrana amniótica em diferentes períodos gestacionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Isolar e cultivar células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos de cães.
- Realizar a caracterização morfológica, celular e funcional das células-tronco derivadas da membrana amniótica de fetos de cães.
- Analisar *in vivo* o potencial carcinogênico das células derivadas da membrana amniótica de fetos de cães em camundongos imunossuprimidos nude.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E ORIGEM DA MEMBRANA AMNIÓTICA

O desenvolvimento pré-natal é convencionalmente dividido em duas fases, um período embrionário e um período fetal que termina até o nascimento (LARSEN, 2001; LANGMAN 2005). Inicialmente se tem a fusão dos gametas masculino e feminino resultando em uma célula diploide, sendo chamada de zigoto. Dentro do período de 24 horas o zigoto inicia uma série de divisões resultando em um rápido aumento de células. O zigoto primeiramente se divide em duas células, chamadas de blastômeros, estas células continuam a se dividir até chegar ao estágio de mórula. A mórula é então preenchida por líquidos provenientes da cavidade uterina, formando a blastocoele e consequentemente sendo chamada de blastocisto. Com o aumento do líquido, parte das células são arranjadas em um polo celular, formando uma massa celular interna, chamada de embrioblasto, e uma camada externa chamada de trofoblasto (LANGMAN, 2005). O blastocisto se prende a parede endometrial iniciando proliferação do trofoblasto e sua diferenciação em duas camadas: a camada mais interna chamada de citotrofoblasto e a camada mais externa chamada de sinciciotrofoblasto. Surge então entre o embrioblasto e o trofoblasto uma nova camada, a camada amniótica, simultaneamente a cavidade surge um disco bilaminar conhecido como disco embrionário. Este disco é formado por camadas: o epiblasto, camada de células voltadas para a cavidade amniótica, e o hipoblasto, voltado para a cavidade primitiva. As células epiblasticas mais externas a cavidade amniótica se diferenciam em amnioblastos, que formam uma fina membrana (membrana amniótica) separando-a do citotrofoblasto, sendo ao mesmo tempo responsável pela produção inicial do fluido amniótico (CROSS; WERB; FISHER, 1994). A medida que a gestação evolui, a quantidade de fluido amniótico aumenta e a membrana amniótica fica mais adelgada, sendo ao final da gestação menos celularizada e mais rica em fibras proteicas (LARSEN, 2001). Na espécie canina a formação completa da membrana amniótica se dá no 22º dia. (CONCANNON; TSUTSUI; SHILLE, 2001).

3.2 CÉLULAS-TRONCO

Nós últimos anos, a medicina regenerativa vem se desenvolvendo e abrindo perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças degenerativas onde a utilização de células como fonte de tratamento que permite ao próprio organismo reparar órgãos e tecidos lesados vem chamando grande atenção (PITTENGER et al., 1999; KRAUSE, 2002; BELTRAMI et al., 2003). Com isso, a terapia celular com células-tronco adultas e células-tronco embrionárias dominaram a mídia trazendo alternativas e esperanças a pacientes portadores de doenças incuráveis sem perspectiva de tratamento por métodos convencionais atualmente estabelecidos.

As células-tronco são células indiferenciadas definidas pela capacidade de auto-renovação e diferenciação em células maduras (BOHELER et al., 2002), esta auto renovação é ilimitada o que lhes confere um papel primordial e vital durante o processo de desenvolvimento ao longo da vida (ASAHARA, 2004; TROUNSON, 2011). As células-tronco são classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação, podendo ser divididas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes. As totipotentes são as células capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário ou de anexos embrionários, isso é, gerar qualquer tipo celular; as pluripotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, isso é, são as progenitoras de tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), também chamadas de células-tronco embrionárias; as multipotentes ou adultas são células que podem se diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão e com isso possuem plasticidade limitada e, por fim, as oligopotentes ou unipotentes são as progenitoras de um tipo celular (ZHANG et al., 2006).

As células-tronco embrionárias são células obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto durante a grastulação, essas células foram isoladas pela primeira vez, em 1981, em blastocistos de camundongos, sendo um dos maiores acontecimentos no campo do desenvolvimento biológico (MARTIN, 1981; EVANS, 1989). Contudo, somente anos depois, a equipe do biólogo James Thomson conseguiu isolar células-tronco embrionárias humanas (THOMSON, 1998). O potencial de diferenciação das células-tronco embrionárias está bem caracterizado em camundongos e em humanos, porém, seu uso em terapia celular e em pesquisa tem sido dificultado por questões de histocompatibilidade, segurança e ética

(PEREIRA, 2008). Convém ressaltar que estas células quando injetadas em um animal quase na maioria das vezes forma um teratoma, tornando inapropriada sua utilização em terapia celular.

As células-tronco adultas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos. As primeiras células-tronco adultas identificadas foram às precursoras hematopoiéticas. A maior diferença entre as células-tronco adultas e as células-tronco embrionárias é a restrição que as adultas apresentam quanto à diferenciação, ou seja, são multipotentes, pois só conseguem se diferenciar em alguns tipos celulares (RODRIGUES; FONSECA, 2004), enquanto que as embrionárias são totipotentes. Outro fator que deve ser lembrado aqui é que não há implicações éticas para o uso das células-tronco adultas diferentemente das células-tronco embrionárias.

Algumas pesquisas têm questionado a plasticidade das células-tronco adultas e estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a plasticidade seria o resultado de uma fusão celular em vez de uma diferenciação (TERADA et al., 2002; YING et al., 2002). Em contrapartida, outros têm confirmado a diferenciação *in vivo* de células de medula na ausência de fusão celular (TRAN et al., 2003). Aparentemente estes resultados contraditórios levantam questões importantes quanto ao potencial terapêutico que as células-tronco adultas apresentam e, por isso, a utilização de células-tronco fetais pode oferecer uma série de vantagens terapêuticas em substituição as células-tronco adultas e embrionárias (MARCUS et al., 2008).

Na ultima década houve um crescente interesse no estudo quanto à presença de células-tronco em tecidos fetais como a placenta, córion, membrana amniótica, líquido amniótico e cordão umbilical (FUKUCHI, et al., 2004; MIKI et al., 2005; URANIO, et al., 2011; CREMONESI; CORRADETTI; LANGE, 2011; FERNANDES e al., 2012). Isso ocorre por esses tecidos se apresentam como um grande banco de células uma vez que são rotineiramente descartados durante o parto e podem oferecer muitas vantagens sobre as células-tronco de origem embrionária e adulta (BRUNSTEIN; WAGNER, 2006; GOLDSTEIN; TOREN; NAGLER, 2006), pois apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2005) e uma vez que estão na interface materno-fetal, se tornam mais propícias a transplantes por possuírem uma baixa resposta imunológica (LI et al., 2005; MIHU et al., 2009).

Além de possuírem uma capacidade de diferenciação em células específicas como cardiomiócitos e de estabelecidas propriedades de diferenciação em linhagens osteogênicas,

adipogênicas e condrogênicas (KIM et al.; 2007), as células-tronco derivadas dos anexos fetais preservam características dos tecidos embrionários de onde se originam e muitos estudos indicam que as mesmas exibem algumas características de células-tronco embrionárias como a expressão de alguns marcadores de superfície como Oct-4 e grande capacidade proliferativa sem demonstrar tumorigenicidade. Estas características abriram uma nova perspectiva no estudo da biologia do desenvolvimento e na medicina regenerativa, não só para humanos, mais também para animais (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE, 2011).

As células derivadas do líquido amniótico em humanos, isoladas e cultivadas *in vitro* tem expressado frequentemente marcadores de pluripotencialidade a capacidade de diferenciação em células de linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (PRUSA et al., 2004).

Na medicina veterinária o estudo com células de líquido amniótico provenientes de cães além da diferenciação nessas três linhagens de células , também foi demonstrada sua capacidade de diferenciação em linhagens neurogênicas (FERNANDES et al., 2012). Ainda dentro do estudo com células fetais, estudos da medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação das células derivadas do tecido extravascular do cordão umbilical em células ósseas, da pele, endotélio, hepáticas e em linhagens neurogênicas (XU et al.,2010; ZHANG et al.,2010).

Nosso grupo vem desenvolvendo um grande interesse em investigar células-tronco fetais obtidas a partir de tecidos extraembrionários e verificar sua sua aplicabilidade terapêutica. Um exemplo é o projeto de cultura e caracterização de células do trofoblasto extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo (FERNANDES, 2010). As TEV são um tipo celular singular, que expressam em sua membrana celular moléculas do antígeno leucocitário humano de classe I, tipo G (HLA-G) e que provavelmente participam na manutenção da gestação impedindo o reconhecimento do feto pela mãe, ao invés de expressarem os genes clássicos do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I) e antígenos leucocitários humanos de classe I, tipo A (HLA-A) e tipo B (HLA-B) (FERNANDES, 2010). Além disso, nosso grupo já isolou de células-tronco a partir do saco vitelino de espécies diversas (WENCESLAU et al., 2011; FRANCIOLLI, 2012) e de membrana amniótica (LIMA, 2012).

3.2.3 Células-Tronco e a Membrana Amniótica

A membrana amniótica, ou âmnion, é uma membrana translúcida sendo a membrana mais interna da cavidade amniótica, formada por uma monocamada de células epiteliais dispostas sobre uma membrana basal. Esta membrana basal, por sua vez, encontra-se aderida a uma fina camada de tecido conectivo subjacente (DANFORT; HULL, 1958). Em microscopia a estrutura do tecido pode ser observada como uma monocamada de células cubóides parecidas com as células da epiderme sobre a membrana basal. Este epitélio encontra-se sobre uma camada mesenquimal abundante em colágeno e com poucas células, essas células são predominantemente fibroblastos (MUKAIDA et al., 1977). Ela não possui nervos, músculos ou vasos linfáticos e obtém sua nutrição e oxigênio a partir do fluido coriônico e do líquido amniótico. Uma de suas funções básicas é proporcionar o desenvolvimento do embrião com proteção contra dessecação e um ambiente propício para que o mesmo cresça sem que haja distorção ou pressão de sua estrutura (OKAZAKI et al., 1981).

A membrana amniótica demonstra propriedades anti-inflamatória e antibióticas. Estas propriedades, combinadas com a ausência ou a baixa imunogenicidade levaram ao uso clínico da membrana amniótica como curativo para queimaduras de pele, úlceras nos membros inferiores e diversas lesões oftálmicas. No entanto, nos últimos anos se deu um novo foco de pesquisa quanto à utilização das células derivadas da membrana amniótica, esta surgiu como uma nova fonte de células para terapia celular e medicina regenerativa em transplantes alogênicos e xenogênicos (SAKURAGAWA et al., 2004).

As células de membrana amniótica de humanos foram isoladas pela primeira vez em 2004 por In't Anker et al, que além de isola-las também demonstrou a capacidade de diferenciação para células osteogênicas e adipogênicas (IN'T ANKER et al., 2004). Mais tarde, Lanz et al (2006) apontou a capacidade de diferenciação das células de membrana amniótica para linhagens condrogênicas, miogênicas e neurogênicas (PORTMANN-LANZ et al., 2006). Em 2007, o potencial angiogênico das mesmas foi confirmado por Alviano et al (ALVIANO et al., 2007). É esperado que as células de membrana amniótica tivessem capacidade de diferenciação uma vez que sua origem é do epiblasto que, por sua vez, origina todas as camadas germinativas do embrião (DIWAN; STEVENS, 1976). Esses achados vêm

se comprovando uma vez que essas células possuem capacidade de diferenciação em hepatócitos com a expressão de albumina (TAKASHIMA et al., 2004); cardiomiócitos com a expressão de genes específicos como miosina MLC-2^a, MLC-2^v, cTnI e TNT e expressão de NkX2.5, um fator de transcrição específico para cardiomiócitos que regula a expressão de vários fatores de transcrição na fase de desenvolvimento e diferenciação de cardiomiócitos (TANAKA et al., 1999). Quando aplicadas *in vivo* em ratos diabéticos, após a verificação da capacidade de diferenciação em células- β pancreáticas expressando mRNA da insulina, o nível de glicose no sangue dos animais ficou normalizado até 6 semanas da implantação (NISHIMURA et al., 2006). Em relação a tratamentos de doenças neurológicas, foi observado que as células de membrana amniótica se diferenciam em células neuronais a partir de enxerto intracerebral em ratos com doença de Parkinson, sintetizando e liberando catecolaminas e fatores neutróficos (KARKISHITA et al 2000; UCHIDA et al., 2000).

Ainda comprovando a plasticidade dessas células e, demonstrando que são uma boa alternativa para terapia celular Ismail et al (2009) utilizou células tronco de membrana amniótica para a reconstrução de ducto biliar danificado, as células foram inoculadas em 40 cães e após 6 semanas puderam observar uma camada de endotélio amniótico no local da inoculação.

Além da alta plasticidade dessas células quando diferenciadas ainda em seu estado indiferenciado diversos estudos demonstram que as células de membrana amniótica humana expressam uma gama de marcadores, como marcadores de pluripotência NANOG (TAKASHIMA et al., 2004; MIKI et al., 2005) e Oct-4 (MIKI et al., 2005). Marcadores extra-embrionários como GATA-4, marcadores específicos neurais específicos como nestina (TAKASHIMA et al., 2004; MIKI et al., 2005) e marcadores do antígeno principal de histocompatibilidade HLA (MIHU et al., 2009).

De acordo os estudos anteriormente mencionados, a membrana amniótica pode ser considerada como uma nova e conveniente fonte de células para o uso em terapia celular em humanos, porém pouco existe em relação as células-tronco de membrana amniótica provenientes de animais, sendo que somente nos últimos anos essa fonte de células vem sendo melhor explorada em outras espécies. Marcus et al (2008) iniciou seu estudo com células de membrana amniótica proveniente de ratos, constatando plasticidade celular para células adiposas, ósseas, condrogenicas incluindo células neurais, não havendo rejeição imunológica ou formação tumoral após análises *in vivo* (MARCUS et al., 2008)

Uranio et al (2011) estudou não só as células provenientes da membrana amniótica canina mais também o fluido amniótico e cordão umbilical. Comprovou a expressão positiva de Oct-4 e de marcadores mesenquimais como CD44, CD184 e CD29, além disso, essas células se diferenciaram em osteócitos, adipócitos e condrócitos condizendo com o que já foi estudado anteriormente sobre o potencial das células de membrana amniótica humana *in vivo*, (URANIO et al., 2011). Park et al (2012) também estudou as células provenientes de membrana amniótica canina, observando do mesmo modo a diferenciação em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas além de diferenciação em células neurogênicas. Além disso, ele observou a expressão gênica de marcadores embrionários como Oct-4, Sox-2, NANOG e Klf4 diminuindo conforme o aumento da sua passagem em cultura, e também obteve marcação positiva para marcadores de células-tronco mesenquimais como CD90 e CD105, não realizando nenhum teste *in vivo* com essas células.

Além de estudo com a espécie canina também há estudos com células-tronco derivadas de membrana amniótica em equinos (DE VITA et al., 2010), bovinos (MANN et al., 2012) e aves (GAO et al., 2012), verificando também a presença de marcadores de pluripotência e marcadores característicos de células-tronco mesenquimais.

Como relatado anteriormente nosso grupo isolou células-tronco de membrana amniótica de cães em dois períodos gestacionais e verificou que apesar das células apresentarem características de células-tronco mesenquimais, elas geravam um tumor quando inoculadas em camundongos imunossuprimidos, nude. Apesar de alguns autores já terem isolados célu-tronco de membrana amniótica de cães (URANIO et al., 2011, PARK et al., 2012), nenhum deles estudou o potencial carcinogênico dessas células.

Dessa forma, neste trabalho visamos estudar não só se essas células são células-tronco mesenquimais como também o seu potencial carcinogênico uma vez que, o isolamento de células de diferentes fontes tem como objetivo final sua utilização na Medicina Regenerativa.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a coleta das membranas amnióticas foram utilizadas cadelas prenhas sem raça definida (SRD) provenientes de campanha de castração no Centro de Zoonoses da Cidade de São Paulo (CZSP) submetidas à histerectomia.

Para a avaliação do potencial carcinogênico foram utilizados camundongos imunossuprimidos, nude provenientes do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/USP). Durante o período experimental, os camundongos imunossuprimidos nude, permaneceram alojados em caixas de polipropileno sendo no máximo 2 animais por caixa, providas de bebedouro e comedouro; mantidos em condições ambientais controladas de temperatura (22-24°C) e iluminação (ciclo de 12 horas claro/12 horas escuro); foi fornecida, diariamente, ração comercial e água *ad libitum*.

4.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

As cadelas prenhas provenientes de campanha de castração foram submetidas ao procedimento cirúrgico de histerectomia, e tiveram seu útero contendo os fetos removidos em condições assépticas em centro-cirúrgico no CZSP.

Após a remoção, os úteros gravídicos em condições assépticas foram transportados em tampão fosfato-salina (PBS) contendo 5 % de solução antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), cuidadosamente em gelo até o Laboratório de Células-Tronco (LCT) da FMVZ-USP.

Para a coleta das membranas, o útero foi colocado em fluxo laminar e uma incisão foi realizada. Tendo assim, acesso aos fetos e, conseqüentemente uma remoção cuidadosa da membrana amniótica foi realizada. Os fetos foram preservados e posteriormente foram

realizadas medições para a obtenção da idade gestacional. As medições foram realizadas pela técnica preconizada por Evan e Sack (1973) com auxílio de um paquímetro, da crista nugal até a primeira vértebra sacral, *CROW-RUMP* em com para análise na escala de *Crow-Rump* versus idade gestacional proposta pelo autor acima.

Neste projeto, duas coletas foram realizadas: a primeira proveniente de um útero de 40 dias de gestação e a segunda coleta, realizada com 50 dias de gestação, as mesmas foram nomeadas de acordo com seu período gestacional sendo 40d e 50d. As membranas amnióticas de todos os fetos provenientes destas gestações foram retiradas e colocadas em placas de cultura separadas por períodos gestacionais.

As membranas amnióticas coletadas foram lavadas com PBS contendo 5% de solução de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich) por 5 a 6 vezes. Após lavagem, a membrana amniótica em um primeiro momento foi apenas fragmentada com o auxílio de um bisturi e os fragmentos foram digeridos durante 30 min com colagenase tipo I (1 mg/mL- Invitrogen, CA, USA) com agitações a cada 10 min. Em seguida, a enzima foi inativada com soro fetal bovino e centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min. O precipitado celular formado foi ressuspensionado e distribuído em placas de cultivo de 60 mm contendo em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* alta glicose (DMEM – LGC Biotecnologia, SP, Brasil) suplementado com 20% de soro fetal bovino definido (SFB- Invitrogen), 200 U/mL de penicilina, 200 Ug/mL de estreptomicina e mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida.

Após aproximadamente 24 horas da coleta, as células aderiram na placa assim como os pedaços de tecido remanescentes, a partir desses tecidos as células começaram a se desprender ao redor do mesmo iniciando a cultura de células.

Quando as células atingiam semiconfluência elas foram submetidas ao repique celular. Para tanto, foram lavadas com PBS e posteriormente 0,5 mL de tripsina 0,25% (LGC) foram adicionados. Passado o tempo de incubação de 5 minutos, as células foram levadas ao microscópio óptico para observação do descolamento celular da superfície da placa. Após o descolamento celular total, 2 mL de DMEMs foram adicionados para inativação da tripsina.

Neste momento, a quantidade final de células foi dividida em duas garrafas e 4 mL de meio DMEMs foram adicionados em cada e as células foram mantidas em atmosfera úmida de 5% de CO₂ a 37°C.

Dessa forma, as células foram expandidas para os experimentos seguintes e o repique celular foi realizado conforme necessidade seguindo o protocolo descrito acima.

4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, como descrito por Carmicheal et al. (1987) consiste na redução do MTT (3-[(4,5- dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide] - Sigma), composto de coloração amarela, pela enzima desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta. O formazan uma vez precipitado a 1.000 rpm por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofotometria a 550 nm.

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das células-tronco de membrana amniótica 40 dias e 50 dias. Para tanto, aproximadamente 1 ou 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 orifícios em um volume de 100 µL/poço para cada dia de experimento.

Em cada dia de experimento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com 100 µL/poço e adicionou-se 100 µL de solução de MTT (1 mL de MTT 5 mg/mL em 10 mL meio de cultivo contendo 1% de SFB). Essa mistura foi incubada por 3 horas a 37°C protegida da luz. Após esse período, o formazan foi precipitado a 1000 rpm durante 10 min, solubilizado em 50 µL de DMSO (LGC). Em seguida, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (M-Quant – Bio Tek Instruments, VT, USA) no comprimento de onda de 550 nm.

Os resultados obtidos neste experimento foram plotados em um gráfico de barra utilizando o programa GraphPad (GraphPad Software, CA, USA).

4.4 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

A caracterização biológica das células-tronco de membrana amniótica de fetos caninos foi feita com as células 40d e 50d e constituiu em caracterização morfológica (microscopia de luz, colorações de HE e toluidina), celular (imunofenotipagem através de ensaios imunocitoquímicos) e funcional (diferenciações adipo, osteo e condrogênica).

4.4.1 Caracterização Morfológica

A morfologia das células 40d e 50d foram visualizadas diariamente em microscopia de luz sem colorações ou após colorações com hematoxila-eosina e azul de toluidina.

4.4.1.1 Análise morfológica das células-tronco de membrana amniótica em microscopia de luz

As células 40d e 50d em cultivo foram submetidas à análise morfológica por microscopia de luz, em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100 - Japão) e, fotografadas diariamente. Desta forma, todo o período de desprendimento e expansão celular foi acompanhado.

4.4.1.2 Análise morfológica das células por coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Azul de toluidina

As células-tronco de membrana amniótica 40d e 50d em cultivo foram submetidas às colorações de hematoxilina-eosina e azul de toluidina.

Visando analisar a morfologia destas células, as mesmas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina. Para isso, as células foram cultivadas em placa de 35 mm e após as 24

horas de cultivo, foram fixadas com paraformaldeído 4% (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para a retirada do excesso de fixador, coradas com hematoxilina (Merck) por 10 minutos e novamente lavadas com PBS. Por fim, as células foram coradas pela eosina (Merck) por 3 minutos e novamente lavadas com PBS para a retirada do excesso de corante.

A coloração de azul de toluidina foi realizada para analisar a morfologia das células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 35 mm, fixadas com paraformaldeído 4% (Merck) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso do fixador e coradas com azul de toluidina (Merck) durante 10 minutos. Passado esse período de incubação, o corante foi retirado e o poço lavado com PBS.

As células 40d e 50d em ambas colorações foram analisadas através de microscopia de luz e a morfologia observada registrada fotograficamente em microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRC.

4.4.2 Caracterização Celular

4.4.2.1 Análise imunocitoquímica das células-tronco de membrana amniótica de canina

As células-tronco derivadas da membrana amniótica de cães (40 dias e 50 dias) foram cultivadas em placas de 24 orifícios sob a lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 80%. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e fixadas em 4 % de paraformaldeído durante 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas com PBS.

Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ao final da permeabilização, as células foram lavadas novamente com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada lavagem e submetidas ao bloqueio em PBS contendo 2 % de soro albumina bovino (BSA) durante 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-Nanog, anti-Oct4, anti-vimentina, anti-CD105 anti-PCNA3, anti-CD73, anti-CD45, anti-CD90 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA – concentração 200 µg/ml), diluídos em BSA 2% 1:50 e mantidos

em câmara úmida por 16 horas a 4°C. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com tampão de lavagem e foi realizado bloqueio com PBS contendo 2% de BSA de 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários diluídos em PBS contendo BSA 2% 1:100 marcados com FITC (Santa Cruz) foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com *VECTASHIELD® Mounting Medium* (Vector Laboratories, CA, USA) e a imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80i e no programa NIS Elements version 3.22 (Nikon, Tóquio, Japão).

4.4.3 Caracterização funcional

As células-troncos derivadas da membrana amniótica de fetos caninos (40 dias e 50 dias) foram submetidas à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.

4.4.3.1 Diferenciações adipogênica e osteogênica

Aproximadamente 40.000 células/ml (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5.000 células/ml (controle) foram cultivadas em placas de 24 poços. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo ou quando as células atingiam confluência em torno de 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 1 mL de meio de indução (adipócitos ou osteócitos) ou somente o meio α -MEM (LGC) acrescido de 7,5% de SFB (Invitrogen) no controle. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, até a diferenciação celular e monitoradas por microscopia invertida.

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o α -MEM contendo 15% SBF e suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough, SP, Brasil), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich,) e 5 μ M de indometacina (Sigma-Aldrich), 5 μ M de rosiglitazona (Sigma-Aldrich) e para os osteócitos α -MEM

suplementado com 7,5% SBF , 0,1 μ M de dexametasona (Decadron injetável), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

Além da microscopia de contraste de fase ao final, as células (controle e teste) foram submetidas a diferentes colorações de acordo com o tecido padrão esperado.

As células diferenciadas em adipócitos, osteócitos e seus controles após aproximadamente 21 dias tiveram seu meio removido e foram lavadas com PBS. Após lavagens, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas com PBS 3 x e seguiram para o protocolo de coloração neste caso o procedimento difere para cada um.

As células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4% e novamente lavadas com álcool isopropílico a 60% e em seguida o corante oil red (0,36% de *oil red* em álcool isopropílico a 60%) foi adicionado. Após 20 min de incubação a temperatura ambiente o corante foi removido e as células foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a remoção as lâminas foram montadas com glicerol e imediatamente analisadas em microscópio Nikon Eclipse 80i uma vez que, o rompimento dos vacúolos após coloração é muito rápido.

As células que foram diferenciadas em osteócitos foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas com PBS para remoção do excesso de paraformaldeído e coradas com 40 mM de *Alizarin Red S* em Tris pH 4,1 (Sigma). Passado 20 min da incubação, as células foram lavadas com água para a retirada do excesso de corante, essa lavagem ocorreu até não haver mais precipitado visível. Em seguida, as lâminas foram montadas com Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e levadas à análise em microscópio invertido Nikon Eclipse 80i.

4.4.3.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi realizada utilizando o kit *STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen).

Primeiramente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente um milhão de células foram ressuspensas em 2 mL de PBS. Em seguida as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e ressuspensas em 2 mL do meio de

diferenciação do kit *STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen) preparado seguindo as instruções do fabricante.

As células foram novamente centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos e o botão celular foi formado, então o tubo foi colocado cuidadosamente com tampa semiaberta na estufa. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de no mínimo 21 dias.

Passado o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas em formol tamponado a 10% durante 2h. Em seguida, elas foram diafanizadas em banhos sucessivos de álcool 50,70,90%, seguidos de 3 banhos a 100% com duração de 10 minutos cada. Ao final, a amostra foi submetida a dois banhos de xilol 100% com duração de 5 a 10 minutos, colocada em banho de paraplast líquida a 60°C em estufa seca por 30 minutos e incluídas em paraplast.

Após inclusão, cortes de 3-4 μM foram realizados em micrótomo e colocados sobre lâminas silanizadas durante aproximadamente 12 h com o objetivo de escorrer o excesso de paraplast e assim, fixar o corte. Ao final, as amostras foram coradas com HE e Tricomo de Masson e analisadas em microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRC.

4.5 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENÉTICO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃES

4.5.1 Inoculação das células 40d e 50d nos camundongos imunossuprimidos (nude)

As células 40d e 50d foram submetidas à avaliação do potencial carcinogênico em camundongos imunossuprimidos (nude). Para tanto, 1×10^6 células foram aplicadas via subcutânea na região de coluna cervical nos camundongos. Primeiramente, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm com PBS para retirada dos resíduos de meio de cultivo. Em seguida, as células foram ressuspensas novamente, centrifugadas e o precipitado foi ressuspensado para contagem das células. Ao final, aproximadamente 1×10^6 células foram ressuspensas em 30 μl de *Dulbecco's Modified*

Eagle Medium alta glicose (DMEM – LGC Biotecnologia, SP, Brasil) sem soro e aplicadas com auxílio de uma seringa de insulina.

4.5.2 Avaliação macroscópica

A avaliação da ocorrência de formação tumoral foi realizada durante 60 dias e uma vez por semana verificou-se a formação tumoral.

Após esse período, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em pesquisa, as regiões de aplicação das células foram fotografadas e dissecadas para a verificação de formação tumoral, os órgãos como: coração, fígado, pulmão, rim direito e rim esquerdo foram coletados e fixados.

4.5.3 Avaliação microscópica

Foi realizada a avaliação microscópica dos órgãos provenientes dos camundongos eutanasiados com objetivo de avaliar se houve formação tumoral em algum dos mesmos. Os órgãos destinados a análises histológicas foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e as amostras foram submetidas aos protocolos rotineiros de inclusão em paraplast e coradas através das técnicas rotineiras de hematoxilina-eosina (WALLINGTON, 1972). As fotomicrografias foram tiradas no microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MEMBRANA AMNIÓTICA DE 40 E 50 DIAS DE GESTAÇÃO

Alguns fragmentos de membrana amniótica de 40 e 50 dias foram coletados e submetidos a análise histológica com o objetivo de analisarmos a estrutura deste tecido.

Dessa forma, os tecidos destinados a análise histológicas foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e processados seguindo os protocolos rotineiros de inclusão em paraplast, corados através de técnicas rotineiras de hematoxila-eosina. (WALLINGTON, 1972) e analisado em microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera Axio CAM HRc.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA

As duas coletas de membranas amnióticas realizadas para a confecção deste estudo foram realizadas em campanhas de castração do Centro de Zoonoses de São Paulo. Os anexos provenientes destas coletas apresentavam 40 dias de gestação, esta coleta foi identificada como 40d, e coleta com anexos apresentando 50 dias de gestação, sendo esta identificada como 50d. Em ambas as coletas as membranas amnióticas provenientes dos diferentes fetos foram colocadas juntamente em cultivo, sendo essa cultura uma mistura (*pool*) de todas as membranas de cada útero gravídico separadamente.

O método utilizado para obtenção das células de digestão enzimática utilizando Colagenase I que se mostrou adequado, pois após a digestão do tecido foi possível a observação de uma grande quantidade de fragmentos de tecido e células suspensas no meio de cultura (Figura 1A e 1C) e após 24 horas em cultura notavas se um grande numero de células aderidas em toda a placa, além da adesão de pequenos fragmentos de tecido que contribuíram para soltar mais células do que as que já estavam presentes pela ação da colagenase (Figura 1B e 1C)

Figura 1- Fotomicrografia do das células-tronco de membrana amniótica 40d e 50d obtidas pelo método de digestão enzimática utilizando collagenase I

(Fonte: SANTOS, J.F, 2012)

Legenda: A) Cultivo de células de membrana amniótica 40d logo a após a digestão com collagenase I. Aumento 4x. B) Cultivo de células de membrana amniótica 40d, 24 horas após a realização da cultura. Aumento 4x. C) Cultivo de células de membrana amniótica 50d logo a após a digestão com collagenase I. Aumento 4x. D) Cultivo de células de membrana amniótica 50d 24 horas após a realização da cultura. Aumento 4x.

Nas culturas realizadas obtivemos um grande número de células em um curto período, com uma rápida proliferação, sendo que após 5 dias as mesmas já estavam aptas para repique (Figura 2A e 3A). Nesta cultura também observamos inicialmente um grande número de células com formato de células epiteliais (Figura 2B e 3B), mais do que de células com formato de fibroblasto. Contudo, com crescimento da cultura e consequentemente com a realização do repique celular, notamos a morte das células em formato epitelial restando apenas uma cultura homogênea com células em formato de fibroblasto (Figura 2C e 3C). Nas figuras 2D e 3D conseguimos observar essas células já em P3 não havendo mais a presença de células de formato epitelial.

Figura 2- Cultura de células de membrana amniótica 40d

(Fonte: Santos, J.F, 2012)

Legenda: A) Cultura de células de membrana amniótica 40d após 5 dias em cultivo. Aumento 4x. B) Cultura de mista de células após P1. Seta amarela indica células com formato de células epiteliais e seta vermelha indica células com formato de fibroblasto. Aumento 20x. C) Cultura homogênea de células em P3. Aumento 4x. D) Cultura homogênea de células em P3. Aumento 20x.

Figura 3- Cultura de células de membrana amniótica de 50d

(Fonte: Santos, J.F, 2012)

Legenda: A) Cultura de células de membrana amniótica 50d após 5 dias em cultivo. Aumento 4x. B) Cultura de mista de células após P1. Seta amarela indica células com formato de células epiteliais e seta vermelha indica células com formato de fibroblasto. Aumento 20x. C) Cultura homogênea de células em P3. Aumento 4x. D) Cultura homogênea de células em P3. Aumento 20x.

5.2 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO POR MÉTODO COLORIMÉTRICO DE MTT

O gráfico 1 é resultado da análise de proliferação das células-tronco de membrana amniótica 40d, notamos um crescimento inicial dessas células, seguido por uma queda no sétimo dia de análise, até aproximadamente o nono dia onde observamos uma estabilização nesse crescimento que em seguida volta a se proliferar até o décimo segundo dia de experimento, esse tipo de perfil não era esperado para estas células uma vez que elas proliferam bem quando estão em cultivo.

Gráfico 1 – Ensaio de proliferação das células-tronco de membrana amniótica 40d pelo método colorimétrico de MTT

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: Aproximadamente 5×10^3 células-tronco foram plaqueadas e submetidas ao teste colorimétrico durante 11 dias e os resultados obtidos foram plotados no Programa GraphPad Prism.

No gráfico 2 observamos o resultado da análise das células de membrana amniótica 50d verificando um crescimento inicial até o quinto dia de experimento, seguido por uma queda no sétimo dia e subsequente recuperação do crescimento até o décimo segundo dia de experimento sendo mais condizente com o perfil de proliferação das células-tronco mesenquimais.

Gráfico 2 – Ensaio de proliferação das células-tronco de membrana amniótica 50d pelo método colorimétrico de MTT

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: Aproximadamente 5×10^3 células-tronco foram plaqueadas e submetidas ao teste colorimétrico durante 11 dias e os resultados obtidos foram plotados no Programa GraphPad Prism.

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CANINA

A caracterização biológica das células 40d e 50d foi realizada e consistiu na observação morfológica através de análise por microscopia de luz das células coradas com hematoxila-eosina e azul de toluidina. A caracterização celular foi feita através de ensaios analisando a expressão de marcadores mesenquimais e de pluripotência e por ensaios imunocitoquímicos e funcional com diferenciações adipogênicas, osteogênicas de condrogênicas.

5.3.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica consistiu na realização de colorações com hematoxilina-eosina e azul de toluidina para a melhor visualização da morfologia das células de membrana amniótica 40d e 50d.

5.3.1.1 Análise morfológica das células de membrana amniótica de cães por coloração de Hematoxilina- Eosina (HE) e Azul de Toluidina

As colorações foram realizadas nas células-tronco de membrana amniótica 40d e 50d, visando visualizar de forma mais clara a morfologia dessas células. Com a coloração de HE foi evidenciado o formato de fibroblasto das células de membrana amniótica em ambos os períodos gestacionais (40 e 50 dias de gestação) podendo verificar os prolongamentos do citoplasma (Figuras 4A e 5A, respectivamente), assim como a presença de um núcleo grande (Figuras 4B e 5B, respectivamente).

Figura 4 - Fotomicrografia de coloração de HE das células-tronco de membrana amniótica 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Aumento 20x. B) Aumento 40x.

Figura 5 - Fotomicrografia de coloração HE de células-tronco de membrana amniótica 50 d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Aumento 20x. B) Aumento 40x.

Com a coloração de azul de toluidina pudemos observar, assim como na de hematoxilina-eosina o formato de fibroblasto dessas células, e o núcleo evidenciado, uma característica comum em células-tronco mesenquimais aonde encontramos um núcleo grande em relação ao um citoplasma mais escasso (Figura 6 e 7).

Figura 6- Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina de células-tronco de membrana amniótica 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Aumento 20x. B) Aumento 40x.

Figura 7 - Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina de células-tronco de membrana amniótica 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Aumento 20x. B) Aumento 40x

5.3.2 Caracterização Celular

A caracterização celular das células-tronco provenientes de membrana amniótica 40d e 50d foram realizadas por ensaios imunocitoquímicos para a análise de expressão de marcadores mesenquimais e de pluripotência.

5.3.2.1 Análise imunocitoquímica das células de membrana amniótica

As análises imunocitoquímicas foram realizadas nas células de membrana amniótica de 40d e 50d com o objetivo de verificar a análise de expressão dessas células quanto a quanto a marcadores mesenquimais e sua pluripotencia. A partir disso utilizamos um painel de anticorpos de células-tronco mesenquimais como CD73, CD105, CD90, CD45, (Figuras 8 e 11), e marcadores de pluripotencia como Oct-4 e Nanog (Figuras 9 e 12). A proliferação celular foi vista através da análise de PCNA3 e como controle positivo da reação observamos a expressão de vimentina (Figuras 10 e 13). Observamos positividade na reação apesar de baixa, para os marcadores CD73, CD105, CD90, inclusive os marcadores de pluripotencia. Ocorreram algumas peculiaridades com relação a marcação das células, uma vez que a marcação para CD45 foi negativa nas células-tronco de membrana amniótica 40d (Figura 8D), enquanto a marcação para CD73 se deu menos intensa nas células-tronco de membrana amniótica 50d (Figura 11A). Convém ressaltar que a marcação positiva para o marcador hematopoiético CD45 não era esperada.

Figura 8 – Análise do perfil de expressão de marcadores mesenquimais das células de membrana amniótica de 40 d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação positiva para CD73; B) Marcação positiva para CD105; C) Marcação positiva para CD90; D) Marcação positiva fraca para CD45. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

Figura 9 - Análise do perfil de expressão de marcadores de pluripotência das células de membrana amniótica de 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação DAPI para Oct-4; B) Marcação positiva para Oct-4; C) Marcação DAPI para Nanog; D) Marcação positiva para Nanog. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

Figura 10 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 e vimentina das células-tronco de membrana amniótica 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação positiva para PCNA3. Aumento 1000x. B) Marcação positiva para Vimentina. Aumento 400x.

Figura 11 - Análise do perfil de expressão de marcadores mesenquimais das células de membrana amniótica 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação positiva fraca para CD73. Aumento 400x. B) Marcação positiva para CD105. Aumento 20x. C) Marcação positiva para CD90. Aumento 1000x. D) Marcação positiva para CD45. Aumento 400x.

Figura 12 - Análise do perfil de expressão de marcadores de pluripotência das células de membrana amniótica 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação DAPI para Oct-4; B) Marcação positiva para Oct-4; C) Marcação DAPI para Nanog; D) Marcação positiva para Nanog. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

Figura 13 - Análise do perfil de expressão de PCNA3 e vimentina das células-tronco de membrana amniótica 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Marcação positiva para PCNA3. Aumento 1000x. B) Marcação positiva para Vimentina. Aumento 400x.

5.3.3 Caracterização Funcional

Para a caracterização funcional as células de membrana amniótica, 40 d e 50d foram submetidas à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos por cultivo em meio específico.

5.3.3.1 Diferenciação adipogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d

As células de membrana amniótica foram cultivadas e submetidas em meio específico para verificar se as mesmas possuíam capacidade de diferenciação em células adipogênicas.

Após 21 dias em cultivo somente observamos diferenciação morfológica das células de membrana amniótica 40d após a coloração com *oil red*, verificando a mudança da morfologia, mas não a presença de acúmulos de gordura (Figura 14B). Nas células de membrana amniótica 50d observamos diferenciação em adipócitos e a presença de vacúolos de gordura (Figura 15B). As figuras 14A e 15A representam o controle negativo da reação nas células-tronco de membrana amniótica 40d e 50d.

Figura 14 – Fotomicrografia da diferenciação em adipócitos das células-tronco de membrana amniótica 40d após coloração com *oil red*

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação. B) Diferenciação das células-tronco de membrana amniótica 40d onde houve alteração morfológica porém não verificamos a presença de vacúolos. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

Figura 15 – Fotomicrografia da diferenciação em adipócitos das células-tronco de membrana amniótica 50d após coloração com *oil red*

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação B) Diferenciação de células de membrana amniótica 50d com a presença de vacúolos de gordura. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

5.3.3.2 Diferenciação osteogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d

As células de membrana amniótica 40d e 50d também foram submetidas a diferenciação osteogênica em meio específico por 21 dias, sendo coradas após esse período. A diferenciação em osteócitos não foi observada para os estágios gestacionais estudados (Figura 16 e 17).

Figura 16 – Fotomicrografia da diferenciação em osteócitos das células de membrana amniótica 40d após coloração com alizarina red

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação. B) Teste da diferenciação de células de membrana amniótica 40d mostrando que as mesmas não diferenciaram em osteócitos. Em todas as imagens o aumento foi de 1000x.

Figura 17 – Fotomicrografia da diferenciação em osteócitos das células de membrana amniótica 50d após coloração com alizarina red

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação. B) Teste da diferenciação de células de membrana amniótica de 40d mostrando que as mesmas não diferenciaram em osteócitos. Em todas as imagens o aumento foi de aumento 1000x.

5.3.3.3 Diferenciação condrogênica das células de membrana amniótica 40d e 50d

A diferenciação das células de membrana amniótica de 40d e 50d também foi realizada e as lâminas analisadas para a verificação da presença de fibras de colágeno, o que indicaria a diferenciação dessas células. Como pode ser observado não houve diferenciação dessas células em nenhum dos estágios gestacionais testados(Figura 18 e 19).

Figura 18 – Fotomicrografia da Diferenciação em condrócitos das células-tronco de membrana amniótica 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação. Aumento 20x; B) Teste da diferenciação de células de membrana amniótica 40d . Aumento 40x.

Figura 19 – Fotomicrografia da diferenciação em condrócitos das células-tronco de membrana amniótica 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Controle da diferenciação. Aumento 20x; B) Teste da diferenciação de células de membrana amniótica 40d. Aumento 40x.

5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGENICO DAS CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA

Para a análise do potencial carcinogênico das células de membrana amniótica de 40d e 50d, 2 animais foram inoculados com cada uma dessas células e observados semanalmente por 60 dias. Após esse período, não observamos nenhuma alteração macroscópica no local de inóculo bem como não se apresentaram alterações nos tecidos do local do inóculo (Figura 20 e 21). Órgãos como: coração, fígado, pulmão, rim direito e rim esquerdo foram removidos e analisados microscopicamente a fim de visualizar uma possível formação metastática ou processo inflamatório ou qualquer outra anormalidade referente a migração das células-tronco provenientes de membrana amniótica inoculadas nesses animais. As figuras 22, 23 e 24 mostram que não houveram alterações morfológicas dos órgãos analisados e que, portanto, diferentemente das outras células que já haviam sido estudadas, estas não são capazes de formar tumor quando inoculadas em camundongos imunossuprimidos, nude.

Figura 20 – Análise macroscópica da região do inóculo de células-tronco de membrana amniótica 40d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Análise macroscópica da região do inóculo antes da dissecação. B) Após a dissecação.

Figura 21 – Análise macroscópica da região do inóculo de células de membrana amniótica de 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Análise macroscópica da região do inóculo antes da dissecação. B) Após a dissecação.

Figura 22 – Análise macroscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula-tronco de membrana amniótica 40 d e 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: A) Órgãos do camundongo inoculado com células-tronco de membrana amniótica de 40d, (1) Rim direito, (2) Rim esquerdo, (3) Coração, (4) Pâncreas, (5) Fígado e (6) Pulmão. B) Órgãos do camundongo inoculado com células de membrana amniótica de 50d, (1) Rim direito, (2) Rim esquerdo, (3) Coração, (4) Pâncreas, (5) Fígado e (6) Pulmão.

Figura 23 – Análise microscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula de membrana amniótica de 40d e 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Lengenda: A) Análise microscópica do coração do animal inoculado com células de membrana amniótica 40d; B) Análise microscópica do coração do animal inoculado com células de membrana amniótica 50d; C) Análise microscópica do fígado do animal inoculado com células de membrana amniótica 40d; D) Análise microscópica do fígado do animal inoculado com células de membrana amniótica 50d; E) Análise microscópica do pulmão do animal inoculado com células de membrana amniótica 40d; F) Análise microscópica do pulmão do animal inoculado com células de membrana amniótica 50d. Todos em aumento de 20x.

Figura 24 – Análise microscópica dos órgãos dos camundongos inoculados com célula de membrana amniótica de 40d e 50d

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Lengenda: A) Análise microscópica do rim direito do animal inoculado com células de membrana amniótica 40d; B) Análise microscópica rim direito do animal inoculado com células de membrana amniótica 50d; C) Análise microscópica do rim esquerdo do animal inoculado com células de membrana amniótica 40d; D) Análise microscópica do rim esquerdo do animal inoculado com células de membrana amniótica 50d. Todos em aumento de 20x.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO TECIDO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE 40 DIAS E 50 DIAS DE GESTAÇÃO

A análise histológica do tecido foi realizada com o objetivo de verificar a morfologia do mesmo proveniente do útero de 40 dias e 50 dias de gestação utilizados no isolamento e cultivo das células-tronco caracterizadas neste trabalho, onde ambos apresentaram as mesmas características morfológicas, como esperado. A membrana amniótica se apresentou característica em ambas as idades gestacionais, com uma camada de tecido epitelial (CE) fina seguida por uma camada basal (CB) e uma camada de estroma de tecido conjuntivo avascular chamada de camada mesenquimal (CM). O epitélio fez uma linha simples e contínua assentando-se em uma camada basal se localizando logo abaixo uma camada mesenquimal compacta composta por colágeno tipo I e II aonde se encontram uma rede de células mesenquimais (Figura 25 e 26).

Figura 25 – Fotomicrografia da membrana amniótica de 40 dias após coloração com HE

(Fonte: WINCK, C.P; 2012)

Legenda: Análise histológica da membrana amniótica de 40 dias de gestação apresentando camada epitelial (CE), camada basal (CB) e camada mesenquimal (CM).

Figura 26 – Fotomicrografia da membrana amniótica de 50 dias após coloração com HE

(Fonte: WINCK, C.P, 2012)

Legenda: Análise histológica da membrana amniótica de 50 dias de gestação apresentando camada epitelial (CE),camada basal (CB) e camada mesenquimal (CM).

6. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho tivemos como principal objetivo dar continuidade ao estudo realizado por nosso grupo de cultivo e caracterização de células de membrana amniótica provenientes de fetos de cães com 35 e 56 dias de gestação. Novas coletas foram realizadas com datas próximas as realizadas no trabalho anterior, sendo as novas células também caracterizadas *in vitro* e *in vivo*. Esse estudo se mostrou importante para comprovar os resultados anteriormente obtidos, uma vez que as células-tronco de membrana amniótica humana e de ratos aparentemente se apresentam como boas alternativas para o uso em protocolos de terapia celular. *In vitro* as células-tronco de membrana amniótica isoladas no estudo de Lima (2012) possuíam características que as tornariam uma boa alternativa de células para o uso em terapia celular, como o fácil cultivo, boa proliferação, alguma plasticidade, pois as mesmas se diferenciaram em adipócitos e condrócitos. Entretanto, os estudos *in vivo* revelaram outra realidade: quando injetadas em camundongos imunossuprimidos *nudes* levaram uma formação tumoral o que as tornou impróprias para sua utilização em terapia celular. Como na literatura não existem relatos sobre o potencial carcinogênico das células-tronco de membrana amniótica, principalmente há pouca literatura sobre essas células na espécie canina, surgiu a dúvida e a necessidade de verificar o comportamento das mesmas *in vivo*, isolando e caracterizando novas culturas. Com isso neste projeto trazemos os resultados de duas novas coletas com idades gestacionais de aproximadamente 40 e 50 dias, datas não idênticas, porém próximas as coletas realizadas no estudo anterior. A observação da formação tumoral das coletas anteriores foi tão grave e agressiva que justificou-se a investigação mais profunda do fenótipo observado.

Algumas mudanças foram realizadas quanto ao protocolo de isolamento dessas células. No trabalho anterior (Lima, 2011), assim como em Marcus et al (2008), as células de membrana amniótica foram isoladas por método de explante, porém no presente trabalho realizamos o isolamento através do uso de digestão enzimática do tecido com a enzima colagenase I, descrito por Park et al (2012). O motivo desta troca se deu por conta do maior número de células obtidas após 24 horas da realização da cultura, resultando em um estabelecimento de cultivo em um tempo mais curto e, também, devido a problemas encontrados nos últimos isolamentos, onde os tecidos não aderiam a placa e acabavam

morrendo antes do desprendimento celular. Além disso, após uma semana essas células já se encontravam aptas o repique celular, o que vinha a ser muito animador. Uma das características de células-tronco mesenquimais segundo *International Society of Cellular Therapy* é a fácil aderência ao plástico durante o cultivo da mesma (DOMICINI et al 2006), portanto demos continuidade ao nosso estudo acreditando estar isolando células mesenquimais uma vez que nossa cultura se apresentou não só essa característica mais também a morfologia de células mesenquimais.

Quanto a cultura das células de membrana amniótica de 40 e 50 dias, assim como já observado anteriormente por nosso grupo, estas células apresenta uma característica peculiar aonde inicialmente temos uma cultura mista de células, com a presença de células arredondadas e aderentes que se assemelham a células epiteliais e células de formato fibroblástóides. Isso já era esperado não só por termos trabalhado com esse tipo celular anteriormente mais justamente por esses resultados serem compatíveis com a descrição histológica que encontramos sobre a membrana amniótica (MIHU et al.,2009). Entretanto, após algumas passagens (P1 e P2) já notamos morte celular das células com morfologia epitelial e ocorrendo a predominância de células com o formato de fibroblastos, morfologia semelhante à de outras células-tronco anteriormente já caracterizadas (MARCUS et al., 2008; MIHU et al.,2009; URANIO et al., 2012). Esse perfil de proliferação inicial, seguindo-se por uma queda neste crescimento e então por uma retomada de proliferação celular até o termino do ensaio pode ser observado nos gráficos apresentados relacionados ao ensaio de proliferação celular (MTT) e revela claramente a seleção do tipo celular predominante na cultura de células-tronco de membrana amniótica realizada durante o cultivo conforme o repique celular, com uma cultura mista com células epiteliais que acabam por morrer e células de formato de fibroblasto que acabam por se proliferar, seguida da morte das células epiteliais e a queda do crescimento desta cultura, enquanto a substituição dessas células por células com formato de fibroblastos demonstram a retomada de crescimento da cultura

É importante ainda ressaltar que estas células não apresentaram diferenciação espontânea *in vitro*, o que é uma característica imprescindível para o uso de células em protocolos de terapia celular com células-tronco, onde é necessário amplificar o número de células previamente ao transplante celular, preservando-se ainda as características de indiferenciação para que as mesmas diferenciem-se *in vivo* de acordo com a necessidade terapêutica Kim et al., (2007).

No presente trabalho, apesar das células serem provenientes de coletas distintas, ambas se apresentaram da mesma forma quanto seu crescimento celular e morfologia. Nas análises morfológicas conseguimos observar claramente a semelhança entre as culturas (40d e 50d) com células de formato fibroblastóide, com prologamento do citoplasma e núcleos grandes, características estas encontradas em células-tronco como o núcleo proeminente e citoplasma escasso.

Em relação às características fenotípicas, as células de membrana amniótica 40d e 50d expressaram marcadores mesenquimais como CD90, CD105, CD73, Vimentina e de proteínas envolvidas na proliferação celular como PCNA3. Estes achados reforçam a caracterização das células de membrana amniótica de fetos de cães como células mesenquimais, estando em concordância com os achados de células de membrana amniótica de humanos (MIKI et al., 2005) e de cães (URANIO et al., 2011, PARK et al., 2012) e estando dentro dos padrões da *International Society of Cellular Therapy* que define como sendo necessária a positividade para marcação de células-tronco mesenquimais para marcadores como CD90 e CD105 e negativo para CD34 e CD45 (DOMICINI et al 2006) . No entanto umas dessas células apresentaram marcação positiva não esperada para o marcador hematopoiético CD45. Já a expressão positiva dos marcadores de pluripotência Oct-4 e Nanog, fatores de transcrição encontrado no núcleo de células pluripotentes já foi encontrada por outros autores em algumas células mesenquimais (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012)

Apesar de uma das características das células mesenquimais ser a diferenciação em linhagens de células adipogênicas, osteogênica e condrogênicas e vários trabalhos comprovarem essa capacidade de diferenciação (YOU et al., 2008; URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012) apenas as células de membrana amniótica de 50 dias apresentaram diferenciação para adipócitos. As células de membrana amniótica de 40 dias apresentaram alteração da sua morfologia aparentando a presença de vacúolos de gordura em suas células, mas a marcação com coloração de *oil red* não foi positiva sendo necessário que o experimento seja novamente realizado utilizando fatores diferentes dos quais utilizamos para esta diferenciação sendo imaturo afirmar que estas células não se diferenciaram.

Quanto às diferenciações osteo e condrogênicas têm que em ambas as culturas não observaram marcação nas colorações e, portanto, não houve diferenciação da mesma forma que foi visto acima e tendo a necessidade realização de novos experimentos. Até então as

células de membrana amniótica de 40 e 50 dias tiveram comportamento semelhante às células obtidas anteriormente em relação a sua caracterização. Entretanto, quando as células de membrana amniótica de 40 dias e 50 dias foram injetadas em camundongos imunossuprimidos, nude não houve formação tumoral após 60 dias da injeção, contrário com o ocorrido em estudo anterior. Como o objetivo maior deste projeto foi o de analisar mais profundamente sobre o comportamento *in vivo* dessas células, o animal foi sacrificado e a região do inóculo dissecada e foi observada a preservação dos tecidos sem alteração em sua estrutura macroscópica. Nas células de membrana amniótica de cão isoladas em Lima (2011) foi possível observar um tumor sólido, localizado nos animais inoculados, porém nas células isoladas nesse trabalho, mesmo em idades gestacionais próximas não verificamos a formação de tumores ou metástases em órgãos analisados. O resultado encontrado no presente trabalho encontra-se compatível com o da literatura para humanos e ratos, onde há relatos de células inoculadas *in vivo* sem a formação de tumores. Os trabalhos realizados com células de membrana amnióticas de fetos de cães (URANIO et al., 2011; PARK et al., 2012) não realizaram os testes *in vivo* para que pudessemos comparar os resultados. Nos parece apropriado refletir e trazer novas possibilidades sobre os dois resultados controversos que possuímos sobre as células de membrana amniótica de cão. Nas duas coletas realizadas em Lima (2011) uma possibilidade seria a presença de células tumorais que se proliferaram mais, como é de praxe para células tumorais, tomando conta da cultura de células. Sendo assim, além de continuarem mantendo algumas características de células fetais do tecido que foram extraídas, as células *in vivo* se comportavam com alta proliferação, compatível com a observação da presença de células com marcação positiva para c-Myc e p53 nas células de 35 e 56 dias em Lima (2011), não encontradas nas células cultivadas nesse trabalho. Por fim, de acordo com nossos resultados sugerimos que as células de membrana amniótica de fetos de cães devem ser consideradas como potenciais para estudos de futura aplicação para medicina veterinária regenerativa após estudos mais aprofundados sobre sua potencial plasticidade e carcinogenicidade.

7. CONCLUSÃO

- O método de obtenção de células de membrana amniótica de fetos de cães por digestão enzimática é mais eficiente do que o método por explante em termos de número de células obtidas;
- As células de membrana amniótica de fetos de cão expressam marcadores celulares de células mesenquimais e de pluripotência;
- As células de membrana amniótica de fetos de cão aparentemente tem a capacidade de se diferenciarem em adipócitos e por isso podem apresentar alguma plasticidade ;
- As células provenientes de membrana amniótica desse estudo 40d e 50d quando injetadas nos camundongos imunossuprimidos nudes não levaram a formação tumoral. Entretanto, estudos de carcinogênese devem ser repetidos com as células desse estudo, de estudos anteriores e novos estudos a fim de se esclarecer a questão da carcinogênese.

REFERÊNCIAS

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 Dev. Biol.**, v.7, p.11-14, 2007.

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Review: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **Am J Physiol Cell Physiol**, v.287, n.3, p.572-9, 2004.

BARRY, F.; MURPHY, M.; DWYER, R.; O'BRIEN, T.; KAVANAGH, C.; DUFFY, G. Stem cell therapy for tissue repair: the stem cell-host interaction. **In: Proceedings of the 15^o ESVOT Congress**, 2010, Bolonha. Bolonha: IVIS; 2010. p.43.

BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; BAKER, M.; LIMANA, F.; CHIMENTI, S.; KASAHARA, H.; ROTA, M.; MUSSO, E.; URBANEK, K.; LERI, A.; KAJSTURA, J.; NADAL-GINARD, B.; ANVERSA, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, v.114, p.763-776, 2003.

BOHELER, K. R.; CZYZ, J.; TWEEDIE, D.; YANG, H.T.; ANISIMOV, S.V.; WOBUS, A.M., Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. **Circ. Res.**, v. 91, n.3, p. 189-201, 2002.

BRUNSTEIN, C.G.; WAGNER, J.E. Umbilical cord blood transplantation and banking. **Annu Rev Med**, v.57, p.403-17, 2006.

CONCANNON, P.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirement and maternal reponis durin canine pregnancy. **Journal of reproduction and fertility ltd**, v.57, p.169-167, 2001.

CREMONESI, F.; CORRADETTI, B.; LANGE, C.A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. **Theriogenology**, v.75, p.1400-15, 2011.

CROSS, J.C; WERB, Z.; FISHER S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. **Science**, v. 266, p. 1508-18, 1994.

DANFORTH, D.; HULL, R.W. The microscopy anatomy of fetal membranes with particular reference to the details structure of the amnion. **Am J Obstet Gynecol.** Mar, v.75, p.536-47, 1958.

DE GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, p.1338–1345, 2004.

DE VITA, B.; MAIA, L.; FREITAS, N.P.P.; CAMPOS, L.L.; ALVARENGA, F.C.L.; PRESTES, N.C. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica e gelatina de wharton de equinos. **In: Anais do 5º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular**, Gramado. Gramado: ABTCel, 2010.

DIWAN, S.B.; STEVENS, L.C. Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. **J Natl Cancer Inst**, v.57, p.937–942, 1976.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytotherapy, v.8, p.315–317, 2006.

EVANS, M. J. Potential for genetic manipulation of mammalian. **Mol. Biol. Med**, v.6, p. 557 – 565 ,1989.

FERNANDES, I. R. **Cultura e Caracterização de Células do Trofoblasto Extraviloso (TEV) derivado da placenta humana a termo.** 2010. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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**, v.33, n.8, p.640-4, 2012.

FRANCIOLLI, A.L.R. **Multipotencialidade das Células da Membrana Amniótica e do Saco Vitelínico no Modelo Equino**. 2012. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Universidade de São Paulo, São Paul, 2012.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, p. 649–658, 2004.

GAO, Y.; PU, Y.; WANG, D.; ZHANG, W.; GUAN, W.; MA, Y. Isolation and biological characterization of chicken amnion epithelial cells. **European Journal of Histochemistry**, v.56, p.208-214, 2012.

GOLDSTEIN, G.; TOREN, A.; NAGLER, A. Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity. **Curr Med Chem**, v.13, p.1249–59, 2006.
Gynecol, v.194, p.664–673, 2006.

IN‘T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.;
International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v.8, p.315–317, 2006.

ISMAIL, A.; RAMSIS, R.; SHERIF, A.; THABET, A.; EL-GHOR, H.; SELIM, A. Use of human amniotic stem cells for common bile duct reconstruction: Vascularized support of a free amnion graft. **Med. Sci. Monit.**, v. 15, n. 9, p. BR243-247, 2009.

KAKISHITA, K.; ELWAN, M.A.; NAKAO, N.; ITAKURA, T.; SAKURAGAWA, N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson’s disease: a potential source of donor for transplantation therapy. **Exp Neurol**, v.165, p.27–34, 2000.

KIM, J.; KANG, H. M.; KIM, H.; KIM, M. R.; KWON, H. C.; GYE M. C.; KANG S. G.; YANG H. S.; YOU J., *Ex Vivo* Characteristics of human amniotic membrane-derived stem cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 9, p. 581-594, 2007.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?. **N Engl Journal Med.** v.7, p. 570-582, 2003.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy** 9:754-758, 2002.

LANGMAN, T.W.S. Embriologia Médica. 9ª Ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2005, p.347.

LARSEN, W.J. Human Embriology. **New York: Churchill Livingstone**, 2001, p.575.

LI, H.; NIEDERKORN, J. Y.; NEELAM, S.; MAYHEW, E.; WORD, R. A.; MCCULLEY, J. P.; ALIZADEH, H. Immunosuppressive factors secreted by human amniotic epithelial cells. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 46, n. 3, p. 900–907, 2005.

LIMA, E.B. **Estabelecimento e caracterização de células-tronco de membrana amniótica de cão**. 2012. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. **Am. J. Obstet.**

MANN, A.; YADAV, R.P., SINGH, J.; KUMAR, D.; SINGH, B.; YADAV, P.S. Culture, characterization and differentiation of cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) amnion. **Cytotechnology**. (Epub ahead of print), 2012.

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, 2008.

MARTIN, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v.78, p. 7634 – 7638, 1981.

MIHU, C. M.; RUS, C. D.; SORITAU, O.; SUȘMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 50, p. 7-73, 2009.

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

MUKAIDA, T.; YOSHIDA, K.; KIKYOKAWAT, H. Surface structure of the placental membranes. **J. Clin Electron Microsc**, v.10, p. 447-8, 1977.

OKAZAKI, T.; CASEY, M. L.; OKITA, J. R.; MACDONALD, P. C.; JOHNSTON, J. M. Initiation of human parturition. XII. Biosynthesis and metabolism of prostaglandins in human fetal membranes and uterine decidua. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 139, n. 4, p. 373-381, 1981.

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

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

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143-147, 1999.

PORTMANN-LANZ, C. B.; SCHOEBERLEIN, A.; HUBER, A.; SAGER, R.; MALEK, A.; HOLZGREVE, W.; SURBEK, D. V. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v.194, p.664–673, 2006.

PRUSA, A.R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BETTELHEIN, D.; LUBEC, G.; POLLACK, A. Neurogenic cells in human amniotic fluid. **Am J Obstet Gynecol**, v.191, p.309-14, 2004.

RODRIGUES, F.; FONSECA, D. Células tronco. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Norte, 2004.

SAKURAGAWA, N.; KAKISHITA, K.; KIKUCHI, A.; OKANO, H.; UCHIDA, S.; KAMO, I. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. **J Neurosci Res**, v.78, p.208-14, 2004.

TAKASHIMA, S.; ISE, H.; ZHAO, P.; AKAIKE, T.; NIKAIDO, T. Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. **Cell Struct Funct**, v.29, p.73–84, 2004.

TANAKA, M.; CHEN, Z.; BARTUNKOVA, S.; YAMASAKI N, IZUMO S. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. **Development**, v.126, p.1269–1280, 1999.

TERADA, N.; HAMAZAKI, T.; OKA, M.; HOKI, M.; MASTALERZ, D.M.; NAKANO, Y.; MEYER, E.M.; MOREL, L.; PETERSEN, B.E.; SCOTT, E.W.; Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v.416, n.6880, p.542–545, 2002.

THOMSON, J. A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n.5391, p. 1145- 1147, 1998.

TRAN, S.D., PILLEMER, S.R., DUTRA, A., BARRETT, A.J., BROWNSTEIN, M.J., KEY, S., PAK, E., LEAKAN, R.A., KINGMAN, A., YAMADA, K.M., Baum, B.J.; MEZEY, E. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. **Lancet**, v.361, n.9363, p.1084–1088, 2003.

TROUNSON, A.; THAKAR, R. G.; LOMAX, G.; GIBBONS, D. Clinical trials for stem cell therapies. **BMC Medicine**, v. 9, p. 52, 2011.

UCHIDA, S.; INANAGA, Y.; KOBAYASHI, M.; HURUKAW, A. S.; ARAIE, M.; SAKURAGAWA, N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. **J Neurosci Res**, v.62, p.585–590, 2000.

URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; L'ABBATE, A. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study os amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. **Mol Reprod Dev**, v.5, n.78, p.361-73, 2011.

VIOLINI, S.; RAMELLI, P.; PISANI, L.F.; GORNI, C.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells embryo stem cell markers and show the ability for fenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. **BMC Cell Biol**, v.10, p.172-80, 2009.

WENCESLAU, C.V.; MIGLINO, M.A.; MARTINS, D.D.; AMBRÓSIO, C.E; LIZIER, N.F.; PIGNATARI, G.C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Eng Part A**, v.17, p.2165-76, 2011.

XU, H.H.; ZHAO, L.; DETAMORE, M.S.; TAKAGI, S.; CHOW, L.C. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. **Tissue Eng Part A**, v.16, p.2743-53, 2010.

YING, Q.L.; NICHOLS, J.; EVANS, E.P.; SMITH, A.G., Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**, v.416, n.6680, p.545–548, 2002.

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

ZHANG, H.T.; FAN, J. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. **Differentiation**, v.79, p.15-20, 2010.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-Renal research**, v. 1, p. 3-14, 2006.