UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA DE OLIVEIRA PINHEIRO

**Caracterização e função imunomoduladora de células-tronco de membrana
amniótica canina**

Pirassununga

2018

ALESSANDRA DE OLIVEIRA PINHEIRO

**Caracterização e função imunomoduladora de células-tronco de membrana
amniótica canina**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Pirassununga

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Oliveira Pinheiro, Alessandra
OP654c Caracterização e função imunomoduladora de células-
tronco de membrana amniótica canina / Alessandra
Oliveira Pinheiro ; orientador Carlos Eduardo
Ambrósio. -- Pirassununga, 2018.
101 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Células-tronco. 2. Membrana amniótica. 3.
Imunomodulação. I. Ambrósio, Carlos Eduardo, orient.
II. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação imunomoduladora de células-tronco mesenquimais de membrana amniótica canina através de cocultivo de células dendríticas", protocolado sob o CEUA nº 4598140116, sob a responsabilidade de Alessandra De Oliveira Pinheiro - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP em reunião de 24/02/2016.

We certify that the proposal "Immunomodulatory assessment of mesenchymal stem cells of canine amniotic membrane through cocultivation with dendritic cells", utilizing 25 Dogs (males and females), protocol number CEUA 4598140116, under the responsibility of Alessandra De Oliveira Pinheiro - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering of São Paulo University in the meeting of 02/24/2016.

Vigência da Proposta: de 10/2015 a 06/2017

Área: Medicina Veterinária

Procedência: Não aplicável

Espécie: Cães

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: 1-5 anos

N: 5

Linhagem: SRD

Peso: variado

Procedência: Não aplicável

Espécie: Cães

Gênero: Machos e Fêmeas

Idade: fetos de 35-45 dias

N: 20

Linhagem: SRD

Peso: variado

Nota: Células-tronco são células indiferenciadas que possuem características de autorrenovação e diferenciação, podendo ser classificadas quanto sua origem em células-tronco embrionárias ou somáticas e quanto sua potencialidade em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Dentre as células somáticas podemos destacar as células-tronco mesenquimais (MSCs), que são células capazes de proporcionar a reparação tecidual através da estimulação de células que secretam substâncias que induzem células indiferenciadas a se diferenciarem no tecido lesionado, além de secretarem citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento que podem proporcionar uma resposta imunomoduladora. As células-tronco mesenquimais derivadas de âmnio (AMSCs) são células multipotentes com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. Na área da medicina humana, diversas células de anexos fetais foram isoladas e caracterizadas previamente, demonstrando vantagens quanto ao método de coleta, formação de banco de células e aplicação em terapias celular devido suas propriedades imunomoduladoras e regenerativas. Devido à possibilidade de se estabelecer uma linhagem celular com propriedades imunomoduladoras, o objetivo deste trabalho é caracterizar e determinar o potencial imunomodulador de células-tronco de âmnio canino in vitro, que possa futuramente beneficiar no tratamento de diversas doenças autoimunes que acometem os animais domésticos e humanos.

Pirassununga, 15 de março de 2016

Daniel dos Santos Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo

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

Pirassununga, 04 de outubro de 2017
CEUA N 4598140116

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Alessandra De Oliveira Pinheiro
Área: Medicina Veterinária
Carlos Eduardo Ambrósio (orientador)

Título da proposta: "Caracterização e função imunomoduladora de células-tronco de membrana amniótica canina".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FZEA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 31/agosto/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O título do projeto foi alterado devido alterações na metodologia sugeridas no exame de qualificação."

Comentário da CEUA: "Esta CEUA FZEA aprova a alteração de dados.".

Prof. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

ALESSANDRA DE OLIVEIRA PINHEIRO

**Caracterização e função imunomoduladora de células-tronco de membrana
amniótica canina**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Biociência Animal.

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

Prof. (a) Dr. (a) _____

Instituição: _____

AGRADECIMENTOS

O que dizer nesse momento de grande felicidade, em que concluo uma etapa de minha vida que foi sonhada e batalhada...

Diante à todas as dificuldades e exigências familiares, ergui a cabeça....enfrentei.....e vim! Estou hoje aqui, na busca crescente e insistente que não se aquieta e que me move ao desconhecido.

Foram muitas pessoas que direta ou indiretamente estiveram envolvidas nesse crescimento pessoal e profissional, pois também pude aprender a ser uma pessoa melhor mesmo nos momentos de adversidade.

Nesse momento gostaria de agradecer primeiramente a pessoa que acreditou em mim e abriu as portas, dando-me a oportunidade de crescer... meu Orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, muito obrigada pela atenção, carinho e oportunidade de crescimento profissional, me guiando neste caminho fabuloso do conhecimento....

À Vanessa Oliveira querida amiga que me recebeu desde o início de minha trajetória, apresentando-me o mundo das células-tronco...até então invisível para mim....

À Valéria Carregaro, querida amiga metódica e detalhista, que sempre me ajudou nas escolhas e caminhos deste trabalho, e que além disso, sempre foi uma grande conselheira nos momentos de dificuldade profissional e pessoal.

Aos companheiros de grupo e do Laboratório de Células-Tronco e Terapia Gênica que me auxiliaram em muitos momentos durante a execução deste experimento... Aline Fernanda, Rafael Karan, Lina, Jéssica, Ingridy e Kelly Roballo....opa!!! não poderia esquecer... Luciana “doida”, amiga para todas horas que conquistou meu coração e sempre terá um cantinho especial nele....e entre outros que mesmo indiretamente somaram conhecimento neste trabalho, meu muito obrigado!

À Prof^a Fabiana Bressan, que me ajudou nos momentos decisivos deste trabalho.

À minha amiga e companheira de profissão Juliana Casals, que me surpreende a cada dia com seu amor ilimitado aos animais, obrigada por toda

colaboração neste trabalho, mesmo sabendo que houve momentos dolorosos para você, agradeço profundamente por sua ajuda!

À minha querida mãe Maria Luiza, que mesmo sabendo de todos os desafios que já enfrentei em minha vida, sempre acreditou em mim, mesmo não tendo a oportunidade de realizar meu sonho antes, devido nossas dificuldades, ela sempre soube que não desistiria...e hoje estou aqui encerrando mais uma fase de minha vida com extrema alegria e sensação de dever cumprido.

Ao meu pai pela compreensão em aceitar minha ausência, que mesmo demonstrando imparcialidade, sinto que torce por mim sempre.

À minha família, Giusepy, Sophia e Lorena...meu muito obrigada por estarem presentes em todos os momentos dessa conquista.

Aos animais utilizados neste experimento, pois espero que no futuro este trabalho possa ajudar outros animais e que possa compensar sua preciosa doação em prol à ciência.

E agradeço principalmente a Deus, pela minha saúde, disposição e pela oportunidade de colocar todas estas pessoas maravilhosas em meu caminho, com as quais pude aprender muito e crescer como pessoa.

Agradeço a agência financiadora CAPES pelo suporte financeiro ao projeto.

DEDICATÓRIA

*Às minha querida filha Sophia, que soube ser compreensiva nas muitas horas que não pude
estar ao seu lado...*

*À minha querida filha Lorena, que me acompanhou em meu ventre, nos momentos decisivos
desse trabalho...*

E ao meu querido companheiro Giusepy, que sempre me apoiou durante esta caminhada.

*“A Grande Conquista é o resultado de pequenas vitórias que passam
despercebidas.”*

Paulo Coelho

RESUMO

PINHEIRO, A. O. **Caracterização e função imunomoduladora de células-tronco de membrana amniótica canina**. 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

A membrana amniótica é uma das membranas fetais presentes no período gestacional e que é considerada uma ferramenta potencial no tratamento de diversas patologias, como na cicatrização de feridas de pele e córnea, hérnias, cirurgias reconstrutivas e prevenção de aderências. As células-tronco (CT) obtidas de membrana amniótica apresentam alta taxa de proliferação e plasticidade, além de propriedades imunomoduladoras que participam no processo de tolerância materno-fetal. Devido à dificuldade e a escassez de estudos envolvendo a membrana amniótica humana em diferentes estágios gestacionais, optamos pela escolha do modelo canino, pois pode ser considerado um modelo ideal devido às semelhanças genéticas e fisiológicas com humanos. Baseado no potencial das CT de membrana amniótica, os objetivos deste trabalho foram caracterizar as CT de membrana amniótica canina (MAC) em diferentes estágios gestacionais e avaliar a expressão de genes relacionados à imunomodulação. Para tanto, foram utilizados 20 fetos caninos, sem raça definida com três idades gestacionais, terço inicial (20-30 dias) ($n=7$), terço médio (31-45 dias) ($n=7$) e terço-final (46-63 dias) ($n=6$), oriundos de programas de castrações. As células das MAC foram caracterizadas por meio de testes de viabilidade celular, curva de crescimento, unidade formadora de colônia (UFC-F), diferenciação *in vitro*, imunofenotipagem celular e potencial pluripotente. Para avaliação dos aspectos imunomoduladores, as células foram submetidas a RT-qPCR, com intuito de determinar a expressão gênica de *IDO*, *HGF*, *EGF*, *PGE2*, *IL-6* e *IL10*. Como resultados, as células de MAC apresentaram morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico com viabilidade celular de 83,3% em terço inicial, 80,1% em terço médio e 75,22% em terço final. Na análise da curva de crescimento, as células apresentaram pico de crescimento em segunda passagem, com posterior queda e uma tendência estacionária. Na UFC-F, obtivemos uma média de 145 colônias em terço inicial, 142,3 colônias em terço médio e 127,3 colônias em terço final. Na

diferenciação *in vitro*, as células se diferenciaram em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas após 21 dias de cultivo celular. Na imunofenotipagem celular, as células de terço inicial obtiveram marcação de CD90 (31,7%), CD105 (5,6%), CD34 (0,3%) e CD45 (0,4%), terço médio de CD90 (36,7%), CD105 (6,3%), CD34 (0,2%) e CD45 (0,4%), terço final CD90 (67,1%), CD105 (96,4%), CD34 (4,4%) e CD45 (2,0). Na avaliação imunomoduladora, observamos a expressão qualitativa dos genes *IDO*, *HGF*, *EGF*, *PGE2* e a não expressão dos genes *IL-6* e *IL-10*. Na expressão quantitativa, houve somente a expressão do gene *IDO*, com maior expressão em terço médio e final. Neste contexto, concluímos que as células de MAC de diferentes estágios gestacionais apresentam características compatíveis com CT mesenquimais e que a idade gestacional de terço final apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: Âmnio. Cão. Células-tronco. Citocinas. Imunomodulação.

ABSTRACT

PINHEIRO, A. O. **Characterization and immunomodulatory function of canine amniotic membrane stem cells.** 2018. 97 f. Thesis (Doctorate in Science) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.

The amniotic membrane is one of the fetal membranes present during gestation and it is considered a potential tool to treat many pathologies. Stem cells (SC) from the amniotic membrane present a high proliferation and plasticity ratio, in addition to immunomodulatory properties that participate in the mother-fetus tolerance process. Due to high difficulty and lack of research involving human amniotic membrane at different gestational stages we chose to use a canine model, as it can be considered an ideal model due to genetic and physiological similarities to humans. Based on the potential properties of the amniotic membrane SC, the purpose of this research was to characterize the SC from the canine amniotic membrane (CAM) in different gestational stages and determine its immunomodulatory potential in vitro. To do so, we studied 20 canine fetuses with no established race in the first third of gestational stage (20-30 days) ($n=7$), second third (31-45 days) ($n=7$) and final third (46-63 days) ($n=6$), from local castration programs. CAM cells were characterized through cellular viability tests, growth curve, colony-forming unit (CFU), in vitro differentiation and cellular immunophenotyping. To assess the immunomodulatory aspects the cells were submitted to RT-qPCR to determine genic expressions from IDO, HGF, EGF, PGE2, IL-6 and IL-10. As a result, CAM cells presented fibroblastoid morphology, adherence to plastic and cell viability of 83,3% in the first third, 80,1% in the second third and 75,22% in the final third of the gestational stage. In the growth curve analysis, the cells presented a higher growth in the second passage, with subsequent drop and stationary tendency. In the CFU we obtained an average of 145 colonies in the first third, 142,3 in the second third and 127,3 colonies in the final third of the gestational stage. In in vitro differentiation the cells differentiated in adipogenic, osteogenic and chondrogenic strains after 21 days of cellular culture. In cellular immunophenotyping, the cells from the first gestational stage expressed the following markers: CD90 (31,7%), CD105 (5,6%), CD45 (0,4%) and CD34 (0,3%); cells from

the second gestational stage expressed CD90 (36,7%), CD 105 (6,3%) CD45 (0,4%) and CD34 (0,2%) and lastly cells from the final gestational stage expressed CD105 (96,4%), CD90 (67,1%), CD34 (4,4%) and CD45 (2,0%). In the immunomodulator evaluation we observed qualitative expression of genes IDO, HGF, EGF, PGE2 and no expression of genes IL-6 and IL-10. In the quantitative expression, we only found IDO gene expressed, with higher expression in the second and final thirds. In this context we can conclude that MAC cells from different gestational stages present characteristics consistent with mesenchymal SC and that the final gestational stage presented better results. We also concluded that gestational age is a key factor that can influence the functional and immunomodulatory properties of cells in cell therapy.

Keywords: Amnion. Dog. Stem cell. Cytokines. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho experimental do projeto.....	40
Figura 2 – Etapas de coleta e processamento de MAC.....	42
Figura 3 - Estimulação das células de medula óssea e MAC em diferentes estágios gestacionais.....	53
Figura 4 – Coleta de amostra de MAC em diferentes idades gestacionais.....	58
Figura 5 – Representação gráfica do perfil de crescimento das células-tronco de MAC.....	59
Figura 6 - Placas com formação de colônias nas três idades gestacionais.....	61
Figura 7 - Diferenciação adipogênica.....	62
Figura 8 - Diferenciação osteogênica.....	63
Figura 9 - Diferenciação condrogênica.....	64
Figura 10 - Análise da citometria de fluxo das MAC de terço inicial	65
Figura 11 - Análise da citometria de fluxo das MAC de terço médio.....	66
Figura 12 - Análise da citometria de fluxo das MAC de terço final.....	67
Figura 13 - Quantificação da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de MAC de diferentes estágios gestacionais por análise de citometria de fluxo.....	68

Figura 14 - Expressão do transcrito do gene de pluripotência SOX-2 nas MAC de diferentes idades gestacionais.....	69
Figura 15 - Análise da citometria de fluxo das células de medula óssea canina.....	71
Figura 16 - Análise da citometria de fluxo de tecido adiposo canino.....	72
Figura 17 – Quantificação da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de medula óssea e tecido adiposo canino por análise de citometria de fluxo.....	73
Figura 18 - Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de medula óssea canina.....	74
Figura 19 - Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de MAC.....	74
Figura 20 - Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de MAC.....	75
Figura 21 – Expressão do transcrito do gene de <i>IDO</i> na MAC de diferentes idades gestacionais.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das MAC.....	42
Tabela 2 - Composição do meio de criopreservação celular.....	43
Tabela 3 - Especificação dos anticorpos utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em células-tronco de MAC.....	48
Tabela 4 - Sequências de primers utilizados na avaliação de expressão de genes de marcadores de pluripotência de MAC.....	50
Tabela 5 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo de tecido adiposo canino.....	51
Tabela 6- Composição do meio de cultura utilizado para cultivo da medula óssea canina	52
Tabela 7 - Primers utilizados na avaliação de expressão de genes de citocinas e fatores de crescimento.....	54
Tabela 8 - Relação dos valores de células viáveis antes e após processo de criopreservação.....	59
Tabela 9 - Média do número de UFC-F por idade gestacional.....	61
Tabela 10 - Média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$) do transcrito do gene SOX-2 de células-tronco de MAC em diferentes estágios gestacionais, pela técnica de RT-qPCR.....	69
Tabela 11 – Expressão gênica dos transcritos por PCR convencional.....	75

Tabela 12 - Média $\pm$ desvio padrão ($M \pm DP$) do transcrito do gene <i>IDO</i> de células-tronco de MAC em diferentes estágios gestacionais pela técnica de RT-qPCR.....	77
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CT – Células-tronco

MAC – Membrana amniótica canina

CTM – Células-tronco mesenquimais

UFC-F – Unidade formadora de colônias

RT-qPCR – Reação pela polimerase em cadeia em tempo real

PCR convencional – Reação polimerase em cadeira convencional

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenase

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

EGF – Fator de crescimento endotelial

PGE-2 – Prostraglandina 2

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

INF- γ – Interferon gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Membranas fetais.....	25
2.2	Células-tronco (CT)	27
2.2.1	Conceito e Classificação	27
2.2.2	Células-tronco mesenquimais (CTM).....	28
2.2.3	Membrana amniótica e CTM	29
2.2.4	Sistema Imunológico: Resposta Imunomoduladora das CT	31
3	HIPÓTESE	38
4	OBJETIVO GERAL.....	38
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
5.	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	DESENHO EXPERIMENTAL	40
5.2	LABORATÓRIOS.....	41
5.3	EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CT DE MAC.....	41
5.3.1	Estabelecimento do cultivo celular.....	41
<i>5.3.1.1</i>	<i>Obtenção dos animais.....</i>	<i>41</i>
<i>5.3.1.2</i>	<i>Coleta, isolamento e cultivo de MAC.....</i>	<i>41</i>
5.3.2	Repique celular.....	42
5.3.3	Criopreservação.....	43
5.3.4	Viabilidade celular.....	44
5.3.5	Curva de crescimento	44
5.3.6	Avaliação da Unidade Formadora de Colônias (UFC-F).....	45
5.3.7	Diferenciação <i>in vitro</i>.....	45
<i>5.3.7.1</i>	<i>Diferenciação adipogênica.....</i>	<i>46</i>
<i>5.3.7.2</i>	<i>Diferenciação osteogênica.....</i>	<i>46</i>
<i>5.3.7.3</i>	<i>Diferenciação condrogênica.....</i>	<i>46</i>
5.3.8	Métodos celulares.....	47
<i>5.3.8.1</i>	<i>Citometria de fluxo.....</i>	<i>47</i>
5.3.9	Métodos moleculares.....	48
<i>5.3.9.1</i>	<i>Extração de RNA e síntese de cDNA.....</i>	<i>48</i>

5.3.9.2	<i>Reação pela polimerase em cadeia (PCR) convencional.....</i>	49
5.3.9.3	<i>Reação pela polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR).....</i>	49
5.4	EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOMODULADORA.....	50
5.4.1	<i>Isolamento das populações de CT de tecido adiposo canino.....</i>	50
5.4.1.1	<i>Obtenção dos animais.....</i>	50
5.4.1.2	<i>Coleta, isolamento e cultivo de CT de tecido adiposo canino.....</i>	50
5.4.2	<i>Isolamento das populações de CT de medula óssea canina.....</i>	51
5.4.2.1	<i>Obtenção dos animais.....</i>	51
5.4.2.2	<i>Coleta, isolamento e cultivo de CT de medula óssea canina.....</i>	51
5.4.3	Citometria de Fluxo de CT de tecido adiposo e medula óssea caninos	52
5.4.4	Estimulação de CT de membrana amniótica e medula óssea caninos.	53
5.4.5	Caracterização da capacidade imunomoduladora.....	54
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6	RESULTADOS.....	57
6.1	EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CT DE MAC.....	57
6.1.1	Estabelecimento do cultivo celular.....	57
6.1.1.1	<i>Coleta, isolamento e cultivo de MAC.....</i>	57
6.1.2	Criopreservação e viabilidade celular.....	58
6.1.3	Curva de crescimento	59
6.1.4	Avaliação da capacidade de formação de colônias (UFC-F)	60
6.1.5	Diferenciação <i>in vitro</i>	62
6.1.5.1	<i>Diferenciação Adipogênica.....</i>	62
6.1.5.2	<i>Diferenciação Osteogênica</i>	63
6.1.5.3	<i>Diferenciação condrogênica.....</i>	63
6.1.6	Métodos celulares.....	65
6.1.6.1	<i>Citometria de fluxo.....</i>	65
6.1.7	Métodos moleculares.....	68
6.2	EXPERIMENTO 2 - Avaliação da resposta imunomoduladora.....	69
6.2.1	Isolamento das populações de CT de tecido adiposo canino.....	69
6.2.1.1	<i>Coleta, isolamento e cultivo de CT de tecido adiposo canino.....</i>	69
6.2.2	Isolamento das populações de CT de medula óssea canina	70
6.2.3.2	<i>Coleta, isolamento e cultivo de CT de medula óssea canina.....</i>	70

6.2.4	Citometria de Fluxo de CT de medula óssea e tecido adiposo canino..	70
6.2.5	Estimulação de CT de membrana amniótica e medula óssea canina...	73
6.2.6	Caracterização da capacidade imunomoduladora.....	73
6.2.6.1	<i>Reação pela polimerase em cadeia (PCR) convencional.....</i>	<i>73</i>
6.2.6.2	<i>Reação pela polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR).</i>	<i>76</i>
7	DISCUSSÃO.....	79
8	CONCLUSÃO.....	88
	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXOS.....	101
	Anexo A - Artigo submetido.....	101

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas que possuem características de autorrenovação e diferenciação, que confirmam seu potencial terapêutico e as perspectivas de uma medicina regenerativa altamente promissora, sendo classificadas de acordo com sua origem em embrionárias ou somáticas (BYDLOWSKI et al., 2009; MARTI; RIBEIRO; HAMERSCHLAK, 2011; VITA et al., 2012).

As CT embrionárias possuem características de pluripotência e são isoladas a partir da massa interna dos blastocistos ou células germinativas primordiais de um embrião. As CT somáticas são consideradas células multipotentes isoladas de tecidos adultos e são classificadas em células hematopoiéticas e mesenquimais (BYDLOWSKI et al., 2009).

A caracterização de novos tipos de CT é um passo importante e necessário antes que o uso em estudos clínicos seja amplamente empregado (RUSSELL et al., 2016). Até o momento, existem mais de 800 ensaios clínicos em humanos relacionados às células-tronco mesenquimais (CTM), além do fato de que seu uso em animais que vem sendo ativamente aplicado como recurso terapêutico, embora não tenha sido oficialmente aprovado como método terapêutico (AYALA-CUELLAR et al., 2018). Mesmo assim, a exploração de fontes alternativas já proporcionaram muitos avanços na área da engenharia celular, principalmente para o tratamento de doenças degenerativas, imunomediadas (SÁNCHEZ-BERNÁ; SANTIAGO-DÍAZ; JIMÉNEZ-ALONSO, 2015), hematológicas, neurológicas, cardiovasculares e traumáticas (OKAMOTO; CAMPOS, 2004; CARMO; SANTOS, 2009).

A membrana amniótica é um dos anexos fetais presentes durante a gestação e que é composta por células epiteliais e CTM. Surgiu como uma ferramenta potencial para aplicações clínicas e tem sido usada como tratamento reparador na cicatrização de feridas de pele e de córnea, hérnia abdominal, cirurgia de reconstrução vaginal, prevenção de aderências cirúrgicas e fechamento de pericárdio (FAVARON et al., 2015).

Na medicina regenerativa, CTM derivadas do líquido amniótico, membrana amniótica, sangue do cordão umbilical e tecido de cordão umbilical já foram

previamente isoladas e caracterizadas em humanos e diversas espécies animais, e são utilizadas experimentalmente no tratamento de diversas patologias (VITA et al., 2012; FILIORI URANIO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

A idade gestacional parece ser um fator-chave capaz de influenciar nas propriedades morfológicas e funcionais das CT de membrana amniótica, o que pode afetar os resultados das terapias. Na área de medicina veterinária, existem poucas informações relacionadas à imunomodulação de CTM, não existindo publicações sobre as propriedades imunomoduladoras de células-tronco de membrana amniótica canina (MAC) (BARBONI et al., 2014; SAULNIER et al., 2016).

Devido à ausência de estudos em humanos envolvendo as diferenças fenotípicas e funcionais entre CT isoladas de membrana amniótica em diferentes estágios gestacionais, o modelo canino oferece vantagens devido à disponibilidade de amostras e as semelhanças genéticas e fisiológicas com humanos (BARBONI et al., 2014; LANGE et al., 2016).

Mediante a importância das propriedades imunomoduladoras da CTM e a escassez de estudos envolvendo as CT de MAC em diferentes fases gestacionais, os objetivos deste trabalho foram caracterizar a MAC em diferentes idades gestacionais e avaliar os genes relacionados a imunomodulação, com o intuito de estabelecer uma linhagem celular capaz de ser utilizada futuramente no tratamento de diversas doenças autoimunes que acometem os animais domésticos e humanos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEMBRANAS FETAIS

A progressão da fertilização de um oócito até o nascimento de um cão recém-nascido é um fenômeno notável que ocorre num período aproximado de 60 dias. O desenvolvimento embrionário abrange o período de tempo em que os três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme) se diferenciam em diversos tecidos que formam os sistemas do organismo (PRETZER, 2008).

O período de desenvolvimento fetal do cão é dividido em três fases: o período do oócito (dias 2-17) que se inicia com a fertilização e é caracterizada pela formação de um blastocisto que migra para o útero; o período de embrião (dias 19-35) que ocorre com a implantação no útero e consequente término da organogênese e período de feto (dias 35 até o nascimento), quando os órgãos genitais externos estão diferenciados e os órgãos e o corpo são totalmente formados (PHEMISTER, 1974; PIERI et al., 2015).

Para a manutenção da gestação é necessário uma tolerância materno-fetal, que não ocorre simplesmente pela barreira anatômica (placenta) formada entre os linfócitos maternos e o feto e nem devido à imaturidade do sistema imunológico do feto. Essa tolerância é proporcionada pela liberação de hormônios, como a progesterona e o estrogênio, e citocinas que modulam o sistema imunológico materno, causando diminuição de linfócitos T e outras células envolvidas no processo inflamatório (MUNN et al., 1998).

Para o desenvolvimento do conceito em animais domésticos é necessário que ocorra a formação de um órgão transitório denominado placenta, além de membranas fetais que desempenham funções específicas. A placenta é um órgão materno fetal compreendido por duas estruturas: a porção fetal originária do saco coriônico e uma porção materna derivada do endométrio. A parte fetal da placenta e as membranas fetais separam o embrião ou feto do endométrio materno. É uma estrutura altamente vascularizada que possui como principais funções a proteção, respiração, nutrição, excreção e produção de hormônios. O transporte de

substâncias ocorre entre a circulação materna e fetal sem que ocorra a mistura de sangue (GARTNER; HIATT, 1993; MOORE; PERSAUND, 2008a).

Os cães possuem uma placenta zonária que envolve o feto e uma organização complexa de tecidos maternos e fetais com a presença de uma região de coloração verde, delimitando a cinta placentária central. Quanto à circulação com os tecidos maternos, ela é classificada como endotéliocoreal, ou seja, durante o parto, o tecido uterino é perdido e o endotélio maternal mantém íntimo contato com o córion (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004; WOODING; BURTON, 2008). Além disso, como o tecido materno é perdido no parto, a placenta de carnívoros é classificada em decídua (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

As membranas fetais, denominadas córion, saco vitelino, âmnio e alantoide, são estruturas presentes durante o período gestacional que desempenham papéis essenciais ao desenvolvimento, como proteção, respiração, nutrição e excreção (MOORE; PERSAUD, 2008b; FAVARON et al., 2015). O saco vitelino é uma membrana que consiste de uma saculação que desempenha um papel importante para a sobrevivência inicial do embrião, atuando como fonte de nutrição durante o período em que a placenta verdadeira ainda não está completamente formada (MIGLINO et al, 2006). Com a formação da placenta, inicia-se a transferência de nutrientes, início da formação do sangue e do intestino primitivo do conceito (MOORE; PERSAUD, 2008a).

O alantoide surge como um divertículo que se estende da parede caudal do saco vitelino para o pedículo do embrião e que está envolvido nos primórdios da formação sanguínea, associação com o desenvolvimento da bexiga e formação dos vasos sanguíneos do cordão umbilical (artérias e veias umbilicais) (MOORE; PERSAUND, 2008b).

O âmnio é a membrana extraembrionária mais interna, composta por uma fina membrana, elástica, translúcida e semi-permeável, derivado do ectoderma que recobre o feto e está ligada intimamente a membrana coriônica. Essas membranas formam o saco amniótico que é preenchido pelo líquido amniótico, cuja principal função é proteger o feto (WILSHAW et al., 2006; FERNANDES et al., 2012; FAVARON et al., 2015).

Em cães, gatos, equinos, ruminantes e suínos, o tecido mais fácil de acessar é o alantoide, porque é mais externo ao conceito, enquanto em humanos e

roedores a membrana amniótica é mais prontamente obtida (FERNANDES et al., 2012; VIDANE et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

2.2 CÉLULAS-TRONCO (CT)

2.2.1 Conceito e Classificação

Nos últimos anos, diversos tipos celulares estão sendo utilizado como fonte de CT. As CT são células indiferenciadas que possuem como principais características a autorrenovação e a diferenciação em diversos tipos celulares de acordo com as condições do microambiente (BYDLOWSKI et al., 2009). Podem ser classificadas quanto ao seu grau de potencialidade em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, e quanto à sua origem como embrionárias, somáticas ou fetais (VITA et al., 2012).

As embrionárias são células pluripotentes isoladas da massa interna dos blastocistos ou a partir de células germinativas primordiais de um embrião no início de seu desenvolvimento. Possuem como principal característica a capacidade de pluripotência, o que as permite originar qualquer tipo celular, tecido ou sistema do organismo em formação, podendo ser expandidas *in vitro* sem que ocorra perda da potencialidade e da capacidade de autorrenovação (STOCUM, 2001; BYDLOWSKI et al., 2009).

As CT somáticas são consideradas células multipotentes que possuem potencial de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares, sendo classificadas em CT hematopoiéticas e mesenquimais. Estão presentes em diversos tecidos, principalmente os que apresentam alta taxa de proliferação celular, apresentando características favoráveis que promovem a renovação tecidual e reparação celular. São consideradas relevantes no uso da terapia celular devido a sua simplicidade de isolamento, cultivo e formação de banco de células (DOMINICI et al., 2006; CARMO; SANTOS, 2009; NERY et al., 2013).

Nos anexos placentários, diferentes linhagens celulares podem ser obtidas. A linhagem hematopoiética pode ser isolada do córion, alantoide e saco vitelino, e a linhagem mesenquimal pode ser isolada no córion, âmnio e saco vitelino (FERNANDES et al., 2012).

Na medicina regenerativa, CTM derivadas do líquido amniótico, membrana amniótica, sangue do cordão umbilical e tecido de cordão umbilical já foram previamente isoladas e caracterizadas em humano e em diversas espécies animais, demonstrando vantagens em sua utilização devido à alta plasticidade, alta taxa de proliferação, capacidade de se diferenciar em diversas linhagens celulares, baixa imunogenicidade e efeitos imunomoduladores, além da coleta não invasiva e possibilidade de formação de bancos de armazenamento (VITA et al., 2012; FILIORI URANIO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016).

2.2.2 Células-tronco mesenquimais (CTM)

As CTM são células adultas multipotentes que podem ser isoladas a partir de tecidos como a medula óssea, tecido adiposo, fígado, fluído amniótico, pulmão, músculo esquelético e rim. Estas possuem potencial em se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares (DOMINICI et al., 2006; YI e SONG, 2012; NERY et al., 2013; WANG et al., 2014; ZACHAR; BAČENKOVÁ; ROSOCHA, 2016).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as células-tronco podem ser caracterizadas de acordo com três critérios: 1) devem apresentar aderência ao plástico, 2) serem capazes de se diferenciarem *in vitro* em linhagem de condrócitos, adipócitos e osteócitos; e 3) devem expressar marcadores de membrana positivos para CD105, CD73 e CD90 e marcadores negativos para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e *Human Leukocyte Antigen* (HLA-DR) (DOMINICI et al., 2006; NERY et al., 2013).

As propriedades tróficas primárias das CTM são a secreção de fatores de crescimento e outras quimiocinas que induzem a proliferação celular e angiogênese, como o fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento beta (TGF- β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento epitelial (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF) e a angiopoietina-1 (HAYNESWORTH; BABER; CAPLAN, 1996; CHEN et al., 2008). Além disso, são capazes de estimular as células locais a secretarem substâncias que induzem células não diferenciadas a realizarem o processo de reparação tecidual (MONTEIRO et al., 2010).

As CTM são células que possuem capacidade imunomoduladora, que ampliam as possibilidades terapêuticas. São capazes de secretar uma grande variedade de citocinas pró e anti-inflamatórias que podem proporcionar a modulação da resposta inflamatória (MONTEIRO; ARGOLO NETO; DEL CARLO, 2010). Além de propriedades imunomoduladoras que são demonstradas pela inibição da secreção de citocinas, são capazes de inibir a maturação de linfócitos T à partir das células dendríticas, a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e diminuir o potencial citotóxico dos linfócitos T (MARTI; RIBEIRO; HAMERSCHLAK, 2011).

Inicialmente, o estudo do mecanismo de ação das CTM era basicamente restrito a migração de células aos locais de lesão e restauração de tecidos danificados. No entanto, a ausência de evidências de sua capacidade de diferenciação *in vivo*, levaram os pesquisadores a focarem nos mecanismos alternativos na reparação tecidual, como ação parácrina de fatores de crescimento, citocinas e hormônios secretados, as interações de célula-células mediados por nanotubos de tunelamento (TNTs) e liberação de vesículas extracelulares (SPEES; LEE; GREGORY, 2016; AYALA-CUELLAR et al., 2018).

As CTM são consideradas relevantes no uso em terapia celular devido a sua simplicidade de isolamento, baixo risco de indução de neoplasias e possibilidade de transplantes alógenos. São caracterizadas por seu fenótipo e expressão de marcadores, que possibilitam sua purificação a partir de culturas de células heterogêneas (NERY et al., 2013). Em medicina veterinária, a terapia celular com CTM tem sido utilizada em grande escala com células de linhagens obtidas a partir da medula óssea e tecido adiposo canino (SAULNIER et al., 2016).

Além das características celulares citadas anteriormente em associação com seu alto índice de proliferação celular, as CTM tornam-se uma fonte promissória para o uso na engenharia celular e terapia celular (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; MACHADO; TELLES; NASCIMENTO, 2013; BORGHESI et al., 2017).

2.2.3 Membrana amniótica e CTM

O âmnio é um tecido delgado de textura firme que é preenchido por fluído e que possui a função de envolver o embrião e o feto (MOORE; PERSAUD, 2008a).

Em estágios iniciais é um tecido avascular, que em estágios mais avançados de gestação se torna vascularizado por vasos sanguíneos da membrana interna alantóide (MIGLINO et al., 2006).

Basicamente, a membrana amniótica é composta de dois tipos celulares. As células amnióticas epiteliais, de morfologia cuboide a colunar, de origem do ectoderma embrionário e que compõem a camada epitelial. O segundo tipo celular, é composto pelas células do estroma mesenquimal que são derivadas da mesoderme embrionária. Ambas as populações possuem marcadores semelhantes e possuem potencial para se diferenciarem *in vitro* nas principais linhagens mesodérmica (CHANG et al., 2010; DÍAZ PRADO et al., 2011).

O epitélio da membrana amniótica contém CT que se encontram aleatoriamente distribuídas na matriz extracelular, tendo uma origem mesodérmica extraembrionária. São ricas em fibras de colágeno e laminina e possuem um aspecto fibroblastóide. São células multipotentes com características que favorecem sua utilização, como baixa imunogenicidade e carcinogenicidade, produção de moléculas reguladoras do sistema imunológico, alta plasticidade e propagação em cultivo e presença de grande concentração de lisossomas (CHANG et al., 2010; CREMONESI; CORRADETTI; LANDE CONSIGLIO, 2011; VIDANE et al., 2014; FAITA et al., 2016; MAGATTI et al., 2016; MIKI et al., 2016; CARDOSO et al., 2016).

As CT de membrana amniótica, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico e sangue de cordão umbilical já foram isoladas e caracterizadas previamente em humanos (IN'TANKER et al., 2004) e em diversas espécies de animais, como cães (FILIOLI URÂNIO et al., 2011; PARK et al., 2012; FILIOLI URÂNIO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016) gatos (RUTIGLIANO et al., 2013; VIDANE et al., 2014; CARDOSO et al., 2016), bovinos (CAMPOS et al., 2017), ovinos (MAURO et al., 2010; BARBONI et al., 2014), equinos (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012), ratos (MARCUS et al., 2008), coelho (BORGHESI et al., 2017) e patos (MA et al., 2018) demonstrando vantagens em sua utilização e a possibilidade de formação de banco de células (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; IACONO; ROSSI; PAROLINI; CARUSO, 2011; MERLO, 2015; MIKI, 2016; CAMPOS et al., 2017).

Essas células possuem vantagens em relação às CT adultas, por preservarem características embrionárias, imunossupressoras e proliferativas, que

são confirmados pela expressão de marcadores embrionários como o OCT4 e NANOG, demonstrando capacidade em manter características de pluripotência dos tecidos de origem (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; VITA et al., 2012; SAULNIER et al., 2016). No entanto, o potencial de diferenciação dessas células *in vivo* ou *in vitro* é intermediário entre as CT embrionárias pluripotentes e as CT adultas multipotentes (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011).

Nos estudos com CT de membrana amniótica canina é relatada uma variação quanto ao seu potencial de proliferação, imunofenótipo e perfis moleculares. Estas diferenças podem estar relacionadas a diversos métodos de isolamento e cultivo, associados à escassez de reagentes caninos específicos, juntamente com a falta de controles experimentais apropriados (SAULNIER et al., 2016).

Devido à diversidade de resultados, facilidade da coleta, cultivo e formação de um banco de CT e as características desejáveis observadas como diferenciação *in vitro* nas três camadas germinais (endoderme, mesoderme e ectoderme) e capacidade imunomoduladora, essas células constituem uma fonte alternativa e promissora no uso em futuras terapias celulares e medicina regenerativa no modelo canino (DÍAZ PRADO et al., 2011; FILIOLI URÂNIO et al., 2011; PARK., 2012).

2.2.4 - Sistema Imunológico: Resposta Imunomoduladora das CT

O sistema imunológico é constituído por uma rede complexa de órgãos, células e moléculas que se relacionam e tem por finalidade, manter a homeostasia do organismo. A resposta imune desenvolvida frente a patógenos, traumas, substâncias estranhas, entre outros é baseada em uma sequência de eventos, que ocorrem em dois níveis básicos, a resposta imune inata e a adaptativa (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta imune inata, também conhecida como natural, constitui a primeira barreira de defesa do organismo e é composta por barreiras físicas, químicas e biológicas, por células especializadas e por moléculas solúveis (CRUVINEL et al., 2010). Já a imunidade adaptativa, é considerada uma resposta imunológica prolongada e eficaz, que tem por finalidade promover a defesa do organismo contra microrganismos extracelulares e intracelulares. Esse sistema é composto por células

especializadas como linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas, além de moléculas solúveis como anticorpos, citocinas e quimiocinas. As células do sistema imune expressam vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que são ativado quando detectam o perigo através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos específicos (PAMPs) o qual montam uma resposta imune específica diante ao patógeno (TIZARD, 2014; ABBAS; LICHTMAN, 2015; KUMAR, 2018).

As doenças autoimunes são um grupo de doenças causadas por alterações no sistema imunológico devido à sua ação ativa em diversos tecidos, que levam a quadros de inflamação crônica e complicações sistêmicas. Dentre as doenças autoimunes estudadas na atualidade que utilizam terapia celular com CTM, citam-se o Lúpus eritematoso sistêmico, Síndrome de Sjogren, Esclerose sistêmica, Doença de Chron e Esclerose múltipla (SÁNCHEZ-BERNÁ; SANTIAGO-DÍAZ; JIMÉNEZ-ALONSO, 2015), a doença enxerto-versus-hospedeiro (GVHD) (MELIEF et al., 2013), a encefalomielite autoimune experimental em camundongos (McDONALD et al., 2015) e a artrite induzida por colágeno em ratos (SHU et al., 2015).

As CTM possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tecidos *in vitro*, mas são suas funções tróficas, parácrinas e imunomoduladoras que podem ter a maior importância terapêutica *in vivo* (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013).

Mediante um contato direto das CTM com o tecido ou mediante a interação parácrina com interferon-gama (IFN- γ), produzido pelas células imune do organismo, elas são capazes de atuar sobre as células Natural Killer (NK), monócitos, neutrófilos e macrófagos, linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B, pela secreção de fatores solúveis como o fator de transformação do crescimento Beta (TGF- β), interleucina 10 (IL-10), interleucina 6 (IL-6), indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), prostaglandina 2 (PGE2), moléculas solúveis de leucócitos humano de antígeno-G (sHLA-G5) ou por interação de célula-célula (BENJAMINI; COICO; SUNSHINE, 2002; YI e SONG, 2012; KARIMINEKOO et al., 2016), além de impedirem a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (RASMUSSEN et al., 2007; MARTI; RIBEIRO; HAMERSCHLAK, 2011). Essas células são capazes de manter sua capacidade imunossupressora mesmo após processo de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e

osteogênica, mantendo-se adequadas no caso de transplantes, mesmo com MHC incompatíveis (IYER; ROJAS, 2008).

As CTM não são células espontaneamente imunossupressoras, mas requerem uma ativação para exercer seus efeitos imunomoduladores (ENGLISH et al., 2013). Para que as CTM realizem seu papel imunomodulador, elas precisam ser estimuladas por citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , lipopolissacarídeos (LPS) ou por meio da hipóxia celular (CRISOSTOMO et al., 2008; KRAMPERA et al., 2013; ZACHAR; BAČENKOVÁ; ROSOCHA, 2016).

Diversas substâncias participam do processo de imunomodulação e reparação tecidual (CURTI et al., 2009). Dentre elas, podemos destacar a enzima catabólica do triptofano IDO, que é uma enzima induzida pelo IFN- γ , que catalisa a conversão de triptofano em quinurenina. A IDO demonstra um papel crucial na indução da tolerância imunológica na infecção, gravidez, transplante, autoimunidade e neoplasias, incluindo malignidades hematológicas (BLANC; RINGDÉN, 2007; CURTI et al., 2009).

O IFN- γ está relacionado com a capacidade de estimular a produção de IDO pelas CTM, que por sua vez inibe a proliferação de células T ou NK ativadas (KRAMPERA et al., 2006). O IDO é capaz de transformar o triptofano, que é um aminoácido essencial para ativação de linfócitos T, em um produto tóxico no seu citoplasma, causando a apoptose dos linfócitos T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; BLANC; RINGDÉN, 2007; SAULNIER et al., 2016).

O HGF (fator de crescimento de hepatócitos) é um mitógeno de hepatócitos produzido pelas células estromais, que possui a capacidade de induzir a proliferação, motilidade, morfogênese e a angiogênese de células epiteliais em vários tecidos. Além disso, o HGF endógeno promove a autorreparação, proteção e diversos órgãos, através da liberação de substâncias antiapoptóticas e anti-inflamatórias (NAKAMURA; MIZUNO, 2010).

A família EGF (fator de crescimento epitelial) é compreendida por seis polipeptídeos estruturalmente relacionados. Todos os membros integrantes da família EGF se ligam ao receptor de EGFR, que está relacionado com as funções de crescimento, maturação, diferenciação e manutenção celular, desempenhando um papel importante na regulação da resposta a lesões em vários tecidos, como tecidos epiteliais e sistema nervoso (XIAN et al., 2007).

Apesar da expressão *in vivo* do EGF nas CTM não estar definido, vários estudos demonstram o papel do EGF na manutenção do potencial de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* (TAMAMA et al., 2006). Além disso, ocorre uma alta liberação de fatores de crescimento, incluindo o EGF pelas CTM da medula óssea em resposta a lesões no microambiente, sugerindo que estas células poderiam regenerar a lesão através da secreção de fatores de crescimento (XIAN, 2007).

A interleucina 6 (IL) -6 é uma citocina pleiotrópica que afeta não apenas o sistema imunológico, mas outros eventos fisiológicos em diversos órgãos e sistemas biológicos. Numa determinada célula alvo, essa interleucina é capaz de gerar simultaneamente sinais funcionais distintos ou mesmo contraditórios. O resultado final desses sinais pode explicar como a IL-6 acarreta efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios, dependendo do microambiente *in vivo* (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003). Em cocultivos de CT e leucócitos é possível identificar o aumento da expressão de IL-6, como resultado de uma resposta de linfócitos Th2 ou uma hepatopoiese induzida (KANG et al., 2008).

A IL-10 é uma citocina envolvida no controle das reações imunológicas inatas e da imunidade mediada por células. É produzida por muitas populações de células imunológicas, como macrófagos ativados, células dendríticas, células T regulatórias e células Th1 e Th2. É descrita como uma citocina anti-inflamatória que atua suprimindo as reações imunológicas mediadas por células. Ela inibe a produção de várias citocinas inflamatórias secretadas por macrófagos e células dendríticas ativadas, incluindo IL-1, TNF e IL-12 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A prostaglandina 2 (PGE2) é um pequeno mediador lipídico conhecido por ter um papel na modulação imunológica. A síntese de prostaglandinas, a partir da cascata do ácido araquidônico, envolve a produção de enzima COX (COX-1 e COX-2) e da prostaglandina H2. As CTM produzem PGE2 que é aumentada quando estimuladas pelo IFN- γ e TNF- α (ENGLISH et al., 2007). Entretanto, a liberação de PGE2 pelas CTM inibe a produção e secreção de TNF- α e de IFN- γ e estimula a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, além de inibir a produção de linfócitos T citotóxicos e citocinas pró-inflamatórias (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; NAUTA; FIBBE, 2007).

As CTM derivadas dos anexos fetais representam uma promessa terapêutica, através da inibição eficiente da expansão e ativação de diferentes componentes celulares da imunidade inata e adaptativa, através da redução do processo inflamatório e reparação de tecidos no tratamento de doenças autoimunes (MARTI; RIBEIRO; HAMERSCHLAK, 2011; SÁNCHEZ-BERNÁ; SANTIAGO-DÍAZ; JIMÉNEZ-ALONSO, 2015). Estas propriedades imunogênicas podem estar relacionadas ao fato da manutenção da gestação e a tolerância materno-fetal (EVANGELISTA; SONCINI; PAROLINI, 2008).

Dentre as células dos anexos fetais, as células de membrana amniótica, demonstram propriedades imunogênicas ausentes e produção de substâncias anti-inflamatórias e bactericidas que proporcionam seu uso no tratamento de feridas de pele, úlceras cutâneas e desordens oftálmicas como úlceras de córnea (DÍAZ PRADO et al., 2011; PAROLINI; CARUSO, 2011; PARK et al., 2012; ERTL et al., 2018;).

Em humanos, a membrana amniótica e o córion possuem efeitos angiogênicos, citoprotetores, imunomoduladores e reparadores, observados através da identificação de fatores solúveis como HGF, IGF-1, bFGF e VEGF e PGE2. Essas células são capazes de suprimir a proliferação de linfócitos T e B, as propriedades inflamatórias de monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células NK, e promover a indução de células com funções reguladoras tais como células T reguladoras e macrófagos M2 anti-inflamatórios (MAGATTI et al., 2009; YAMAHARA et al., 2014; MAGATTI et al., 2018) e de secretar a enzima IDO nas mesmas concentrações que a medula óssea humana (MEESUK et al., 2016). Estudos *in vitro*, demonstram que as células epiteliais de membrana amniótica suprimem a proliferação de células T, diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias e inibem a ativação de células T estimuladas. Estudos *in vivo* revelaram que essas células não apenas suprimem o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental, mas também previne a recidiva da doença em camundongos (McDONALD et al., 2015). Além disso, células de membrana amniótica e de cordão umbilical em humanos, cultivadas com linfócitos mistos demonstraram inibir significativamente a ativação e proliferação de linfócitos estimulados e promoveram a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias. Estes resultados comprovam a capacidade imunossupressora de CTM derivadas de anexos fetais *in*

vitro (OKERE et al., 2015; DABROWSKI et al., 2017a), embora as atividades imunogênicas e estimulatórias serem pouco estudadas na atualidade (MAGATTI et al., 2018).

As funções imunomoduladoras das CT de anexos fetais em cães são pouco compreendidas. Em cães, as células dos anexos fetais como membrana amniótica, placenta e matriz do cordão umbilical, demonstram propriedades semelhantes às CTM, onde após estimulação apresentam uma atividade imunomoduladora aumentada devido à elevação da taxa de IDO (SAULNIER et al., 2016).

Diante todas as vantagens referentes às CTM, a terapia celular é uma alternativa de tratamento de diversas patologias na medicina humana e veterinária, que contribui para o restabelecimento de tecidos lesionados em consequência de doenças ósseas, cardíacas, imunomediadas e neurodegenerativas. Mesmo diante ao fato de que na atualidade vários ensaios clínicos estarem em diversas fases de experimentação, questões importantes continuam aguardando comprovações científicas (NERY et al., 2013).

ΗΙΠΌΤΕΣΕ Ε ΟΒJΕΤΙVΟΣ

3 HIPÓTESE

As CTM derivadas de MAC nos diferentes estágios gestacionais possuem capacidade imunomoduladora *in vitro* após estimulação com IFN- γ .

4 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização das CTM de MAC em diferentes idades gestacionais e avaliar os genes relacionados à imunomodulação após estimulação com IFN- γ .

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- * Isolar, cultivar e formar um banco de MAC em diferentes idades gestacionais (terço inicial 20-30 dias, terzo médio 31-45 dias e terzo final 46-63 dias);
- * Caracterizar a MAC por meio dos testes de criopreservação, viabilidade celular, curva de crescimento, unidade formadora de colônia (UFC-F), diferenciação *in vitro* (linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas) e o perfil imunofenotípico das MAC por meio da técnica de citometria de fluxo quanto aos marcadores de células mesenquimais (CD105 e CD90) e marcadores de células hematopoiéticas (CD34 e CD45);
- * Avaliar a capacidade de pluripotência das MAC por meio da expressão do transcrito *OCT4* e *SOX-2* pela técnica de RT-qPCR;
- * Realizar a estimulação das MAC com IFN- γ e avaliar a expressão gênica dos transcritos por meio de PCR convencional e RT-qPCR da *IDO*, *IL-6*, *IL-10*, *HGF*, *EGF* e *PGE2*.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, sob protocolo CEUA nº 4598140116 emitido em 24/02/2016.

5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado de acordo com a figura 1 abaixo:

Figura 1 - Desenho experimental do projeto

Legenda: Desenho experimental do projeto.
Fonte: Própria autoria.

5.2 LABORATÓRIO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Células-tronco e Terapia Gênica na Unidade Didático Clínico Hospitalar da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – Pirassununga.

5.3 EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CT DE MAC

5.3.1 Estabelecimento do cultivo celular

5.3.1.1 Obtenção dos animais

Foram utilizados 20 fetos caninos em diferentes estágios gestacionais (terço inicial (20-30 dias) ($n=7$), terzo médio (31-45 dias) ($n=7$) e terzo final (46-63 dias) ($n=6$), provenientes de úteros gravídicos de cães sem raça definida (SRD), oriundos de programas de castrações nas clínicas das cidades próximas à Pirassununga-SP.

5.3.1.2 Coleta, isolamento e cultivo de MAC

Os fetos coletados foram fotografados e mensurados pela técnica de Crow-Rump (CR) preconizada por Evans e Sack (1973). Todo o procedimento foi baseado em Cardoso et al., (2016) em caninos e felinos e foi realizado em fluxo laminar. Inicialmente, as MAC foram separadas dos anexos embrionários e colocadas em placas de Petri (Figura 2A). As membranas foram lavadas em solução PBS (Phosphate Buffer Solution) com 5% de antibióticos penicilina/estreptomicina (Life. cat No 15140-122), macerada mecanicamente com auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de uma amostra homogênea em torno de 3 mm de diâmetro (Figura 2B). O material devidamente higienizado e macerado foi submetido ao processo de digestão enzimática com colagenase I (Sigma, cat. N° C2674-1G) e incubada em estufa a 38,5°C com umidade relativa de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ durante 1 hora e 30 minutos. Subsequentemente, as amostras de tecido foram inativadas com 1 mL de meio de cultura α MEM (Gibco, cat. N° 11900-024) e centrifugadas por 5 minutos em 303xg (Figura 2C). Logo após, o meio foi descartado

e o sedimento ressuspensionado e plaqueado em placas de Petri de 60 mm acrescido de 2 mL de meio de cultivo descrito na tabela 1 (Figura 2D-2E). As células foram mantidas a 38,5° C com umidade relativa próxima de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ (Figura 2F).

Figura 2 – Etapas de coleta e processamento de MAC

Legenda – A) Isolamento e coleta da membrana amniótica dos anexos fetais de fetos de terço final; B) Maceração mecânica das amostras; C) Centrifugação das amostras após digestão enzimática com Colagenase tipo I; D-E) Formação do sedimento e plaqueamento das células provenientes da membrana amniótica; F) Incubação das células em estufa.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo das MAC

Componente	Código	Porcentagem	50 mL
αMEM (Gibco)	11900-024	84%	42 mL
SFB (Invitrogen)	12657-029	15%	7,5 mL
Penicilina e Estreptomicina (Life)	15140-122	1%	500µL

Fonte: Própria autoria.

5.3.2 Repique celular

As células foram mantidas em incubadoras até atingirem confluência de 80 a 90% com posterior processo de repique celular por meio do uso da tripsina para remoção das células aderidas ao plástico (Tryple Express, Invitrogen, cat. N°

12604). O sobrenadante foi descartado e foi adicionado tripsina de acordo com o tamanho da placa de Petri. As placas com tripsina foram incubadas em estufa à 38,5°C por 10 minutos. Após este período, as placas foram analisadas sob microscópio invertido Labomed Modelo TCM400, para verificar se estavam soltas. Após completa desagregação celular, o conteúdo da placa foi transferido para um tubo cônico de 15 mL para posterior centrifugação durante 5 minutos a 303xg e o sobrenadante descartado. O sedimento resultante foi ressuspensionado em 1 mL do meio de cultivo para contagem celular e replaqueado em placa de Petri para retorno ao cultivo sob as mesmas condições descritas anteriormente ou foi destinado à criopreservação.

5.3.3 Criopreservação

As células destinadas ao processo de criopreservação foram distribuídas em uma densidade de 2×10^6 em criotubos com capacidade de 2 mL de meio de congelamento descrito na tabela 2. Primeiramente, foram adicionadas as células em meio α MEM suplementado com o SFB e, posteriormente, foi adicionado o DMSO (ERCOLIN et al., 2016).

Os tubos foram identificados conforme tipo celular, nome, data, passagem e levados para congelamento a -80° C, alocados em container de congelamento lento (Mr.frosty), conforme recomendações do fabricante, que permite a diminuição lenta da temperatura em -1° C por minuto. Após 24 horas, os tubos foram transferidos para o tanque com nitrogênio líquido no qual permaneceram armazenados e criopreservados por tempo indeterminado para posterior utilização.

Tabela 2 – Composição do meio de criopreservação celular

Componente	Código	Porcentagem	Para 2 mL
α DMEM (Gibco)	11900-024	45%	900 μ L
SFB (Invitrogen)	12657-029	45%	900 μ L
Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	D2650	10%	200 μ L

Fonte: Própria autoria.

5.3.4 Viabilidade celular

As MAC das três idades gestacionais foram criopreservadas em triplicatas na densidade de 4×10^4 células em primeira passagem. A contagem e a determinação da viabilidade celular foi realizada antes e após o congelamento, mediante a contagem de células vivas *versus* células mortas. Após uma semana de criopreservação, as amostras foram descongeladas, coradas com azul de tripan (1:1) e contadas com auxílio da câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi expressa em percentagem de células não coradas (viáveis) em relação às coradas (não viáveis) (ERCOLIN et al., 2016).

5.3.5 Curva de crescimento

Para avaliar a capacidade de propagação em cultivo e o perfil de replicação celular, foi utilizado o protocolo adaptado de Vidane et al. (2014) em felinos. Foram plaqueadas células em primeira passagem numa densidade de 3×10^4 por placa de Petri (35mm) em triplicatas. Após confluência celular, as células foram tripsinizadas e o número total determinado pela contagem celular.

Para a contagem celular, o meio foi retirado e 2 mL de tripsina foram adicionados, aguardando 10 minutos em estufa a $38,5^\circ \text{C}$ (para que as células aderidas fossem removidas do fundo). Logo após, as soluções foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e então adicionados 2 mL de meio de cultura para inativação da tripsina. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a $303 \times g$, com posterior descarte do sobrenadante e suspensão do sedimento celular em 1 mL de meio de cultura.

Com o auxílio de uma pipeta, o sedimento foi homogeneizado e 10 μL da solução foram colocados na Câmara de Neubauer para contagem celular. Foi realizada a contagem dos quatro quadrantes grandes das extremidades, sendo o total de células vivas multiplicado por 1 (diluição) e por 10^4 (profundidade da câmara e correção por mL), dividindo-se este valor pelo número de quadrantes contados, conforme descrito abaixo. Após a contagem, as quantidades foram anotadas para posterior análise gráfica.

$$\frac{\text{Número total de células contadas} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{\text{Número de quadrantes contados}}$$

Em cada repique, foi replaqueado novamente igual número de células no valor 3×10^4 em 3 placas de Petri de 35 mm. Este processo foi realizado até a quinta passagem, onde o número total de células contadas após o repique celular era menor que o número de células plaqueadas.

De acordo com os dados obtidos durante várias passagens, foi estabelecido o padrão da curva de crescimento desta linhagem celular bem como o tempo de geração (*Doubling time*).

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

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

$$Cd = \frac{\ln(nf/ni)}{\ln 2}$$

5.3.6 Avaliação da Unidade Formadora de Colônias (UFC-F)

Para avaliar a capacidade de formação de colônias das CT de MAC, foi utilizado o protocolo de Ercolin et al. (2016). As células em diferentes densidades 1×10^3 , 1×10^4 e 1×10^5 em primeira passagem foram plaqueadas em três placas de cultivo de 100 mm de diâmetro respectivamente. As células foram mantidas em cultivo e o meio foi trocado a cada 3 dias pelo período de 13 dias. Após este período as culturas foram lavadas duas vezes por cinco minutos com tampão PBS, fixadas em solução de paraformaldeído a 4% durante 30 minutos, lavadas novamente três vezes e coradas com Giemsa 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, foi possível a visualização, contagem e fotomicrografia das colônias com mais de 50 células.

5.3.7 Diferenciação *in vitro*

As células de MAC em terceira passagem foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em células da linhagem osteogênica, adipogênica e

condrogênica com a utilização do kit de diferenciação (StemX Vivo™ da R&D Systems), de acordo com o protocolo do fabricante. Como controles negativos, as células foram plaqueadas com a adição de meio de cultura α MEM.

5.3.7.1 Diferenciação Adipogênica

Para diferenciação adipogênica, 1×10^5 de células isoladas de MAC foram cultivadas em meio de cultura de diferenciação: StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic (CCM007) com 1% de penicilina/estreptomicina e trocado a cada 3 dias. Ao atingir 100% de confluência, o meio foi suplementado com diferenciador StemXVivo Adipogenic Supplement (CCM011) e trocado a cada 3 dias durante 21 dias. Após este período, as células foram fixadas por 30 minutos a temperatura ambiente com paraformaldeído a 4% e lavadas 3 vezes com solução tampão PBS. Para coloração foram incubadas com o corante Sudan Black por 5 minutos com subsequente lavagem.

5.3.7.2 Diferenciação Osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células previamente cultivadas foram plaqueadas em três placas de 35 mm em uma densidade inicial de 1×10^5 em 2mL meio de diferenciação StemXVivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media (R&D Systems, Catalog. # CCM007) com 1% de penicilina/estreptomicina e trocado a cada 3 dias. Ao atingir 70% de confluência, o meio foi suplementado com diferenciador StemXVivo™ Osteogenic Supplement Media Supplement for Human CTM Osteogenesis (Catalog # CCM008) com 1% penicilina/estreptomicina e trocado a cada 3 dias pelo período de 21 dias. Após este período as células foram fixadas durante 30 minutos com paraformol a 4%. Após a fixação, as placas foram coradas com Alizarim Red por 15 minutos.

5.3.7.3 Diferenciação Condrogênica

Para diferenciação condrogênica 3×10^5 células derivadas de MAC foram ressuspensas em 5mL de meio básico StemXVivo™ Human/Mouse

Chondrogenic (R&D Systems, n° cat. CCM005) adicionado com 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) em tubos cônicos de 15 mL. As células foram centrifugadas a 303xg por 5 minutos. Após 4 dias o meio básico de diferenciação foi descartado e o sedimento foi centrifugado e ressuspensionado em 2 mL de meio de diferenciador (meio básico suplementado com StemXVivo™ Human/Mouse Chondrogenic Supplement, Media Supplement for Human and Mouse CTM Chondrogenesis (R&D Systems, N° cat. CCM006). Os sedimentos foram mantidos em tubos cônicos de 15 mL adicionados de 0,5 mL de meio com diferenciador, trocado a cada 3 dias. Após 21 dias, os sedimentos foram fixados por 30 minutos a temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, com posterior processo de desidratação e imersão em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 5 µm com posterior processo de coloração com os corantes Tricômio de Masson e Alcian Blue.

5.3.8 Métodos celulares

5.3.8.1 Citometria de fluxo

Para caracterização celular foram utilizadas 1×10^5 células de MAC em segunda passagem em diferentes estágios gestacionais. Utilizaram-se marcadores de células mesenquimais e hematopoiéticas, utilizando como referência de marcação positiva células da medula óssea canina. O protocolo de citometria de fluxo foi adaptado de Vidane et al. (2014), em felinos, e Cardoso et al. (2016), em caninos e felinos. As células foram distribuídas em microtubos com a adição de 50 µL de PBS com 10% de soro sanguíneo de coelho por 20 minutos. Após este período, foi adicionado o anticorpo primário por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram centrifugadas e foi adicionado o anticorpo secundário por 20 minutos. Transcorrido o período, as células foram lavadas e centrifugadas. O conteúdo foi distribuído em tubos tipo Falcon específicos e foram analisadas em citômetro de fluxo utilizando um FACSCAria Cell Sorter supported by DiVa software V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os filtros utilizados nos equipamentos acima foram ajustados para a luz de emissão para o fluorocromo FITC e PE. A descrição dos anticorpos está relacionada nas tabelas 3 abaixo:

Tabela 3 – Especificação dos anticorpos utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em CT de MAC

Anticorpo	Antígeno	Empresa	Código	Espécie	Mono/poli	Esp./Reatividade
<i>CD105-Primário</i>	IgG2b	Abcam	156756	Mouse	Mono	Mouse, Rat, Dog, Human, Monkey
<i>CD34-Conjugado</i>	IgG1	eBioscience	12-0340-42	Mouse	Mono	Dog
<i>CD90-Conjugado</i>	IgG2b	eBioscience	12-5900-42	Rat	Mono	Dog
<i>CD45-Conjugado</i>	IgG2b	eBioscience	11-5450-42	Rat	Mono	Dog
<i>Goat anti- mouse- Secundário</i>	IgG	Dako	F0479	Mouse	Poli	Mouse

Fonte: Própria autoria.

5.3.9 Métodos moleculares

5.3.9.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O total de RNA foi extraído de células de MAC em segunda passagem de diferentes idades gestacionais, utilizando-se o reagente TRIzol LS (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante com algumas modificações. A concentração total de RNA foi determinada por espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Nanodrop Technologies, Inc., Wilmington Delaware, USA) e a determinação da relação de pureza do RNA foi dada pela relação da absorbância 260/280nm. As amostras com pureza entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas no experimento, sendo estocadas a -80°C até a realização do PCR convencional e o RT-qPCR.

Para a síntese do cDNA, a transcrição reversa do RNA mensageiro foi feita com o kit Enzima Transcriptase reversa superscript III (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), segundo as especificações do fabricante.

Para análises de PCR convencional e RT-qPCR foi realizada a validação dos primers *SOX2*, *OCT4*, *IDO*, *HGF*, *EGF*, *PGE2*, *IL-6* e *IL-10* que tiveram suas sequências retiradas da literatura (Tabelas 4 e 7).

5.3.9.2 Reação polimerase em cadeia (PCR) convencional

As reações de PCR convencional foram realizadas com cDNA utilizando o Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega®) e processadas no termociclador Applied Biosystems Veriti 96-well Thermal Cycler (Cat#4375786, ThermoFisher-Scientific, USA). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 56,5°C e 1 min a 72°C, seguidos por uma extensão final a 72°C por 5 min. Ao final da reação, os produtos foram analisados em gel de agarose a 2% (Sigma Aldrich®), corados em solução contendo SYBR® safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e comparados com marcadores de DNA de 1000 pb (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen®). Como referência, foi utilizado o transcrito do gene endógeno 18S (Tabela 5). Como controle negativo, utilizou-se a mesma reação sem o cDNA e com a adição de água e como controle positivo, utilizamos CT mesenquimais de medula óssea. Toda reação foi realizada em duplicata.

5.3.9.3 Reação pela polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR).

Após a validação dos primers, foram realizadas as análises de RT-qPCR utilizando-se o reagente SYBR® Green Real-Time PCR Master Mix (Cat#4367659, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA) como recomendado pelo fabricante. Previamente ao início das análises, as condições de amplificação (por exemplo: concentração de primer, temperatura de anelamento, etc.) foram testadas para otimização da reação. Todas as reações foram processadas no termociclador Step One Plus Real-time PCR system (Cat#4376600, ThermoFisher-Scientific, USA) sob as condições de pré-ciclo de 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação, aumento de temperatura e separação de fita dupla), seguido do anelamento dos primers de 60 segundos a 56,5°C, seguidos por uma curva de dissociação de 45 segundos a 72°. Como controle negativo, utilizou-se a mesma reação sem a adição de cDNA e como controle positivo para avaliação da pluripotência, utilizamos células-tronco pluripotentes induzidas canina (iPS) cedidas pela pesquisadora Natália Juliana Nardelli Gonçalves e como controle positivo de

citocinas e fatores de crescimento, utilizamos células de medula óssea canina. Toda reação foi realizada em duplicata.

Tabela 4 – Sequências de primers utilizados na avaliação de expressão de genes de marcadores de pluripotência de MAC

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência
OCT4	ATATGTGTAAGCTGCGGCCC CAATGTGGCTGATCTGCTGC	Souza et al. (2018)
Sox2	GAAACCAGAGGAAAGGGTG GATTCTCTAGAGCCACCTG	Cardoso et al. (2016)
18S	CCTGCGGCTTAATTTGACTC CTGTCAATCCTGTCCGTGTC	Gonçalves et al. (2017)

Fonte: Própria autoria.

5.4 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOMODULADORA

5.4.1 Isolamento das populações de CT de tecido adiposo canino

5.4.1.1 Obtenção dos animais

Foram utilizadas duas fêmeas caninas escolhidas aleatoriamente que foram submetidas à ovariossalpingohisterectomia, oriundas de programas de castrações nas clínicas das cidades próximas de Pirassununga-SP, para coleta de tecido adiposo.

5.4.1.2 Coleta, isolamento e cultivo de CT de tecido adiposo canino

A amostra de tecido adiposo foi coletada durante procedimento de ovariossalpingohisterectomia de fêmeas caninas. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar. Inicialmente, o tecido adiposo foi lavado em solução PBS com 5% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), macerado mecanicamente com auxílio de

uma lâmina de bisturi até a obtenção de uma amostra homogênea. O material devidamente higienizado e macerado foi submetido ao processo de digestão enzimática com collagenase I e incubado em estufa a 38,5°C com umidade relativa de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂ durante 1 hora e 30 minutos. Subsequentemente, as amostras de tecido foram inativadas com 1 mL de meio de cultura α -MEM e centrifugadas por 5 minutos em 303xg. Logo após, o meio foi descartado e o sedimento ressuspensionado e plaqueado em garrafas de 75 cm, acrescido de 6 mL de meio de cultivo descrito na tabela 5. As células foram mantidas a 38,5° C com umidade relativa próxima de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. O cultivo foi mantido até as células atingirem a confluência de 80%, com posterior criopreservação nas passagens 0, 1 e 2 para realização de testes de estimulação imunológica.

Tabela 5 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo de tecido adiposo canino

Componente	Código	Porcentagem	50 mL
α MEM (Gibco)	11900-024	89%	44,5 mL
SFB (Invitrogen)	12657-029	10%	5 mL
Penicilina e Estreptomicina (Life)	15140-122	1%	500 μ L

Fonte: Própria autoria.

5.4.2 Isolamento das populações de CT de medula óssea canina

5.4.2.1 Obtenção dos animais

Foi utilizado 01 feto canino de terço final proveniente de útero gravídico de cadela sem raça definida (SRD), oriunda de programa de castração realizada em clínica particular localizada na cidade de Pirassununga-SP, para coleta de medula óssea.

5.4.2.2 Coleta, isolamento e cultivo de CT de medula óssea canina

A amostra de medula óssea canina foi coletada de um feto canino com idade gestacional entre 46-63 dias. Todo o procedimento foi realizado em fluxo laminar.

Inicialmente, os ossos longos do feto (fêmur, tíbia, úmero e rádio) foram isolados dos membros pélvicos e torácicos. Após o isolamento, foi realizada a excisão das epífises dos ossos longos, com posterior lavagem do canal medular com meio DMEM high glucose (Gibco, cat. N. 12800-017). Após esse processo, o material foi plaqueado em placas de seis poços acrescido de 1 mL de meio de cultivo composto por: 89% de DMEM High Glucose, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina (Tabela 6). As células foram mantidas a 38,5° C com umidade relativa próxima de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO₂. O cultivo foi mantido até as células atingirem a confluência de 80%, com posterior criopreservação nas passagens 0, 1 e 2 para realização de testes de estimulação imunológica.

Tabela 6 - Composição do meio de cultura utilizado para cultivo de medula óssea canina

Componente	Código	Porcentagem	50 mL
DMEM High Glucose (Gibco)	12800-017	89%	44,5 mL
SFB (Invitrogen)	12657-029	10%	5 mL
Penicilina e Estreptomicina (Life)	15140-122	1%	500µL

Fonte: Própria autoria.

5.4.3 Citometria de Fluxo de CT de tecido adiposo e medula óssea caninos

As CT de medula óssea e tecido adiposo caninos em uma densidade de 1×10^5 , em 2ª passagem foram caracterizadas por meio da técnica de citometria de fluxo, com o uso de anticorpos primários e secundários de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos citados anteriormente na tabela 3. As técnicas de marcações com anticorpos foram realizadas de acordo com a metodologia supracitada.

5.4.4 Estimulação de CT de membrana amniótica e medula óssea caninos

As MAC das três idades gestacionais e CT de medula óssea canina em segunda passagem, previamente criopreservadas, foram cultivadas em triplicata em placas de 35 mm em uma densidade inicial de 5×10^5 em 2mL de meio de cultivo. Para estimulação imunológica as células foram tratadas com 200 ng/mL de IFN- γ (IFN- γ - R&D, cat. N. 781-CG/CF), pelo período de 72 horas, conforme descrição de Saulnier et al. (2016) e Russel et al. (2016) em cães (Figura 3).

Figura 3 – Estimulação das células de medula óssea e MAC em diferentes estágios gestacionais

Legenda – Estimulação das CT de MAC em diferentes estágios gestacionais (terço inicial 20-30 dias; terço médio 31-45 dias e terço final 46-63 dias) e CT de medula óssea canina com IFN- γ pelo período de 72 horas.

Fonte: Própria autoria.

5.4.5 Caracterização da capacidade imunomoduladora

Para a caracterização da capacidade imunomoduladora, as CT previamente estimuladas foram submetidas à análise da expressão gênica por meio do RT-qPCR. A extração do RNA, conversão de cDNA e RT-qPCR foram realizadas de acordo com a metodologia citada no item 5.3.9. Nessa etapa, foram avaliados os transcritos dos seguintes genes: *IL-6*, *IL-10*, *EGF*, *HGF*, *IDO* e *PGE2* descritos conforme tabela 7.

Como controle negativo utilizou-se a mesma reação sem a adição de cDNA, e como controle positivo, CTM de medula óssea canina. Toda reação foi realizada em duplicata.

Tabela 7 - Primers utilizados na avaliação de expressão de genes de citocinas e fatores de crescimento

Gene	Sequência (5'-3')	pb	Referência
<i>IDO</i>	GCTGGGTCTGCCTCCTATTC GCAGTCTCCACCAGGAAACC	126	Saulnier et al.,(2016)
<i>EGF</i>	CTATGGCCCTCAAGGATGGTG GCAGCCTTGCTCTGTGTCCTTA	124	Iida et al., (2014)
<i>HGF</i>	GGCTACTGCTCCCAAATTCCA CCCACATTGAACATGTTAGTCCAGA	123	Iida et al., (2014)
<i>IL-10</i>	AGCACCTACTTGAGGACGA ACTGGATCATCTCCGACAGG	198	Kang et al.,(2008)
<i>IL-6</i>	GAAGTCCCTCTCCACAAGC TTCTTGTCAAGCAGGTCTCC	325	Kang et al., (2008)
<i>PGE2</i>	CTGTCATCACCGGCCAAGT CCTGGTCACTCCGGCAATA	99	Kowalewski et al., (2009)
<i>18S</i>	CCTGCGGCTTAATTTGACTC CTGTCAATCCTGTCCGTGTC	65	Gonçalves et al., (2017)

Fonte: Própria autoria.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa Graphpad Prsim®, com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que não atenderam as premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [Log (X+1)]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância ($p < 0,05$).

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DAS CT DE MAC

As células de MAC foram caracterizadas de acordo com os seguintes testes:

6.1.1 Estabelecimento do cultivo celular

6.1.1.1 *Coleta, isolamento e cultivo de MAC*

Com o procedimento de coleta e processamento das MAC nas três idades gestacionais, observou-se um grande número de células arredondadas no sobrenadante. Subsequentemente, após o período de 48 horas de cultivo, observou-se que as células se apresentaram aderidas ao plástico com morfologia fibroblastóide e poligonal. Após a primeira passagem, as células se apresentaram, na totalidade, com morfologia fibroblastóide, e foram mantidas em cultura até atingirem a confluência de 80%, com posterior criopreservação nas passagens 0, 1 e 2 para realização de testes de caracterização e avaliação da capacidade imunomoduladora (Figura 4).

Figura 4 - Coleta de amostra de MAC em diferentes idades gestacionais

Legenda – A) Feto de terço inicial envolto por anexos fetais; B) Feto de terço médio envolto por anexos fetais; C) Coleta de MAC de feto de terço final; (D) Cultura de células com formato fibroblástico de membrana amniótica em P1 de terço inicial 20x (Barra: 50µm); E) Cultura de células de membrana amniótica em P1 de terço médio 20x (Barra: 50µm); F) Cultura de células de membrana amniótica Em P1 de terço final 20x (Barra: 50µm).

Fonte: Própria autoria.

6.1.2 Criopreservação e Viabilidade celular

Após o processo de criopreservação, obtivemos os seguintes valores de células viáveis demonstrados na tabela 9. Posteriormente, as células foram plaqueadas e cultivadas e observamos um crescimento celular mais lento após criopreservação, que se sucedeu nas sucessivas passagens.

Tabela 8 – Relação dos valores de células viáveis antes e após processo de criopreservação

Idade Gestacional		% mortas	% Vivas
Terço Inicial	4×10^4	16,75%	83,25%
Terço Médio	4×10^4	19,9%	80,1%
Terço Final	4×10^4	24,78%	75,22%
Média		20,48 %	79,52%

Fonte: Própria autoria.

6.1.3 Curva de crescimento

Após o período de 96 horas, foi possível observar a confluência de 80% nas placas de cultivo nas três idades gestacionais. Após sucessivas passagens, foi possível estabelecer um padrão de curva de crescimento que demonstrou um pico de crescimento em segunda passagem e redução gradativa dos índices de proliferação até quinta passagem (Figura 5A). O *Doubling time* foi calculado conforme Figura 5B, observando-se aumento considerável no número de dias necessários para a duplicação celular. Verifica-se com isto, o declínio gradativo da taxa de proliferação celular de acordo com as sucessivas passagens.

Figura 5 - Representação gráfica do perfil de crescimento das CT de MAC

Legenda: A) As células demonstraram um pico de crescimento em segunda passagem e uma posterior queda com uma tendência estacionária. B) Gráfico *Doubling time* demonstrando o número de dias necessários para a duplicação do número de células

plaquadas inicialmente. O número de dias tende a aumentar à medida que o número de passagens também aumenta.

Fonte: Própria autoria.

6.1.4 Avaliação da capacidade de formação de colônias (UFC-F)

Inicialmente, foi realizada a UFC-F na idade gestacional de 20-30 dias nas três densidades celulares. Após o período de 09 dias, nas placas com densidade de 1×10^3 e 1×10^4 , foi observado formação de colônias com número celular superior a 50 células. Na placa com densidade de 1×10^5 , as células se apresentaram confluentes com dificuldade no isolamento e visualização das colônias. Nas idades gestacionais de 31-45 e 46-63 dias, foi estabelecido uma densidade 1×10^4 , apresentando formação de colônias após o período de 10 e 13 dias, respectivamente. Após coloração, observaram-se células aglomeradas e de coloração roxa (Figura 6) e obteve-se a média de UFC-F em cada idade gestacional (Tabela 9).

Figura 6 – Placas com formação de colônias nas três idades gestacionais

Legenda – Teste de Unidade formadora de colônia (UFC-F) de células MAC nas três idades gestacionais coradas com Giemsa. A) Placa com UFC-F na idade de terço inicial (09 dias); B) Fotomicrografia de UFC-F de idade de terço inicial 10x (Barra: **100µm**); C) Placa com UFC-F na idade de terço médio (10 dias); D) Fotomicrografia de UFC-F de idade de terço médio 10x (Barra: **100µm**); E) Placa com UFC-F na idade de terço final (13 dias); F) Fotomicrografia de UFC-F de idade de terço final 10x (Barra: **100µm**).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 9 – Média do número de UFC-F por idade gestacional

Número de colônias	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média
Terço inicial	134	155	146	145
Terço médio	138	157	132	142,3
Terço final	130	127	125	127,3

Fonte: Própria autoria.

6.1.5 Diferenciação *in vitro*

As células de MAC em diferentes idades gestacionais foram estimuladas e avaliadas por meio de colorações específicas, quanto à capacidade de diferenciação em células da linhagem adipogênica, osteogênica e condrogênica.

6.1.5.1 Diferenciação Adipogênica

As células de MAC, em terceira passagem de diferentes idades gestacionais, cultivadas com o meio diferenciador adipogênico, demonstraram gradativas alterações morfológicas que foram visualizadas durante o processo de diferenciação. Na figura 7, observa-se a presença de vacúolos intracitoplasmáticos, com ausência de vacúolos corados nas placas controle.

Figura 7 – Diferenciação adipogênica

Legenda - Fotomicrografias das células de MAC submetidas à diferenciação adipogênica coradas com Sudan Black aos 21 dias. A, B) Células de MAC de terço inicial diferenciadas 20x, 40x (Barra: **50µm**); C, D) Placa controle de células de terço inicial 20x, 40x (Barra: **50µm**); E, F) Células diferenciadas de terço médio 20x, 40x (Barra: **50µm**); G,H) Placa controle de células de terço médio 20x, 40x (Barra: **50µm**) ; I, J) Células diferenciadas de terço final 20x, 40x (Barra: **50µm**); K, L) Placa controle de células de terço final 20x, 40x (Barra: **50µm**).

Fonte: Própria autoria.

6.1.5.2 Diferenciação Osteogênica

As células de MAC de diferentes idades gestacionais foram cultivadas em meio diferenciador osteogênico. As células demonstraram gradativas alterações morfológicas que foram visualizadas durante o processo de diferenciação, com a visualização de formação óssea através da deposição de material mineral amorfo extracelular. Na figura 8, observa-se a presença de deposição mineral extracelular corado em vermelho. No controle, não houve a visualização de formação mineral.

Figura 8 – Diferenciação osteogênica

Legenda - Fotomicrografias das células de MAC submetidas à diferenciação osteogênica coradas com Alizarim red A, B) Placa com células de MAC de terço inicial diferenciadas 20x, 40x (Barra: **50µm**); C, D) Placa controle de células de MAC de terço inicial 20x, 40x (Barra: **50µm**); E, F) Placa com células diferenciadas de MAC de terço médio 20x, 40x (Barra: **50µm**); G,H) Placa controle de células de MAC de terço médio 20x, 40x (Barra: **50µm**) ; I, J) Placa com células diferenciadas de MAC de terço final 20x, 40x (Barra: **50µm**); K, L) Placa controle de células de MAC de terço final 20x, 40x (Barra: **50µm**).

Fonte: Própria autoria.

6.1.5.3 Diferenciação Condrogênica

Nos tubos adicionados do meio diferenciador condrogênico, pôde ser observada a formação de um sedimento no fundo do tubo cônico que se manteve

estável durante o processo de diferenciação. Após o processo de diferenciação, pôde-se observar a presença de fibras de colágeno coradas em azul. Na figura 9, em ambas as colorações, observa-se a presença de fibras de colágeno que são representadas pela coloração azul. No controle não foi possível à formação do sedimento.

Figura 9 – Diferenciação condrogênica

Legenda - Fotomicrografias das células de MAC submetidas à diferenciação condrogênica coradas com Alcian Blue e Tricomo de Masson A) Sedimento de células de MAC de terço inicial diferenciadas e coradas com Alcian Blue 40x (Barra: **20µm**); B) Sedimento de células de MAC de terço inicial diferenciadas e coradas com Tricomo de Masson 100x (Barra: **20µm**); C) Sedimento de células de MAC de terço médio coradas com Alcian Blue 40x (Barra: 20µm); D) Sedimento de células de terço médio coradas com Tricomo de Masson 100x (Barra: **20µm**); E) Sedimento de células de MAC de terço final coradas com Alcian Blue 40x (Barra: 20µm); F) Sedimento de células de terço final coradas com Tricomo de Masson 100x (Barra: **20µm**).

Fonte: Própria autoria.

6.1.6 Métodos celulares

6.1.6.1 Citometria de fluxo

As células de MAC de terço inicial demonstraram positividade frente ao marcador CD90 com 31,7% e CD105 de 5,6%, baixa marcação de CD34 com 0,3% e CD45 com 0,4% (Figura 10); MAC de terço médio apresentaram positividade ao marcador CD90 com 36,7% e CD105 de 6,3%, baixa marcação de CD34 com 0,2% e CD45 com 0,4% (Figura 11); MAC de terço final demonstraram positividade ao marcador CD90 com 67,1% e CD105 de 96,4%, baixa marcação de CD34 com 4,4% e CD45 com 2,0% (Figura 12). Na Figura 13, observamos as diferenças na expressão dos marcadores mesenquimais e hematopoiéticos nas diferentes idades gestacionais.

Figura 10 – Análise da citometria de fluxo das MAC de terço inicial

Legenda – Citometria de fluxo de MAC de terço inicial. A) CD90 positivo com marcação de 31,7%; B) CD105 positivo com marcação de 5,6%; C) CD34 com baixa marcação de 0,3%; D) CD45 com baixa marcação de 0,4%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 – Análise da citometria de fluxo das MAC de terço médio

Legenda – Citometria de fluxo de MAC de terço médio. A) CD90 positivo com marcação de 36,5%; B) CD105 positivo com marcação de 6,3%; C) CD34 com baixa marcação de 0,2%; D) CD45 com baixa marcação de 0,4%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 – Análise da citometria de fluxo das MAC de terço final

Legenda – Citometria de fluxo de MAC terço final. A) CD90 positivo com marcação de 67,1%; B) CD105 positivo com marcação de 96,4%; C) CD34 com baixa marcação de 4,4%; D) CD45 com baixa marcação de 2,0%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 13 - Quantificação da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de MAC de diferentes estágios gestacionais por análise de citometria de fluxo

Legenda – Gráfico de barras dos marcadores analisados na MAC de diferentes estágios gestacionais.

Fonte: Própria autoria.

6.1.7 Métodos moleculares

Na avaliação do transcrito do gene *OCT4*, não houve expressão nas três idades gestacionais de MAC. Quanto ao transcrito do gene *SOX-2*, houve uma baixa expressão nas diferentes idades, com uma variabilidade da abundância entre as idades gestacionais ($p < 0,05\%$) (Figura 14).

Figura 14 – Expressão do transcrito do gene de pluripotência SOX-2 nas MAC de diferentes idades gestacionais

Legenda – Não houve diferença estatística entre as diferentes idades gestacionais, com diferença estatística entre o controle e o terço inicial ($p < 0,05$), terço médio ($p < 0,05$) e terço final ($p < 0,05$).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 10 – Média $\pm$ desvio padrao ($M \pm DP$) do transcrito do gene SOX-2 de CT de MAC em diferentes estágios gestacionais, pela técnica de RT-qPCR

		Terço inicial	Terço médio	Terço final	Controle
SOX2	Média	0,0002616*	0,0000364*	0,002997*	1*
	Desvio Padrão	0,0002334	0,00003089	0,002017	0

Legenda – E – Estimuladas

NE – Não estimuladas

*Diferença significativa

Fonte: Própria autoria.

6.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOMODULADORA

6.2.1 Isolamento das populações de CT de tecido adiposo canino

6.2.1.1 Coleta, isolamento e cultivo de CT de tecido adiposo canino

Após coleta e processamento do tecido adiposo, observou-se um grande número de células arredondadas no sobrenadante. Subsequentemente após o

período de 48 horas de cultivo, observou-se que as células se apresentaram aderidas ao plástico com morfologia fibroblastóide, altamente proliferativa.

6.2.2 Isolamento das populações de CT de medula óssea canina

6.2.3.2 Coleta, isolamento e cultivo de CT de medula óssea canina

As células de medula óssea canina foram cultivadas e após o período de 5 dias, foi observada a adesão das células ao fundo da placa com morfologia fibroblastóide, altamente proliferativas.

6.2.3 Citometria de Fluxo de CT de medula óssea e tecido adiposo canino

As células de medula óssea canina demonstraram positividade ao marcador CD90 com 68,3% e CD105 de 29,3%, baixa marcação de CD34 com 7,7% e CD45 com 8,9% (Figura 15). As células de tecido adiposo demonstraram positividade ao marcador CD90 com 34,6% e CD105 de 19,7%, baixa marcação de CD34 com valores menores de 3% e CD45 com valores menores de 5% (Figura 16). Foram utilizados anticorpos para marcadores mesenquimais e hematopoiéticos descritos nas tabelas 3 e 4. Na figura 17, observamos as diferenças na expressão dos marcadores mesenquimais e hematopoiéticos entre células da medula óssea e tecido adiposo. Devido à alta positividade das células de medula óssea canina em relação às células de tecido adiposo, foram utilizadas as células de medula óssea como controle positivo para os testes de estimulação.

Figura 15 – Análise da citometria de fluxo das células de medula óssea canina

Legenda – Citometria de fluxo de células de medula óssea canina. A) CD90 positivo com marcação de 68,3%; B) CD105 positivo com marcação de 29,3%; C) CD34 com baixa marcação de 7,7%; D) CD45 com baixa marcação de 8,9%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 16 – Análise da citometria de fluxo de tecido adiposo canino

Legenda – Citometria de fluxo de células de tecido adiposo canino. A) CD90 positivo com marcação de 34,6%; B) CD105 positivo com marcação de 19,7%; C) CD34 baixa marcação menor de 3%; D) CD45 com baixa marcação menor de 5%.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 – Quantificação da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos de medula óssea e tecido adiposo canino por análise de citometria de fluxo

Legenda – Os marcadores analisados na medula óssea canina estão expressos na barra azul do gráfico: CD90 (68,3%), CD105 (29,3%), CD34 (7,7%) e CD45 (8,9%). Os marcadores analisados no tecido adiposo estão expressos na barra vermelha: CD90 (34,6%), CD105 (19,7%), CD34 (menor de 3%) e CD45 (menor de 5%).

Fonte: Própria autoria.

6.2.4 Estimulação de CT de MAC e medula óssea canina

Após o período de estimulação com INF- γ , as células não apresentaram alterações morfológicas, e assim foi extraído o RNA e convertido em c-DNA, para posterior quantificação da expressão gênica.

6.2.5 Caracterização da capacidade imunomoduladora

6.2.5.1 Reação pela polimerase em cadeia (PCR) convencional

No PCR convencional, a eletroforese das amostras de medula óssea e MAC em diferentes idades gestacionais estão expressas nas Figuras 18, 19 e 20. Na tabela 11, observamos a expressão gênica dos transcritos.

Figura 18 – Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de medula óssea canina

Legenda – Eletroforese para detecção do cDNA em gel de agarose 2% – Medula óssea canina (MOC) (1) Gene 18S de MOC estimuladas com INF- γ ; (2) Gene 18S de MOC não estimuladas; (3) Gene IDO de MOC estimuladas; (4) Gene IDO de MAC não estimulada; (5) Gene HGF de MOC estimulada; (6) Gene HGF de MOC não estimulada; (7) Gene EGF de MOC estimuladas; (8) Gene EGF de MOC não estimuladas; (9) Gene PGE2 de MOC estimuladas; (10) Gene PGE2 de MOC não estimuladas; (11) Gene IL-10 de MOC estimuladas; (12) Gene IL-10 de MOC não estimuladas; (13) Gene IL-6 de MOC estimuladas; (14) Gene IL-6 de MOC não estimuladas.

Fonte: Própria autoria.

Figura 19 – Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de MAC

Legenda – Eletroforese para detecção do cDNA em gel de agarose 2% – MAC (MAC) de 20-30 dias (1) Gene 18S de MAC estimuladas com INF- γ ; (2) Gene 18S de MAC não estimuladas; (3) Gene IDO de MAC estimuladas; (4) Gene IDO de MAC não estimuladas; (5) Gene HGF de MAC estimulada; (6) Gene HGF de MAC não estimulada; (7) Gene EGF de MAC estimulada; (8) Gene EGF de MAC não estimulada; (9) Gene PGE2 de MAC estimuladas; (10) Gene PGE2 de MAC não estimuladas; (11) Gene IL-10 de MAC estimuladas; (12) Gene IL-10 de MAC não estimuladas; (13) Gene IL-6 de MAC estimuladas; (14) Gene IL-6 de MAC não estimuladas; (15) Gene 18S de MAC estimuladas; (16) Gene 18S de MAC não estimuladas; (17) Gene IDO de MAC estimuladas; (18) Gene IDO de MAC não estimuladas; (19) Gene HGF de MAC estimuladas; (20) Gene HGF de MAC não estimuladas; (21) Gene EGF de MAC estimuladas; (22) Gene EGF de MAC não estimuladas; (23) Gene PGE2 de MAC estimuladas; (24) Gene PGE2 de MAC não estimuladas; (25) Gene IL-10 de MAC estimuladas; (26) Gene IL-10 de MAC não estimuladas.

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 – Eletroforese de citocinas e fatores de crescimento em células de MAC

Legenda – Eletroforese para detecção do cDNA em gel de agarose 2% – MAC de 31-45 dias (1) Gene IL-6 de MAC estimuladas com INF- γ ; (2) Gene IL-6 de MAC não estimuladas; (3) Gene 18S de MAC estimuladas; (4) Gene 18S de MAC não estimuladas; (5) Gene IDO de MAC estimuladas; (6) Gene IDO de MAC não estimuladas; (7) Gene HGF de MAC estimuladas; (8) Gene HGF de MAC não estimuladas; (9) Gene EGF de MAC estimuladas; (10) Gene EGF de MAC não estimuladas; (11) Gene PGE2 de MAC estimuladas; (12) Gene PGE2 de MAC não estimuladas; (13) Gene IL-10 de MAC estimuladas; (14) Gene IL-10 de MAC não estimuladas; (15) Gene IL-6 de Mac estimuladas; (16) Gene IL-6 de MAC não estimuladas.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados do PCR convencional obtidos nas eletroforeses das células de medula óssea e MAC nas três idades gestacionais foram expressos na tabela 11 abaixo.

Tabela 11 – Expressão gênica dos transcritos por PCR convencional

Idade	<i>IDO</i>		<i>HGF</i>		<i>EGF</i>		<i>PGE2</i>		<i>IL-10</i>		<i>IL-6</i>	
Gestacional	126 pb		123 pb		124 pb		99 pb		198 pb		325 pb	
	E	NE	E	NE	E	NE	E	NE	E	NE	E	NE
Terço Inicial	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
Terço Médio	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
Terço Final	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Medula óssea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda – E – Estimuladas

NE – Não estimuladas

Fonte: Própria autoria.

6.2.5.2 Reação pela polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR).

Na análise do transcrito do gene *IDO*, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação de células estimuladas e não estimuladas de cada idade gestacional, com maior expressão nas células estimuladas.

Quando avaliada as células estimuladas entre as idades gestacionais, houve diferença estatística ($p < 0,05\%$) entre terço inicial *versus* terço médio, com maior abundância de terço médio. Entre o terço inicial *versus* terço final, com maior abundância de terço final (Figura 21).

Na comparação de células não estimuladas entre idades gestacionais, houve diferença significativa entre terço médio e terço final, com maior expressão de terço final.

Os genes *HGF*, *EGF*, *IL-10*, *IL-6* e *PGE2* não tiveram a presença dos transcritos nas três idades gestacionais.

Figura 21 – Expressão do transcrito do gene de *IDO* na MAC de diferentes idades gestacionais

Legenda – Houve diferença significativa entre as MAC de diferentes idades gestacionais, com maior expressão em terço final (46-63 dias).

Fonte: Própria autoria.

Tabela 12 – Média $\pm$ desvio padrao ($M \pm DP$) do transcrito do gene *IDO* de CT de MAC em diferentes estágios gestacionais, pela técnica de RT-qPCR

	Terço inicial E	Terço inicial NE	Terço médio E	Terço médio NE	Terço final E	Terço final NE	Controle
Média	0,005185*	0,0005113*	0,03288*	0,000361*	0,07494*	0,0001355*	1
Desvio Padrão	0,000464	0,0003135	0,002882	0,00004287	0,01406	0,00001364	0

Legenda – E – Estimuladas
 NE – Não estimuladas
 *Diferença significativa

Fonte: Própria autoria.

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

As CTM estão presentes na maioria dos tecidos adultos e possuem grande capacidade de proliferação. Estudos com CTM caninas estão sendo amplamente realizadas, mas ainda hoje os conhecimentos acerca da biologia e funções se encontram escassos comparados com os estudos envolvendo CTM humanas e de camundongos. Essa escassez de conhecimento impede o desenvolvimento de estudos baseados em evidências utilizando CTM caninas (RUSSELL et al., 2016).

Dentre os estudos realizados com CTM, ocorre uma grande tendência para a utilização de CTM obtidas de anexos fetais, como a membrana amniótica, matriz do cordão umbilical e sangue do cordão umbilical, já que estas fontes normalmente são descartadas durante o parto e que podem ser colhidas por uma técnica não invasiva (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; CAMPOS et al., 2017).

Com isso, neste trabalho, estabelecemos com sucesso a linhagem de CTM de MAC nas idades gestacionais de terço inicial (20-30 dias), terço médio (31-45 dias) e terço final (46-63 dias), baseando-se na metodologia descrita por Lange e Consiglio et al. (2012) em modelo equino. Inicialmente, realizou-se o isolamento e cultivo primário das células de MAC que se apresentaram proliferativas e heterogêneas, com a presença de células poligonais e fibroblastóides, corroborando com os resultados de Lange-Consiglio et al. (2012) em equinos, Saulnier et al. (2016) em cães e Rutigliano et al. (2013) e Vidane et al. (2016) em felinos, que citam que o cultivo primário de membrana amniótica apresenta-se heterogêneo com a presença de células poligonais descritas como epiteliais e as fibroblastóides descritas como CTM. Após cultivo primário, as células apresentaram-se na totalidade a morfologia fibroblastóide com aderência à superfície plástica, que constitui uma das características de CTM (DOMINICI et al., 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; MAURO et al., 2010; FILIOLI URÂNIO et al., 2011; PARK et al., 2012; SAULNIER et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; BORGHESI et al., 2017).

A viabilidade celular foi comprovada após a criopreservação, com uma grande porcentagem de células viáveis após o processo. Essa característica também descrita por Lange-Consiglio et al. (2012), Edamura et al. (2014) em cães e Borghesi et al. (2017) em coelhos, possibilita a formação de um banco de CTM que pode ser utilizado em futuros testes ou estudos clínicos. No entanto, uma limitação observada

após este processo, foi à diminuição da capacidade proliferativa das células em cultivo após descongelamento celular.

Na análise da curva de crescimento, os trabalhos de Lockhart et al. (1971) e Vidane et al. (2014), citam um aumento do número de células durante as primeiras passagens, com posterior declínio nas sucessivas passagens. Nossos achados com MAC demonstraram um pico de maior crescimento celular em segunda passagem, com sucessivo declínio da taxa de proliferação após sucessivas passagens. Esse declínio também foi observado nas CTM de líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e matriz do cordão umbilical, que também apresentaram um potencial de proliferação limitado às primeiras passagens (FILIOLI URÂNIO et al., 2011; LEE et al., 2013). Em contrapartida, Marcus et al. (2008) em ratos e Park et al. (2012) em cães, relatam uma proliferação celular crescente em células de membrana amniótica entre a terceira e a vigésima passagem, sem declínio da curva de crescimento. O *Double time* das células de MAC demonstrou um crescente aumento no número de dias para duplicação celular, fenômeno este observado em CTM que sofrem desgaste e quiescência à medida que aumentam o número de passagens (LOCKHART et al., 1971; FILIOLI URÂNIO et al., 2011; VIDANE et al., 2014; SAULNIER et al., 2016;).

O potencial clonogênico das CTM de MAC foi avaliado e quantificado pela contagem das UFC-F, que é um método de quantificar o número de CTM que podem ser encontradas em diversos tecidos quando inoculadas (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). As MAC de diferentes idades gestacionais, apresentam uma grande quantidade de UFC-F com número variado de células, o que favorece seu uso em aplicações clínicas.

Quanto à capacidade de diferenciação celular, as células de MAC das três idades gestacionais, apresentaram capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. A capacidade de diferenciação é citada como uma das atribuições necessárias para que as CT sejam classificadas como CTM (DOMINICINI et al., 2006; BYDLOWSKI et al., 2009; MAURO et al., 2010; FILIOLI URÂNIO et al., 2011; WENCESLAU et al., 2011; LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; PARK et al., 2012; TAGHI et al., 2012; VIDANE et al., 2014; SAUNIER et al., 2016).

O resultado da imunofenotipagem celular demonstrou a expressão de marcadores mesenquimais (CD90 e CD105) e não expressão de marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34) em MAC de diferentes idades gestacionais. Corroborando nossos resultados, os trabalhos envolvendo células de MAC, citam a marcação positiva para CTM (CD29, CD44, CD90 CD105 e CD166) e marcação negativa para células imunes (CD3, CD11c, CD28, CD38 e CD62L), células hematopoiéticas (CD34, CD45) e plaquetas (CD41) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; PARK et al., 2012; CARDOSO et al., 2016; SAULNIER et al., 2016). No entanto, Saulnier et al. (2016) e Cardoso et al. (2016), relatam uma baixa expressão do marcador CD105 em MAC. Em outras espécies, Yamahara et al. (2014) relatam a expressão de CD90, CD105, CD73 e não expressão de CD34, CD45, CD14, CD19 e HLA-DR em células amnióticas humanas. Em felinos, Vidane et al. (2014) e Cardoso et al. (2016) citam a expressão de marcadores mesenquimais (CD90 e CD73) e uma expressão baixa de CD105, CD45 e CD34. Em ratos, Marcus et al. (2008) relatam a expressão do marcador CD29 e CD90 e não expressão para marcadores linfohematopoiéticos CD45 e CD11b. Em coelhos, demonstraram-se altos níveis de expressão para marcadores CD105 e CD90 e baixa expressão de CD73, CD117 e CD45, com decréscimo dos valores após sucessivas passagens (BORGHESI et al., 2017).

Quando comparado os resultados da imunofenotipagem em MAC entre as idades gestacionais, observou-se um crescente aumento na expressão do CD90 e CD105 conforme a evolução gestacional, com maior expressão desses marcadores em terço final. Devido à ausência de estudos envolvendo a imunofenotipagem em diferentes estágios gestacionais em cães, comparamos nosso resultado com Barboni et al. (2014) em ovinos, que em contrapartida cita que o estágio gestacional afeta o fenótipo das células, com maior expressão de marcadores de adesão de CT como CD29, CD49f e CD166 em gestação precoce em comparação com células avaliadas em gestação tardia.

As células de anexos fetais possuem vantagens quanto à sua potencialidade, pois podem preservar características embrionárias por manterem a capacidade de pluripotência dos tecidos de origem (CREMONESI; CORRADETTI; LANGE CONSIGLIO, 2011; VITA et al., 2012; SAULNIER et al., 2016). Na avaliação pluripotente de células de membrana amniótica, dados conflitantes são relatados

pela literatura. Em nosso trabalho com MAC, identificamos uma baixa expressão gênica de *SOX2* e não expressão de *OCT4* nas três idades gestacionais. Corroborando nossos resultados, Saulnier et al. (2016) descrevem baixa expressão do gene *SOX2* e não detecção de *NANOG* e *OCT4* na membrana amniótica, placenta e matriz do cordão umbilical canino. Contrapondo aos nossos resultados, foi relatada a expressão gênica de *OCT4* (FILIOLI URANIO et al., 2011; FILIOLI PARK et al., 2012; URÂNIO et al., 2014; CARDOSO et al., 2016), *SOX2* (PARK et al., 2012; CARDOSO et al., 2016) e *NANOG* (PARK et al., 2012) em células de MAC. Em outras espécies, células de membrana amniótica são estudadas, como citado por Mauro et al. (2010) em ovinos, que relatam a expressão de *OCT4* nas primeiras passagens, com significativa diminuição após a sexta passagem. Em felinos, Russel et al. (2016) relata a expressão gênica de *OCT4* em sucessivas passagens (P2 a P9) e *NANOG* nas primeiras passagens (P2 e P3) e em contrapartida, Cardoso et al. (2016) citam a não expressão gênica de *OCT4* e expressão positiva de *SOX2*.

Quando comparados os resultados da avaliação pluripotente entre as idades gestacionais, nossos resultados demonstram uma baixa expressão de *SOX2* com uma variabilidade de valores entre as idades gestacionais. Em humanos, a análise quantitativa demonstra que as células de membrana amniótica de terço inicial, exibem maior expressão de marcadores de pluripotência como *NANOG* e *SOX2* em relação ao terço final, com expressão não significativa de *OCT4* quando comparados (IZUMI et al., 2009). Em ovinos, Barboni et al. (2014) citam resultados semelhantes, pois células de período gestacional tardio exibiram resultados inferiores às células de idade gestacional precoce, com diminuição da expressão gênica de *NANOG* e *SOX2* (BARBONI et al., 2014). Devido à diversidade de resultados descritos na literatura, mais testes quanto à capacidade de pluripotência da MAC devem ser investigados.

Para dados comparativos, avaliamos células de tecido adiposo e medula óssea canina para obtenção de um controle positivo conforme descrito por Kang et al. (2008) e Saulnier et al. (2016) em cães. Na análise da imunofenotipagem de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos, os resultados demonstram a expressão de marcadores mesenquimais (CD90 e CD105), e não expressão de marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34) em células de medula óssea e tecido

adiposo canino, resultados esses também observados por Kang et al. (2008), Screven et al. (2014), Russel et al. (2016) e Saulnier et al. (2016) em cães. Quando os valores obtidos foram comparados, observamos maior expressão de marcadores mesenquimais em células obtidas da medula óssea em relação ao tecido adiposo. Estabelecemos assim, como controle positivo, as células da medula óssea canina por apresentarem maior expressão imunofenotípica de CTM e também devido à similaridade imunológica das células de membrana amniótica e medula óssea humana citadas por Meesuk et al. (2016).

No presente momento, este é o primeiro trabalho que investigou a resposta imunomoduladora de CT de MAC em diferentes idades gestacionais, através da expressão gênica, tais como *IL-6*, *IL-10*, *IDO*, *HGF*, *EGF* e *PGE2*. Uma limitação identificada em nosso estudo foi à ausência de trabalhos que avaliaram células de anexos fetais de cães conforme a evolução gestacional.

Na avaliação imunomoduladora realizada pela técnica de PCR convencional, observou-se a expressão dos genes *IDO*, *HGF*, *EGF* e *PGE2*. Contudo, com os resultados obtidos por meio da RT-qPCR, observou-se apenas a expressão gênica da *IDO* nas três idades gestacionais. O gene *IDO* identificado em algumas espécies, e o gene *NO* (óxido nítrico) em outras espécies, possuem papel central no estudo da imunomodulação *in vitro*, desempenhando função direta no catabolismo do triptofano e a inibição da proliferação de linfócitos T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005). As CTM humanas produzem altos níveis de *IDO* e não produzem *NO*, enquanto as CTM de camundongo produzem altos níveis de *NO* e não produzem a *IDO* (REN et al., 2009; KRAMPERA et al., 2013; CHOW et al., 2017). Em equinos, CTM de medula óssea e sangue do cordão umbilical produzem *NO*, enquanto CTM derivadas de tecido do cordão umbilical e tecido adiposo não produzem (CARRADE et al., 2012). Essa variabilidade associada à produção de *NO* ou *IDO* pelas CTM pode estar relacionada com as espécies e a fonte de tecido de origem (CARRADE et al., 2013).

A estimulação com mitógenos como *INF-γ*, *TNF-γ*, Interleucina 1A (*IL-1A*) ou Interleucina 1β (*IL-1β*) é capaz de proporcionar uma maior expressão de genes ligados a imunomodulação (KRAMPERA et al., 2011; KRAMPERA et al., 2013; WHEAT et al., 2017). Em nossos resultados, observamos uma maior expressão da *IDO* em células estimuladas com *INF-γ* em comparação com as células não estimuladas, independente da idade gestacional, corroborando Saulnier et al. (2016).

que relatam que células da membrana amniótica, placenta e matriz do cordão umbilical canina após a estimulação inflamatória (IFN- γ), apresentaram maior expressão de *IDO* em relação as células não estimuladas. Em contrapartida, no trabalho de Russel et al. (2016) em cães, foi relatado que a adição de fatores pró-inflamatórios como IFN- γ e/ou fator de necrose tumoral não aumentou as propriedades supressoras de linfócitos, quando cocultivados com CTM de tecido adiposo e medula óssea canina estimuladas e não estimuladas (RUSSELL et al., 2016).

Quanto à comparação da expressão quantitativa do gene *IDO* entre as idades gestacionais, identificou-se maior expressão em MAC de terço final. Observações assim também foram relatadas por Catoia et al. (2016) em bovinos, que relatam uma alta concentração de *IDO* em terço final em relação ao terço inicial gestacional, podendo esta afirmação estar diretamente relacionada com a alta concentração do hormônio estrógeno em terço final de gestação, que atua efetivamente nas células imunitárias locais. Em humanos, células de membrana amniótica e cordão umbilical de gestação pré-termo e termo cocultivadas com linfócitos, demonstraram resultados semelhantes, sugerindo que os tecidos fetais pré-termo contém CTM com capacidade imunossupressora semelhante à das gestações a termo (DĄBROWSKI et al., 2017b).

Devido ao reduzido número de estudos com células de membrana amniótica em diferentes estágios gestacionais para dados comparativos, sugere-se que este aumento da *IDO* esteja relacionado com a tolerância materno-fetal proporcionada pela atuação de hormônios e citocinas envolvidas na gestação, pois a diminuição do triptofano e o aumento de catabólitos tóxicos, como a quinurenina, impedem a proliferação de linfócitos T no local da implantação (MUNN et al., 1998; BLANC; RINGDÉN, 2007; EVANGELISTA; SONCINI; PAROLINI, 2008; CURTI et al., 2009). Nos trabalhos de Munn et al. (1998) e Mellor et al. (2001) também é citado a importância da *IDO* na gestação, pois camundongos prenhes expostos a fármacos inibidores da *IDO* não foram capazes de manter a gestação, com consequente rejeição dos fetos iniciada por células T maternas que são normalmente suprimidas por células que catabolizam o triptofano. Com isso, o uso de CT produtoras da *IDO* pode favorecer a indução da tolerância imunológica em casos de tratamentos de

infecções, transplantes, doenças autoimunes e neoplasias (BLANC; RINGDÉN, 2007; CURTI et al., 2009).

Na avaliação quantitativa dos genes *HGF*, *EGF*, *PGE2*, *IL-6* e *IL-10*, não foram observadas as expressões gênicas em MAC, de células estimuladas e não estimuladas nas três idades gestacionais. Apesar do modelo de membrana amniótica canina se aproximar do modelo membrana amniótica humana, em células epiteliais e CTM da membrana amniótica humana foram identificados fatores solúveis ligados a imunomodulação, como HGF, IGF-1, bFGF, IL-6, IL-10, TNF α , TGF- β , EGF e PGE2 (SILINI et al., 2006; MAGATTI et al., 2009; YAMAHARA et al., 2014; DABROWSKI et al., 2017b). Além disso, Koizumi et al. (2000) em humanos relatam maior expressão dos genes HGF e EGF na membrana amniótica cultivada com células epiteliais, sugerindo uma origem epitelial para os referidos fatores de crescimento. Em contrapartida, Wu et al. (2017) em humanos, relatam maior expressão de EGF em células epiteliais e HGF e em células mesenquimais.

Na literatura, embora o potencial imunomodulador das CTM humanas seja bem descrita, na área da medicina veterinária são relatados poucos trabalhos envolvendo as vias imunossupressoras utilizadas pelas CTM em modelo canino (CHOW et al., 2017). Em cães, a primeira descrição do potencial imunomodulador das CTM foi fornecida por Kang et al. (2008), com resultados envolvendo células de tecido adiposo e que demonstraram a expressão dos genes TGF- β , IL-6, IL-8, CCL2, CCL5, EGF, HGF e não expressão de IL-10. Em tecidos como sinóvia, medula óssea e tecido adiposo canino, não foi observada diferença nos níveis de TNF- α e IL-6 em ensaios de cocultura com macrófagos estimulados com LPS, o que sugere que as três fontes de CTM são capazes de estimular a resposta imunomoduladora *in vitro* (BEARDEN et al., 2017). Em células de tecido adiposo e medula óssea canina observou-se a supressão da ativação de linfócitos por meio das vias da ciclooxygenase e do TGF- β , além das vias já conhecidas mediadas por NO ou IDO (CHOW et al., 2017). Além disso, em células de medula óssea canina, Lee et al. (2011) relataram suas CTM eram capazes de inibir a proliferação de leucócitos e destacaram a PGE2 como um potencial fator antiproliferativo.

Este trabalho envolveu o estudo da imunomodulação de MAC com a estimulação exclusiva com IFN- γ , porém na literatura são relatados dados controversos. Em humanos, Rossi et al. (2012), cita que a estimulação imunológica

de células de membrana amniótica é induzida por moléculas solúveis e pelo contato célula a célula e Di Nicola et al. (2002) relatam que o efeito imunomodulador de células de medula óssea ocorre exclusivamente por fatores solúveis. Em contrapartida, Krampera et al. (2013) citam que o efeito imunomodulador da CTM de roedores parece ser predominantemente mediado pelo contato célula a célula. Com isso, a diversidade de resultados sobre a imunomodulação de CTM, pode estar diretamente relacionada ao tecido cultivado ou aos mecanismos inerentes a cada espécie (REN et al., 2009).

Este é o primeiro estudo que comparou a caracterização celular e a expressão de genes relacionados a imunomodulação em células de MAC de diferentes estágios gestacionais. Em conjunto, nossas evidências demonstram que células de membrana amniótica sofrem uma transformação imunofenotípica e funcional durante o período gestacional, com resultados mais satisfatórios obtidos em células de terço final, o que é relevante, pois amostras de MAC de animais em terço final podem ser coletadas em procedimentos de cesariana, não estando envolvidas em questões éticas durante a coleta. Esta conclusão, foi previamente sugerida por Lim et al. (2013) em humanos, quando citam que células derivadas de membrana amniótica de idade pré-termo são menos eficientes em termos de proteção contra inflamação pulmonar e fibrose do que aquelas coletadas do âmnio em terço final. Todos esses resultados sugerem um distinto impacto clínico após seu uso em futuros testes clínicos.

Portanto, nossos resultados proporcionam uma base para futuros estudos que investigarão o papel dos genes que envolvem as CT de MAC. Devido à escassez de dados que confirmem as vias envolvidas na resposta imunomoduladora em cães, concluímos que uma melhor compreensão da imunossupressão mediada por MAC deve ser investigada para futuras aplicações clínicas, podendo futuramente ser uma estratégia de tratamento precisa e eficaz em diversas doenças imunomediadas.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

* Foram realizadas as coletas e isolamento de MAC, com a formação de um banco de células de amostras de terço inicial, terço médio e terço final. Dentre essas amostras, utilizamos cerca de 98% das mesmas para a realização do experimento. Conforme a disponibilidade das amostras, as células de MAC podem ser consideradas ideais para formação de banco celular para futuros experimentos e tratamentos.

* Nos testes de caracterização celular realizados nas três idades gestacionais, foi possível observar características celulares compatíveis com CTM, como aderência ao plástico, alta viabilidade celular após criopreservação, curva de crescimento com alta proliferação celular nas primeiras passagens, presença de formação de UFC-F com variação no tempo da formação entre as idades, diferenciação *in vitro* em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica e perfil imunofenotípico com expressão positiva de marcadores mesenquimais (CD90 e CD105) e expressão baixa ou negativa de marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34). A dificuldade encontrada durante a caracterização foi restabelecer o cultivo celular após o processo de criopreservação.

* As MAC das três idades gestacionais não apresentaram expressão do transcrito *OCT4* e apresentaram baixa expressão do transcrito *SOX-2*, sem diferença estatística entre as idades. Com isso, concluímos que as MAC avaliadas não apresentam características de pluripotência inerentes de acordo com a idade gestacional.

* As MAC das três idades gestacionais apresentaram maior expressão de transcrito *IDO* em células estimuladas com IFN- γ em relação às células não estimuladas. Em relação à idade gestacional, houve maior expressão do transcrito *IDO* em células de membrana amniótica de fetos de terço final. Quanto aos transcritos *HGF*, *EGF*, *PGE2*, *IL-6* e *IL-10* não houve expressão gênica. A maior expressão do transcrito *IDO* em células estimuladas com IFN- γ em terço final demonstra-nos que são células com maior capacidade imunomoduladora em relação às outras idades avaliadas.

Devido à ausência de estudos envolvendo MAC em diferentes idades gestacionais, concluímos que a idade gestacional pode ser considerada um fator chave que pode influenciar as propriedades funcionais e imunomoduladoras das células e que a capacidade imunomoduladora das MAC deve ser investigada e padronizada, para que futuramente possa ser considerada uma estratégia no tratamento de doenças alérgicas e imunomediadas em cães.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 336 p.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, Washington, v. 105, n. 4, p. 1815-1822, 2005.
- AYALA-CUELLAR, A. P. et al. Roles of mesenchymal stem cells in tissue regeneration and immunomodulation. **Biomolecules & Therapeutics**, Seoul, 2018. [Epub ahead of print].
- BARBONI, B. et al. Gestational stage affects amniotic epithelial cells phenotype, methylation status, immunomodulatory and stemness properties. **Stem Cell**, Richmond Hill, v. 10, n. 5, p. 725-741, 2014.
- BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2002. 288 p.
- BEARDEN, R. N. et al. In-vitro characterization of canine multipotent stromal cells isolated from synovium, bone marrow, and adipose tissue: a donor-matched comparative study. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 8, n. 218, p. 1-22, 2017.
- BLANC, K. L.; RINGDÉN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 262, p. 509-525, 2007.
- BORGHESI, J. et al. Phenotype and multipotency of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) amniotic stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 8, p.1-14, 2017.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das CT mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, p. 25-35, 2009. Suplemento 1.
- CAMPOS, L. L. et al. Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 37 n. 3, p. 278-286, 2017.
- CARDOSO, M. T. et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression. in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 51, p. 1-7, 2016. Supplement 3.
- CARMO, D. D. D.; SANTOS Jr, A. R. Aplicação clínica de CT. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC SIC-UFABC, 2., 2009, Santo André. **Anais...** Santo André, 2009. p. 1-3.

CARRADE, D. D. et al. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal. **Cell Medicine**, Thousand Oaks, v. 4, n.1, p. 1-11, 2012.

CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, Memphis, v. 63, n. 3, 207-217, 2013.

CATOIA, J. et al. Phenotyping of the indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) positive lymphocytes in bovine placental cell culture. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 4, p. 345-350, 2016.

CHANG, Y. J. et al. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. **Cells, Tissues, Organs**, Basel, v. 192, n. 2, p. 93-105, 2010.

CHEN, L. et al. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One**, San Francisco, v. 3, n. 4, p. 1-12, 2008.

CHOW, L. et al. Mechanisms of immune suppression utilized by canine adipose and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, v. 26, n. 5, p. 374-389, 2017.

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

CRISOSTOMO, P. R. et al. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, Bethesda, v. 294, p. 675-682, 2008.

CRUVINEL, W. M. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CURTI, A. et al. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. **Blood**, Washington, v. 113, n. 11, p. 2394-2401, 2009.

DABROWSKI, F. A. et al. Mesenchymal stem cells from human amniotic membrane and umbilical cord can diminish immunological response in an in vitro allograft model. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, Basel, v. 82, n. 3, p. 267-275, 2017a.

DĄBROWSKI, F. A. et al. Premature fetal tissues are possible source of valuable mesenchymal stem cells. **Ginekologia Polska**, Warszawa, v. 88, n. 4, p.191-197, 2017b.

DÍAZ-PRADO, S. et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. **Differentiation**, London, v. 81, p. 162-171, 2011.

Di NICOLA, M. et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, Washington, v. 99, p. 3838-3843, 2002.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy positions statement. **Cytotherapy**, Langford Lane, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EDAMURA, K. et al. Effects of cryopreservation on the cell viability, proliferative capacity and neuronal differentiation potential of canine bone marrow stromal cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 76, n. 4, p. 573-577, 2014.

ENGLISH, K. et al. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 110, p. 91-100, 2007.

ENGLISH, K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. **Immunology and Cell Biology**, Garsington, v. 91, p. 19-26, 2013.

ERCOLIN, A. C. et al. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 59-66, 2016.

ERTL, J. et al. Comparative study of regenerative effects of mesenchymal stem cells derived from placental amnion, chorion and umbilical cord on dermal wounds. **Placenta**, London, v. 65, p. 37-46, 2018.

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

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Anatomia Histologia Embryologia**, Berlin, v. 2, p. 11-45, 1973.

FAITA, T. et al. Membrana amniótica: fonte alternativa de CT mesenquimais em diversas espécies animais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 6, p. 520-525, 2016.

FAVARON, P. O. et al. The amniotic membrane: development and potential applications – a review. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, p. 881-892, 2015.

FERNANDES, R. A. et al. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation. **Placenta**, London, v. 33, n. 8, p. 640-644, 2012.

FILIOLI URANIO, M. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from fetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 78, p. 361-373, 2011.

FILIOLI URANIO, M. F. et al. Characterization and in vitro differentiation potency of early-passage canine amnion- and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as related to gestational age. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 81, n. 6, p. 539-551, 2014.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, L. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, Chichester, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1993. 322 p.

HAYNESWORTH, S. E.; BABER, M. A.; CAPLAN, A. I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. **Journal of Cellular Physiology**, Hoboken, v. 166, p. 585-592, 1996.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 455 p.

IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from fetal adnexa and fluid in domestic animals: an update on their features and clinical application. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, n. 3, p. 353-364, 2015.

INTANKER, P. S. et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, Basel, v. 22, p. 1338-1345, 2004.

IIDA, G. et al. Gene expression of growth factors and growth factor receptors for potential targeted therapy of canine hepatocellular carcinoma. **The Journal of Veterinary medical Science**, Tokyo, v. 76, n.2, p. 301-306, 2014.

IZUMI, M. et al. Quantitative comparison of stem cell marker-positive cells in fetal and term human amnion. **Journal Reproduction Immunology**, Tokyo, v. 81, n. 1, p. 39-43, 2009.

IYER, S. S.; ROJAS, M. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 8, n. 5, p. 569-581, 2008.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, New York, v. 149, p.1-38, 2003.

KANG, J. W. et al. Soluble factors–mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue–derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, v. 17, p. 681-694, 2008.

KARIMINEKOO, S. et al. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, London, v. 44, p. 749-757, 2016.

KOIZUMI, N. J. et al. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. **Current Eye Research**, Abingdon, v. 20, n. 3, p. 173-177, 2000.

KOWALEWSKI, M. P. et al. Time related changes in luteal prostaglandin synthesis and steroidogenic capacity during pregnancy, normal and antiprogesterin induced luteolysis in the bitch. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 116, p. 129-138, 2009.

KRAMPERA, M. et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Basel, v. 24, p. 386-398, 2006.

KRAMPERA, M. et al. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells -The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. **Cytotherapy**, Langford Lane, v. 15, n. 9, p. 1054-1061, 2013.

KUMAR, V. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, London, v. 59, p. 391-412, 2018.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2004.

LANGE-CONSIGLIO, U. M. et al. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, Vol. 6, n.8, p. 622-635, 2012.

LANGE, S. et al. Low radiation dose and low cell dose increase the risk of graft rejection in a canine hematopoietic stem cell transplantation model. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 22, p. 637-643, 2016.

LEE, W. S. et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Charlottesville, v. 17, p. 465-75, 2011.

LEE, K. S. et al. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. **Research in Veterinary Science**, London, v. 94, n. 1, p. 144-151, 2013.

LIM, R. et al. Preterm human amnion epithelial cells have limited reparative potential. **Placenta**, London, v. 34, n. 6, p. 486-492, 2013.

LOCKHART, J. A. An interpretation of cell growth curves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 48, n. 3, p. 245-248, 1971.

MA, C. et al. Multilineage potential research of Beijing duck amniotic mesenchymal stem cells. **Cell and Tissue Banking**, Dordrecht, 2018. [Epub ahead of print].

MACHADO, C. V.; TELLES, P. D. S. NASCIMENTO, I. L. O. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 62-67, 2013.

MAGATTI, M. et al. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. **Cell Transplantation**, Thousand Oaks, v. 18, n. 8, p. 899-914, 2009.

MAGATTI, M. et al. Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, v. 11, n. 10, p. 2895-2911, 2016.

MAGATTI, M. et al. The Immunomodulatory properties of amniotic cells: the two sides of the coin. **Cell Transplantation**, Thousand Oaks, v. 27, n. 1, p. 31-44, 2018.

MARCUS, A. J. et al. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane. **Differentiation**, London, v. 76, n. 2, p. 130-144, 2008.

MARTI, L. C.; RIBEIRO, A. A. F.; HAMERSCHLAK, N. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. **Einstein**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 224-228, 2011.

MAURO, A. et al. Isolation, characterization, and in vitro differentiation of ovine amniotic stem cells. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 34, p. 25-28, 2010.

McDONALD, C. A. et al. Immunosuppressive potential of human amnion epithelial cells in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 12, art. 112, 2015.

MEESUK, L. et al. The immunosuppressive capacity of human mesenchymal stromal cells derived from amnion and bone marrow. **Biochemistry and Biophysics Reports**, Amsterdam, v. 3, n. 8, p. 34-40, 2016.

MELIEF, S. M. et al. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. **Stem Cells Translational Medicine**, Hoboken, v. 2, p. 455-463, 2013.

MELLOR, A. L. et al. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 1, p. 64-68, 2001.

MIGLINO, M. A. et al. The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 66, p. 1699-1702, 2006.

MIKI, T. A Rational strategy for the use of amniotic epithelial stem cell therapy for liver diseases. **Stem Cells Translational Medicine**, Hoboken, v. 5, n. 4, p. 405-409, 2016.

MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 238-245, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Placenta e membranas fetais. In: MOORE, K. L. et al. **Embriologia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008a. p. 41.

MOORE, K. L., PERSAUND, T. V. N. Placenta e membranas fetais. In: MOORE, K. L. et al. **Embriologia básica**. 7. ed , Rio de Janeiro: Elsevier, 2008b. p. 75.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. L. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, London, v. 45, 54, p. 1-15, 2013

MUNN, D. H. et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. **Science**, New York, v. 281, n. 5380, p. 1191-1193, 1998.

NAKAMURA, T.; MIZUNO, S. The discovery of Hepatocyte Growth Factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences**, Tokyo, v. 86, p. 588-610, 2010.

NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**, Washington, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.

NERY, A. A. et al. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, Hoboken, v. 83, n. 1, p. 48-61, 2013.

OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einstein**, São Paulo, v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.

OKERE, B. et al. In vitro differentiation of human amniotic epithelial cells into insulin-producing 3D spheroids. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, London, v. 28, n. 3, p. 390-402, 2015.

PARK, S. B. et al. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 9, 2012.

PAROLINI, O.; CARUSO, M.; Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. **Placenta**, London, v. 32, p. 186-195, 2011. Supplement 2.

PRETZER, S. D. Canine embryonic and fetal development: a review. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 70, p. 300-303, 2008.

PHEMISTER, R. D. Nonneurogenic reproductive failure in the bitch. **Veterinary Clinics North American**, Amsterdam, v. 4, p. 573-586, 1974.

PIERI, N. C. G. et al. Comparative development of embryonic age by organogenesis in domestic dogs and cats. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 50, p. 625-631, 2015.

RASMUSSEN, I. et al. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 82, n. 4, p. 887-893, 2007.

REN, G. et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. **Stem Cells**, Basel, v. 27, p. 1954-1962, 2009.

ROSSI, D. et al. Characterization of the conditioned medium from amniotic membrane cells: prostaglandins as key effectors of its immunomodulatory activity. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 10, p. 1-14, 2012.

RUSSELL, K. A. et al. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 12, p. 1-18, 2016.

RUTIGLIANO, L. et al. Molecular characterization and in vitro differentiation of feline progenitor-like amniotic epithelial cells. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 4, n.5, p. 1-13, 2013.

SÁNCHEZ-BERNÁ, I.; SANTIAGO-DÍAZ, C.; JIMÉNEZ-ALONSO, J. Immunomodulatory properties of stem mesenchymal cells in autoimmune diseases. **Medicina Clínica**, Barcelona, v. 144, n. 2, p. 88-91, 2015.

SAULNIER, N. et al. Canine placenta: a promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 171, n. 47-55, 2016.

SILINI, A. R. et al. Is Immune modulation the mechanism underlying the beneficial effects of amniotic cells and their derivatives in regenerative medicine? **Cell Transplantation**, Thousand Oaks, v. 26, n. 4, p. 531-539, 2006.

SOUZA, A. F. et al. Dynamics of male canine germ cell development. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 2, p. 1-22, 2018.

SPEES, F. L.; LEE, R. H.; GREGORY, C. A. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. **Stem Cell Research & Therapy**, London, v. 7, n. 125, p.1-13, 2016.

STOCUM, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. **Wound Repair and Regeneration**, Hoboken, v. 9, p. 429-42, 2001.

SCREVEN, R. et al. Immunophenotype and gene expression profile of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 161, n. 1-2, p. 21-31, 2014.

SHU, J. et al. Transplantation of human amnion mesenchymal cells attenuates the disease development in rats with collagen-induced arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, Ospedaletto, v. 33, n. 4, p. 484-90, 2015.

TAGHI, G. M. et al. Characterization of in vitro cultured bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and their ability to express neurotrophic factors. **Cell Biology International**, Garsington, v. 36, p. 1239-1249, 2012.

TAMAMA, K. et al. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, Basel, v. 24, p. 686-695, 2006.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

VIDANE, A. S. et al. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem Cells and Cloning: advances and applications**, Macclesfield, v. 7, p. 71-78, 2014.

VITA, B. D. et al. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária eqüina. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v.19, n.1, p.8-22, 2012.

YAMAHARA, K. et al. Comparison of angiogenic, cytoprotective, and immunosuppressive properties of human amnion- and chorion-derived mesenchymal stem cells. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 2, 2014.

YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 35, n. 2, p. 213-221, 2012.

XIAN, C. J. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 28, n. 3, p. 284-296, 2007.

ZACHAR, L.; BAČENKOVÁ, D.; ROSOCHA, J. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. **Journal of Inflammation Research**, Macclesfield, v. 9, p. 231-240, 2016.

WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, New York, v. 15, n. 11, p. 1009-1016, 2014.

WENCESLAU, C. V. et al. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver, and bone marrow. **Tissue Engineering. Part A**, New Rochelle, v. 17, n. 17-18, p. 2165-2176, 2011.

WHEAT, W. H. et al. Suppression of canine dendritic cell activation/maturation and inflammatory cytokine release by mesenchymal stem cells occurs through multiple distinct biochemical pathways. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, v. 26, n. 4, p. 249-262, 2017.

WILSHAW, S. P. et al. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. **Tissue Engineering. Part A**, New Rochelle, v. 12, p. 2117-2129, 2006.

WU, Q. et al. Comparison of the proliferation, migration and angiogenic properties of human amniotic epithelial and mesenchymal stem cells and their effects on endothelial cells. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 39, n. 4, p. 918-926, 2017.

WOODING, P.; BURTON, G. Placentation fundamentals. In: _____. **Comparative placentation**: structures, functions and evolution. Berlin: Springer-Verlag, 2008.

ANEXOS

Anexo A - Artigo submetido

Stem Cell Research & Therapy		
Characterization and immunomodulation of canine amniotic membrane stem cells –Manuscript Draft–		
Manuscript Number:	SCRT-D-18-00679	
Full Title:	Characterization and immunomodulation of canine amniotic membrane stem cells	
Article Type:	Research	
Funding Information:	Fapesp (2017/21266-0)	Dr Carlos Eduardo Ambrosio
	Capes (Code 001)	Ms Alessandra Oliveira Pinheiro
Abstract:	<p>Background</p> <p>The stem cells from amniotic membrane have a high rate of proliferation and plasticity, as well as immunomodulatory properties that participate of maternal-fetal tolerance. Because of the lack of studies with human amniotic membrane at different gestational ages, the canine is an ideal model because of its genetic and physiological similarities. Thereby, the objectives of this study were to characterize canine amniotic membrane cells at different gestational stages and evaluate the expression of genes related to immunomodulation.</p> <p>Methods</p> <p>Twenty canine fetuses in different gestational ages were used, initial third (20-30 days) (n=7), middle third (31-45 days) (n=7) and final third (46-63 days) (n=6). The cells were characterized by cell viability tests, growth curve, colony forming unit, in vitro differentiation, cellular immunophenotyping and pluripotency potential. In order to evaluate the immunomodulatory, the cells were submitted to conventional PCR and RT-qPCR, to determine IDO, HGF, EGF, PGE2, IL-6 and IL-10 gene expression.</p> <p>Results</p> <p>CAM cells presented fibroblastoid morphology and adherence to plastic with average the cells viability of 78,5%. Growth curve, showed that the cells presented a growth peak in second passage and colony forming unit we obtained an average of 138,2 colonies. In in vitro differentiation, the cells differed in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. Cellular immunophenotyping showed that the cells were positive for mesenchymal markers (CD90 and CD105) and presented low or negative expression of hematopoietic markers (CD45 and CD34). Evaluation of pluripotency markers showed that, the cells did not express the OCT4 gene and only low SOX2 expression. Qualitative analysis of immunomodulatory function revealed that IDO, HGF, EGF, PGE2 genes were expressed however IL-6 and IL-10 genes were not. Quantitative analysis showed there was only the expression of the IDO gene, with higher expression in the final third.</p> <p>Conclusions</p> <p>In this context, we can conclude that CAM from different gestational stages present characteristics consistent with mesenchymal stem cells and that the final third of the gestational age had better results. Thus, gestational age can be inferred as a key factor that may influence the functional and inferred as a key factor that may influence in the results of stem cell therapies.</p>	
Corresponding Author:	Carlos Eduardo Ambrosio, Ph.D Universidade de Sao Paulo Pirassununga, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo	