RAFAEL GARCIA KARAM

Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina

São Paulo

2019

RAFAEL GARCIA KARAM

Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina

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

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3855
FMVZ

Karam, Rafael Garcia
Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina / Rafael Garcia Karam. – 2019.
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Exossomos. 2. Microvesículas. 3. Mesenquimais. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização de vesículas extracelulares derivadas de âmnio canino", protocolada sob o CEUA nº 2486170118 (ID 005149), sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Ambrósio** *e equipe; Rafael Garcia Karam* - 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 - está 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, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/06/2018.

We certify that the proposal "Characterization of extracellular vesicles derived from dog amnion", utilizing 10 Dogs (10 females), protocol number CEUA 2486170118 (ID 005149), under the responsibility of **Carlos Eduardo Ambrósio** *and team; Rafael Garcia Karam* - 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 - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as 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 Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/21/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 04/2018 a 10/2019 Área: Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres

Origem:	Animais provenientes de campanha				
Espécie:	Cães	sexo: Fêmeas	idade: 1 a 5 anos	N:	10
Linhagem:	SRD		Peso: 10 a 30 kg		

Local do experimento: Os experimentos serão realizados na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP/FZEA - Pirassununga), no laboratório do Grupo de Desenvolvimento em Terapias Inovadoras (GDTI).

São Paulo, 05 de dezembro de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

ERRATA

KARAM,Rafael Garcia. **Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Página	Onde se lê	Leia-se
FICHA CATALOGRÁFICA	49 f.	51 f.
RESUMO	49 f.	51 f.
ABSTRACT	49 f	51 f.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: KARAM, Rafael Garcia

Título: Avaliação do padrão de secreção e morfologia de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Marli Garcia, meu pai Carlos A. F. Karam e meu irmão Leonardo Garcia Karam.

Aos meus avós Maria Rodrigues Garcia e Mauricio Garcia (*in memorian*) meu eterno obrigado.

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas as quais eu quero agradecer, mas primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador acadêmico e da vida o Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de realizar este sonho, sempre me mostrando o caminho e sendo minha maior inspiração acadêmica.

Agradeço a minha família e amigos que sempre me apoiaram na realização deste sonho.

Aos meus colegas de laboratório do Grupo de Desenvolvimento em Terapias Inovadoras - GDTI que sempre me ajudaram nas difíceis atividades do dia a dia: Lina, Priscila, Matheus, Thiago, Valéria, Vanessa, Clésio, Ingrid, Rodrigo, Atanásio, Jéssica e Luciana. Agradeço também aos meus colegas da Anatomia da FMVZ/USP que sempre me ajudaram e me acolheram nas idas a São Paulo.

A minha eterna Professora Celina Almeida Furlanetto Mançanares, que me deu a primeira oportunidade de fazer pesquisa na graduação e que sempre acreditou em meu potencial.

Agradeço a agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

"Podemos julgar o coração de um homem pela forma como ele trata os animais."

Immanuel Kant

RESUMO

KARAM, R. G. **AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE SECREÇÃO E MORFOLOGIA DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O estudo das vesículas extracelulares (VEs) secretadas pelas células-tronco mesenquimais (CTM) em cultura pode ajudar a entender de maneira mais concisa o seu funcionamento. Este trabalho tem como objetivo comparar a quantidade e tamanho das vesículas extracelulares pequenas (até 150nm) derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina. Foram isoladas células da membrana amniótica de cadelas, cultivadas e caracterizadas. Para responder ao nosso objetivo, o número de células foi normalizado em cada passagem. As CTM isoladas apresentaram uma curva de crescimento crescente até atingir a segunda passagem, seguindo-se uma diminuição até a quinta passagem. As células foram diferenciadas em tecido adipogênico, condrogênico e osteogênico. Análises por citometria de fluxo mostraram que as CTM foram positivas para marcadores mesenquimais CD90 (62,6%) e CD105 (89,5%) e negativas para marcadores hematopoiéticos CD34 (5,2%) e CD45 (3,1%). Para a análise de VEs, as células em diferentes passagens (P0-P2) foram cultivadas até atingir 80% de confluência, em seguida, o meio foi substituído por meio livre de VEs (previamente ultracentrifugado). Após 48h, o meio de cultura foi removido e centrifugado para isolar as VEs, seguido por análise de nanosight para medir a concentração e o tamanho das VEs. A caracterização por western blot também foi realizada. As VEs foram positivas para Alix e negativos para Citocromo C. Os resultados demonstraram que a concentração nessas diferentes passagens analisadas foi aumentada em P0 comparado a P1 e P2 (P0=1,2x109±71220315, P1=3,8x108±54173333, e P2=3,3x108±170128967). No entanto, não foram encontradas diferenças no tamanho das VEs (P0 = 132nm, P1 = 130nm e P2 = 120nm). Estes resultados demonstram que a passagem inicial é enriquecida de VEs quando comparada com as passagens posteriores, indicando um efeito de deficiência in vitro no padrão de secreção das VEs.

Palavras-chave: Exossomos. Microvesículas. Mesenquimais.

ABSTRACT

KARAM, R. G. **EVALUATION OF SECRETORY PATTERN AND MORPHOLOGY OF EXTRACELLULAR VESICLES DERIVED FROM CANINE AMNIOTIC MEMBRANE STEM CELLS**. 2019. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The study of the extracellular vesicles (EVs) secreted by stem cells in culture may help to understand in a more concise way their functioning. This work aims to compare the amount and size of the small extracellular vesicles (up to 150nm) derived from stem cells derived from the canine amniotic membrane. Bitches cells from the amniotic membranes were isolated, cultured and characterized. In order to answer our aim the number of cells was normalized at each passage. The isolated stem cells presented an increasing growth curve until reach the second passage, following by a decrease until the fifth passage. The cells were differentiated into adipogenic, chondrogenic and osteogenic tissue. Flow cytometry analysis showed that the MSC were positive for CD90 (62.6%) and CD105 (89.5%) and negative for CD34 (5.2%) and CD45 (3.1%), mesenchymal and hematopoietic marks, respectively. For EV analysis, cells in different passages (P0-P2) were culture until reach 80% of confluence, then the medium was replaced by EVs depleted medium (previously ultracentrifugated). After 48h, culture medium was removed and centrifuged to isolate EVs, followed by nanosight analysis to measure the EVs concentration and size. The EVs were also characterized by western blot. They were positive for Alix and negative for Cytochrome C. Our results demonstrated that the concentration in those different passages analyzed was increased in P0 compared to P1 and P2. However, no differences were found in EVs size (P0=132nm, P1=130nm and P2=120nm). These results demonstrate that earlier passage is enriched of EVs when compare to later passage, indicating an in vitro impairment effect on EVs secretion pattern.

Keywords: Exosome, Microvesicles, Mesenchymal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Feto canino com idade aproximada de 55 dias 25
Figura 2 - Coleta de membrana amniótica 26
Figura 3 - Fotomicrografia da morfologia das células derivadas de MAC 27
Figura 4 - Gráfico mostrando a curva de crescimento 28
Figura 5 - Gráfico mostrando o *Doubling time* 28
Figura 6 - Placa com formação de colônias.....29
Figura 7 - Diferenciação adipogênica 30
Figura 8 - Diferenciação condrogênica 31
Figura 9 - Diferenciação osteogênica 32
Figura 10 - Analise da citometria de fluxo 33
Figura 11 - Gráfico de tamanho de VEs 34
Figura 12 - Análise de Western Blotting 35
Figura 13 – Média de tamanho das VEs 35
Figura 14 – Média de concentração das VEs.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição e especificação dos anticorpos primários e secundários utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em células-tronco de membrana amniótica canina.....22
Tabela 2 - Porcentagem de células viáveis após o processo de criopreservação...27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13

2 REVISÃO DE LITERATURA 14

3 HIPÓTESE 18

4 OBJETIVOS GERAIS 18

4.1 Objetivos específicos 18

5 MATERIAIS E MÉTODOS 19

5.1 EXPERIMENTO 1 - CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA 19

5.1.1 Animais 19

5.1.2 Obtenção dos úteros e caracterização do tempo gestacional 19

5.1.3 Coleta, isolamento e cultivo de membrana amniótica canina 20

5.1.4 Repique celular 20

5.1.5 Criopreservação 21

5.1.6 Curva de crescimento 21

5.1.7 Unidade formadora de colônias (UFC-F) 22

5.1.8 Diferenciação in vitro 22

5.1.8.1 Diferenciação adipogênica 23

5.1.8.2 Diferenciação osteogênica 23

5.1.8.3 Diferenciação condrogênica 23

5.1.9 Citometria de fluxo 24

5.2 EXPERIMENTO 2 – ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA 25

5.2.1 Isolamento de vesículas extracelulares 25

5.2.2 Caracterização das VEs por nanosight 26

5.2.3 Western Blotting 26

5.2.4 Análise Estatística.....27

6 RESULTADOS 28

6.1 Obtenção dos úteros e caracterização do tempo gestacional 28

6.2 Repique celular 29

6.3 Criopreservação e viabilidade celular 30

6.4 Curva de crescimento 30

6.5 Avaliação da capacidade de formação de colônias (UFC-F) 32
6.6 Diferenciação in vitro 32
6.6.1 Diferenciação adipogênica 32
6.6.2 Diferenciação condrogênica 33
6.6.3 Diferenciação osteogênica 34
6.7 Citometria de fluxo 35
6.8 Isolamento das VEs 36
6.9 Caracterização das VEs por nanosight 36
6.10 Western Blotting 37
6.11 Análise estatística do tamanho e concentração das VEs.....38
7 DISCUSSÃO 40
8 CONCLUSÕES 44
REFERÊNCIAS 45

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do número de doenças crônicas no mundo, a busca por terapias alternativas e inovadoras vem crescendo gradativamente. Desde a descoberta do potencial terapêutico das células-tronco (CT) na regeneração tecidual, seus estudos não param de crescer a fim de solucionar os problemas causados por diversas patologias. Porém a sua utilização vem gerando alguns problemas éticos e morais quando utilizadas células de origem embrionária, fato que nem sempre é aceitável por grande parte das pessoas.

Para o seu uso na medicina veterinária, as CT são extraídas de diversas fontes de tecido fetal ou adulto, e entre elas está a membrana amniótica, a qual apresenta baixa tumorigenicidade e maior multipotencialidade quando comparada a outros tecidos adultos, o que as torna mais acessível para transplantes alogênicos (CARDOSO et al., 2016). Pelo fato da membrana amniótica ser descartada como lixo biológico, seu uso se torna mais acessível, barato e evita problemas éticos e morais, permitindo assim sua coleta e cultivo sem procedimentos mais invasivos. Células-tronco da membrana amniótica já foram relatadas anteriormente em diferentes espécies, inclusive humanos, apresentando sucesso no cultivo (MIHU et al., 2009).

Para melhor compreensão das células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica canina (MAC) precisamos estudar também os componentes secretados e recebidos por estas, como por exemplo as vesículas extracelulares (VEs). Essas vesículas podem ser classificadas de acordo com o tamanho, (<150nm) pequenas ou (>150nm) média ou grande (THÉRY et al., 2018). As vesículas extracelulares são resultado de um processo complexo de secreção celular e contém uma bicamada lipídica e formato esférico, além de seu interior contendo proteínas, lipídios bioativos, microRNAs (miRNAs), mRNAs e DNA (ZHANG et al., 2015; BONAFEDE et al., 2016; HUANG et al., 2016; GONG et al., 2017). A secreção dessas vesículas resulta em uma interação celular, que pode ser levada pelos fluidos corpóreos a qualquer parte do corpo, tornando essa comunicação praticamente irrestrita.

Este trabalho tem como objetivo comparar a quantidade e tamanho das vesículas extracelulares pequenas (até 150nm) derivadas de células-tronco da membrana amniótica canina em diferentes fases de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As células-tronco apresentam capacidade de diferenciação e auto renovação. Os estudos realizados com células-tronco mesenquimais são direcionados aos seus efeitos terapêuticos e podem ser extraídas de várias fontes de tecidos, como sangue do cordão umbilical (LEE et al., 2004; WANG et al., 2004; BAKSH; YAO; TUAN, 2007), tecido adiposo (ZUK et al., 2002; RADA; REIS; GOMES, 2011), membrana amniótica (PARK et al., 2012; CARDOSO et al., 2016), fluido amniótico (PERIN et al., 2007; STEIGMAN; FAUZA, 2007; YOU et al., 2008), saco vitelino (MANÇANARES et al., 2015); medula óssea (KASTRINAKI et al., 2008), sangue periférico (VILLARON et al., 2004) e placenta (MATIKAINEN; LAINE, 2005; STEIGMAN; FAUZA, 2007; BARLOW et al., 2008).

Segundo Miglino et al. (2006), durante o desenvolvimento embrionário, por volta do 20º dia, o saco vitelino se torna proeminente, e já se pode notar a membrana amniótica avascular cobrindo o embrião. Por volta do 24º dia é possível observar o líquido amniótico translúcido presente e a membrana alantoide.

O anexo fetal é o conjunto da placenta, membranas fetais e cordão umbilical. As membranas fetais, que consistem no âmnion, alantoide, saco vitelino e córion, são essenciais para o desenvolvimento do embrião, e ajudam na nutrição, proteção e excreção embrionária. O âmnion que é a membrana extraembrionária mais intima com o embrião, histologicamente é composta por células cuboides amnióticos e desempenha um papel importante pois forma um saco contendo o líquido amniótico (FAVARON et al., 2015).

As membranas fetais apresentam propriedades imunorreguladoras e em seres humanos já existem relatos de células tronco derivadas da membrana amniótica que apresentaram auto renovação e diferenciação (BOSSOLASCO et al., 2006; KITA et al., 2010). A membrana amniótica humana já foi utilizada em tratamentos de feridas cutâneas, queimaduras, e na reconstrução superficial ocular (AVILA et al., 2001; GOMES et al., 2005). Em cães a membrana amniótica também já foi utilizada para diversos tratamentos, como queimaduras (ANDONOVSKA et al., 2008) e no tratamento da ceratoconjuntivite seca (BITTENCOURT et al. 2016).

As células-tronco derivadas de epitélio amniótico canino apresentam semelhanças características das mesmas células amnióticas humanas, como

proliferação celular vigorosa, e podem ser usadas para terapias em medicina regenerativa (DOMINICI, 2006; PARK et al., 2012; CARDOSO et al., 2016).

Estudar os componentes secretados e recebidos pelas células do meio externo, como proteínas, lipídios, e vesículas extracelulares (VEs) é fundamental para a compreensão do organismo como um todo (HAN; GROSS, 2003). Conforme a célula recebe componentes externos a ela, como as VEs, processos físicos e químicos são iniciados, podendo alterar o meio intracelular e extracelular (THÉRY, 2011).

As comunicações celulares podem ser classificadas como autócrina, parácrina, sinal endócrino, e comunicação por junções celulares (HARRIS, 2005; BOBRIE et al., 2011; SINGH; ZHANG et al., 2015; BONAFEDE et al., 2016; HUNG; LEONARD, 2016). Sob esse aspecto, as VEs vêm sendo alvo de intensos estudos, devido a suas potenciais aplicações clínicas, como biomarcadores ou como ferramentas terapêuticas (THÉRY, 2011; AKERS et al., 2015; BÁTIZ et al., 2016).

As VEs possuem diferentes tamanhos, e este é um dos dados utilizados para classificá-las através do seu diâmetro, como por exemplo: microvesículas (MV), que possuem de 150 – 1000 nm de diâmetro e exossomos com 30 – 150 nm de diâmetro (HEIJNEN et al., 1999; MORELLO et al., 2013; ZHANG et al., 2015). A sua biogênese e vias celulares, assim como sua carga, as moléculas de superfície e a composição da membrana também são fatores fundamentais para a classificação das VEs (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Tais estruturas já foram relatadas pelo seu papel na comunicação entre células, formando uma rede contínua no organismo (THÉRY, 2011). O processo de secreção das VEs é extremamente complexo e envolve muitos processos metabólicos, hormonais, fatores de crescimento, citosinas e moléculas da matriz extracelular, tudo isso para que a comunicação seja efetiva e direcionada. Com o avanço de pesquisas e estudos na área, acredita-se que outros mecanismos complexos possam ainda ser descobertos e desvendados completamente (HEIJNEN et al., 1999; RAPOSO; THÉRY, 2011; STOORVOGEL, 2013; BÁTIZ et al., 2016).

As VEs secretam substâncias que resultam na interação com células semelhantes ou não, e através dos fluidos corpóreos expande a comunicação celular de forma praticamente irrestrita (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; THÉRY, 2011).

Os exossomos ganharam importância nos últimos anos devido a presença dos miRNAs estáveis e protegidos da degradação contidos em seu lúmen. Os miRNAs são importantes devido aos seus papéis reguladores na expressão gênica (ZHANG et

al., 2015). Esses miRNAs estão presentes em diversas atividades biológicas como migração celular, diferenciação celular assim como alterados em início de doenças (MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2008; PNG et al., 2012). Os miRNAs podem ser encontrados nas VEs de forma estável em diversos fluidos corporais, como saliva (MICHAEL et al., 2010), sangue (GALLO et al., 2012; FREEDMAN et al., 2016), leite materno (ZHOU et al., 2012) e urina (LV et al., 2013; YERI et al., 2017)

Os exossomos são produzidos em compartimentos multivesiculares endossômicos e secretados à medida que se funde com a membrana plasmática (LÖTVALL et al., 2014) e participam das atividades celulares realizando troca de informações entre células, e esta interação intercelular pode ocorrer de três formas, pelas proteínas transmembranares dos exossomos que diretamente interage com os receptores de sinalização da célula alvo (MUNICH et al., 2012), pelos exossomos se fundirem com a membrana plasmática de células receptoras entregando seu conteúdo (TIAN et al., 2013; MULCAHY et al., 2014),

Para a medicina, os exossomos possuem grande importância, visto que segundo Vader et al., (2016) os exossomos poderiam evitar o reconhecimento pelo sistema imunológico, mantendo assim a integridade da membrana celular para evitar a degradação da mesma. O potencial terapêutico dos exossomos é ainda analisado no trabalho de Zhao et al., (2017), onde a aplicação de exossomos derivados de células epiteliais de tecido amniótico humano foram capazes de promover significativamente a cicatrização de feridas na pele e inibir a formação de cicatrizes em ratos.

As VEs também são secretadas por células cancerígenas e desempenham um papel na neovascularização e metástase (KIM et al., 2003; DANG et al., 2005; CHOI et al., 2012). Estudos recentes mostram efeitos benéficos observados após o transplante de VEs em modelos pré-clínicos de doenças isquêmicas (ZHANG et al., 2016). Em particular, muitos estudos relataram a eficácia de VEs de células estaminais mesenquimais adultas no fornecimento de cardioproteção contra infarto agudo do miocárdio (LAI et al., 2010; ARSLAN et al., 2013; BIAN et al., 2014), no aprimoramento da cicatrização de feridas (ZHANG et al., 2015), reduzindo a lesão renal (BRUNO et al., 2012) mediando a regeneração hepática (TAN et al., 2014) e estimulando a plasticidade neural após o acidente vascular cerebral (XIN et al., 2012).

As VEs podem desempenhar também um importante papel como biomarcadores, principalmente pelo fato de os marcadores de câncer atuais estarem

atrelados a muitos problemas como falso negativo, falso positivo e a falta de especificação tumoral (PERKINS et al., 2003). Além disso a biópsia de um tumor é um método invasivo e em muitos casos, prejudicial ao paciente. Já os miRNAs extracelulares presentes nas VEs podem ser detectados em qualquer fluido corporal (THIND; WILSON, 2016). Ainda segundo Koga et al. (2011), os exossomos proporcionam uma fonte estável de miRNAs, impedindo sua degradação, tornando uma fonte de armazenamento e recuperação eficiente.

3. HIPÓTESE

As células-tronco derivadas da membrana amniótica canina apresentam diferenças significativas no padrão de secreção em suas diferentes passagens de cultivo, portanto os exossomos podem ser considerados como marcadores da qualidade das células-tronco da membrana amniótica canina.

4. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o tamanho e concentração de vesículas extracelulares originadas de células-tronco da membrana amniótica canina, e demonstrar uma ligação entre as concentrações de VEs e a capacidade de crescimento celular em diferentes etapas do cultivo.

4.1 Objetivos específicos

- Isolar, cultivar e formar um banco de células-tronco de membrana amniótica canina.
- Avaliar as concentrações de VEs pequenas em diferentes passagens de cultivo de células-tronco da membrana amniótica canina.
- Avaliar o tamanho das VEs em diferentes passagens de cultivo das células-tronco da membrana amniótica canina.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido para o comitê de ética animal da instituição de origem (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP) e aprovado sua realização (CEUA nº 2486170118).

Para melhor compreensão do experimento, o projeto foi dividido em duas etapas, sendo a primeira constituída da caracterização de células-tronco da membrana amniótica canina, e a segunda análise das VEs derivadas de membrana amniótica canina.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA

5.1.1 Animais

Foram utilizadas aproximadamente doze cadelas prenhas, sem raça definida (SRD) e saudáveis, as quais foram submetidas a ovariosalpingehisterectomia (OSH). Para tanto, os pacientes foram submetidos ao seguinte protocolo anestésico: relaxante muscular (Acepromazina + Meperidina 0,05mg/Kg + 2mg/kg), anestésico (Propofol 5mg/kg) e anestesia inalatória (Isoflurano). No pós-cirúrgico os animais receberam terapia antibacteriana (Cefalexina 22-30mg/kg), analgésicos (Tramadol 1-4mg/kg), anti-inflamatório (Meloxican 0,1 - 0,2mg/kg) e cuidado local (Rifamicina).

5.1.2 Obtenção dos úteros e caracterização do tempo gestacional

Para melhor padronização dos animais, foram utilizados apenas fetos em idade gestacional acima de 42 dias (terço-final), utilizando a metodologia proposta por Evans; Sack, (1973) e Pieri et al., (2015) por meio da técnica de Crow-Rump (CR) e análise macroscópica dos embriões.

Os úteros gravídicos obtidos foram transportados em caixas de isopor contendo gelo reciclado e embalado em sacos plásticos, devidamente fechados.

Após a chegada ao laboratório os úteros e os cornos uterinos foram lavados com solução PBS (Phosphate Buffer Solution) 1X com 5% de penicilina/estreptomicina (Gibco Nº 15140-122), para a retirada de muco ou debris celulares. Após esse procedimento, os cornos uterinos foram dissecados, incisados e as membranas extraembrionárias rebatidas até a exposição e retirada dos fetos. Todo o procedimento

para o isolamento do feto e cultivo das células germinativas embrionárias caninas foram realizados em fluxo laminar e sob condições estéreis.

5.1.3 Coleta, isolamento e cultivo de membrana amniótica canina

Após a conclusão da etapa supradescrita, foram obtidas amostras de tecido amniótico conforme descrito por Park et al., (2012). A membrana amniótica foi separada da placenta de forma mecânica. O tecido, sob condições estéreis, foi submetido a várias lavagens consecutivas com PBS suplementado com uma solução de penicilina/estreptomicina a 5%. Em seguida, submetido ao processo de maceração mecânica com o auxílio de uma lâmina de bisturi até a obtenção de uma amostra homogênea.

O material obtido foi submetido a digestão enzimática por meio da colagenase tipo I (1-2 mg/ml; C2674-100MG, SIGMA-ALDRICH) e incubação em estufa a 38ºC, com umidade relativa de 80% e atmosfera gasosa de 5% de CO2, durante aproximadamente duas horas. Subsequentemente, as amostras de tecido foram inativadas com 1 mL de meio DMEM/F12 (Invitrogen, cat. Nº 10565-018) e centrifugadas a 309 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio DMEM/F12, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB - Invitrogen. cat. Nº 12657-029), 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma. cat. Nº M-7145), 1% de L-glutamina (Life. cat. Nº 25030-081), 1% penicilina/estreptomicina.

Por último, o conteúdo foi transferido para uma garrafa de cultivo de 75 cm² (Corning REF 430720U) e cultivado em meio DMEM/F12 suplementado conforme descrito anteriormente, a 38,5ºC numa atmosfera de 5% de CO2. A reposição do meio foi efetuada a cada 24 horas para a remoção das células não aderentes. Para os cultivos subsequentes foi utilizado o mesmo meio de cultivo.

5.1.4 Repique celular

Após 48 horas de cultivo, as células não aderentes foram removidas e o meio substituído. Com 80 a 90% de confluência, as células foram removidas com o auxílio de solução de tripsina a 0,25% (Tryple Express, Invitrogen, cat. Nº 12604). O meio foi descartado e adicionado a quantidade de tripsina proporcional ao tamanho do mesmo. As garrafas com tripsina foram incubadas em estufa à 38,5ºC por 10 minutos ou até a total de adesão das células observadas ao microscópio invertido (Labomed Modelo

TCM400). Imediatamente, o conteúdo foi transferido para um tubo Falcon (15 mL) e submetido a centrifugação por 5 minutos a 309 g, sendo o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo para a contagem celular e replaqueado em garrafas de cultivo de 75 cm² para retornar ao cultivo sob as mesmas condições descritas anteriormente.

5.1.5 Criopreservação

Para criopreservação, as células foram distribuídas em criotubos (2 mL) contendo meio de congelamento composto por 45% de DMEM/F-12, 45% de soro fetal bovino e 10% Dimetil-Sulfóxido (DMSO – D4540) (ERCOLIN et al., 2016).

Os criotubos foram levados a -80ºC alocados em container de congelamento lento (Mr. Frosty), que permite a diminuição lenta da temperatura em -1ºC por minuto e em 24 h, os criotubos foram transferidos para um tanque com nitrogênio líquido e permaneceram armazenados para a posterior utilização.

Após o descongelamento, foi realizado a contagem celular afim de determinar a viabilidade celular na câmara de Neubauer. As células foram posteriormente analisadas em diferentes testes.

5.1.6 Curva de crescimento

Para a avaliação da curva de crescimento foi utilizado o protocolo adaptado de Vidane et al., (2014) em felinos. Foram plaqueadas células em P1 numa densidade de $3x10^4$ em placas de Petri (35mm) em triplicata. Após a confluência celular, as células foram tripsinizadas e contadas.

A contagem foi feita retirando o meio e acrescentando 2 mL de tripsina por aproximadamente 10 minutos em estufa a 38,5ºC. Após esse processo as soluções foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e acrescentado mais 2 mL de meio de cultura para inativar a tripsina. Os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 303xg. Um pellet foi formado e a solução descartada. Foi acrescentado 1 mL de meio de cultura e o pellet ressuspendido para uma homogenização da amostra.

Foi colocado 10 µL da solução em uma Câmara de Neubauer para contagem celular. Foi realizado a contagem dos quatro quadrantes grandes das extremidades, sendo o total de células vivas multiplicado por 1 (fator de diluição) e por 10^4 (profundidade da câmara e correção por mL), sendo o resultado dividido por quatro (número de quadrantes contados), conforme descrito a seguir.

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

Posteriormente, as células foram replaqueadas na mesma quantidade anterior ($3x10^4$) em novas placas de Petri de 35 mm. O processo se repetiu até a quinta passagem, pois nessa o número de células contadas após o repique celular era menor do que o número de células plaqueadas.

Após estabelecer o padrão da curva de crescimento foi feito o tempo de geração dessas células (Doubling time), onde o tempo de geração das células (Dt) era igual ao tempo de cultivo (Ct) dividido pelo número de células duplicadas (Cd).

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

5.1.7 Unidade formadora de colônias (UFC-F)

A capacidade das células-tronco da membrana amniótica canina em formarem colônias foi avaliada segundo o protocolo de Vidane et al., (2014) e Ercolin et al., (2016).

Em uma placa de cultivo de 100 mm de diâmetro foram plaqueadas células em densidades de $1x10^3$, $1x10^4$ e $1x10^5$ em primeira passagem e incubadas a 38ºC numa atmosfera de 5% de CO2. Foi efetuada a reposição do meio de cultivo a cada quatro dias, durante aproximadamente 13 dias. Após este período as culturas foram lavadas duas vezes com solução tampão PBS 1X, fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos, lavadas novamente com tampão PBS e coradas com Giemsa 0,1% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a última etapa, o número colônias celulares foi observada e contada.

5.1.8 Diferenciação in vitro

Para a diferenciação in vitro, foi utilizado um protocolo adaptado de Vidane et al., (2014). As células de membrana amniótica canina foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em células da linhagem osteogênicas, adipogênica e condrogênica com a utilização do kit de diferenciação StemX Vivo™ da R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EUA, CCM007), de acordo com o protocolo do fabricante. Foi

utilizado células em terceira passagem (P3) para a diferenciação. Os controles negativos foram realizados sem meio de indução.

5.1.8.1 Diferenciação adipogênica

Para o processo de diferenciação adipogênica foi utilizado meio D/MEM F12, com 5% de SFB, 1% de glutamina e 1% Penicilina/Streptomicina.

Foram utilizadas células da MAC em terceira passagem, plaqueadas $10x10^4$ células por poço em uma placa de oito poços, e cultivadas com o meio descrito acima. O meio foi trocado a cada 48 horas durante sete dias, período o qual as células apresentaram confluência de 90%. Após esse processo foi acrescentado meio base osteogênico/adipogênico (StemXvivo™ Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic CCM007) com 1% de penicilina/streptomicina e trocado a cada 4 dias. Após 14 dias o meio base foi removido e os poços foram lavados com solução PBS 1X, duas vezes durante cinco minutos cada. Em seguida as células foram fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. Após esse processo foram novamente lavadas com PBS 1X, três vezes durante cinco minutos cada. Foi utilizado o Sudan Black durante 15 minutos no escuro e finalizado com três lavagens consecutivas de cinco minutos cada de PBS 1X.

5.1.8.2 Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação osteogênica foram plaqueadas $3x10^5$ células (P2) em quatro poços de uma placa de 24 poços. Foi acrescentado meio de cultivo DMEM, como o descrito anteriormente para cultivo até que elas obtivessem 80% de confluência. Posteriormente três poços foram cultivados com meio diferenciador osteogênico (6,75mL de Osteocyte/Chondrocyte StemPro differentiation basal médium + 750µL de osteogenesis supplement + 50µL de gentamicina), e o outro com o mesmo meio DMEM para cultivo celular sendo o grupo controle. O cultivo aconteceu durante 21 dias e os meios trocados a cada quatro dias. Após o término, os poços foram lavados com solução PBS 1X e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 30 minutos. As células foram lavadas duas vezes em água destilada e os poços cobertos por Alizarin Red por três minutos. Ao final as células foram lavadas novamente com água destilada por três vezes.

5.1.8.3 Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação condrogênica foram plaqueadas $8x10^4$ células (P2) em quatro poços de uma placa de 24 poços. As células foram plaqueadas em gotas e posteriormente colocadas em estufa por duas horas para sua secagem. Posteriormente foram adicionados 300µL de meio diferenciador condrogênico (5,67mL de Osteocyte/Chondrocyte StemPro differentiation basal médium + 630µL de Chondrogenesis suplement + 50µL de gentamicina) preparado anteriormente em três poços e no outro foi adicionado meio DMEM como descrito anteriormente para cultivo, sendo o grupo controle. As células foram cultivadas por 14 dias e o meio trocado a cada dois dias. Ao final desse procedo o meio foi removido, lavado em solução PBS 1X e fixado em solução paraformaldeído 4% por 30 minutos. As células foram lavadas novamente com solução PBS 1X e os poços cobertos por Alcian Blue por 30 minutos. Ao final as células foram lavadas novamente por três vezes em água destilada.

5.1.9 Citometria de fluxo

O protocolo de citometria de fluxo foi adaptado de Vidane et al., (2014); Ercolin et al., (2016) e Cardoso et al., (2016). 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 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 analisadas em citômetro de fluxo utilizando um FACSCAria Cell Sorter software V.6.1.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os filtros que foram utilizados nos equipamentos acima foram ajustados para a luz de emissão para o fluorocromo FITC (525 nm). A descrição dos anticorpos que foram utilizados nesta etapa encontra-se na tabela 1.

Tabela 1 – Descrição e especificação dos anticorpos primários e secundários utilizados para a caracterização de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em células-tronco de membrana amniótica canina.

Anticorpo	Antígeno	Empresa	Código	Espécie	Mono/poli	Especificidade/Reatividade
CD105	IgG2b	Abcam	156756	Mouse	Mono	Mouse, Rat, Dog, Human, Monkey
CD34	IgG1	eBioscience	12-0340-42	Mouse	Mono	Dog
CD90	IgG2b	eBioscience	12-5900-42	Rat	Mono	Dog
CD45	IgG2b	eBioscience	11-5450-42	Rat	Mono	Dog
CD14	IgG2a	BioLegend	301803	Mouse	Mono	Human
Goat mouse	Anti-IgG	Dako	F0479	Mouse	Poli	Mouse

5.2 EXPERIMENTO 2 – ANÁLISE DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO DA MEMBRANA AMNIÓTICA CANINA

5.2.1 Isolamento de vesículas extracelulares

Para isolar as VEs de células amnióticas caninas anteriormente cultivadas, foram utilizadas etapas de centrifugação diferencial e ultracentrifugação, usando o meio de cultivo das mesmas. O protocolo de isolamento foi adaptado de Connolly et al., (2015) e Zhao et al., (2017).

Quando as células em cultivo atingiram 80% de confluência na passagem P0, P1 e P2, o meio de cultivo era então trocado por outro meio livre de VEs, o qual havia sido anteriormente centrifugação (119700g por 14 horas), o novo meio permaneceu junto as células por 48 horas e posteriormente retirado e analisado.

Os meios foram submetidas a centrifugações consecutivas, sendo a primeira por 300 g durante 10 min, onde após o processo o pellet contendo células foi descartado e o sobrenadante centrifugado novamente a 2.000 g durante 10 minutos, o pellet contendo debris celulares foi novamente descartado e o sobrenadante contendo VEs foi centrifugado a 16.500 g durante 30 min, ambas a temperatura de 4ºC (Gyrozen, 1730R). O sobrenadante contendo VEs pequenas foram armazenados em freezer a -80ºC para posterior análise.

Após o descongelamento em temperatura ambiente do sobrenadante congelado anteriormente, foram submetidas a uma passagem em filtro de seringa de 0,22µm (KASVI K18-230) para tubos e pesadas para manter a mesma massa, devido à alta sensibilidade da ultracentrífuga (Optima XE-90 Ultracentrifuge). As amostras foram submetidas a uma rotação de 119700 g por 1:10 horas a 4ºC. Em seguida o sobrenadante foi retirado e ressuspendido 2 mL de PBS e centrifugado novamente nas mesmas condições. Ao final da segunda centrifugação as VEs foram ressuspendidas em 20µL de PBS para posterior análise.

5.2.2 Caracterização das VEs por Nanosight

O Nanosight foi utilizado para análise do tamanho e concentração das vesículas extracelulares que foram anteriormente isoladas do meio de cultivo das células-tronco. Foi coletado o meio de células em cultivo em P0, P1 e P2, ambas contendo a mesma quantidade de células, a fim de se comparar suas concentrações de VEs pequenas.

Para caracterização das VEs foi utilizado o Nanosight (NS300, NTA 3.1 Build 3.1.45; Malvern), que é um equipamento usado para análise de nanopartículas. Foi utilizado seguindo protocolos de outros estudiosos (HUNG; LEONARD, 2016). Os vídeos foram feitos com a câmera (sCMOS) no nível 14 a 37,0 °C, calibrando com 100 nm de beads para garantir a acurácia do equipamento. As VEs foram diluídas em PBS (1:100) e colocadas no nanosight (500µL), para a fotodocumentação. Foram feitos 5 vídeos de 30 segundos cada e considerados o threshold 5 para análise dos dados.

5.2.3 Western Blotting

O Westerns Blotting foi realizado para caracterização de VEs com marcação de anticorpos específicos para exossomos. O meio contendo as VEs pequenas armazenado anteriormente foi descongelado.

As VEs pequenas foram isoladas e ressuspendidas em RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), assim como as células-tronco de onde foram derivadas para o controle, foi utilizado o protocolo de acordo com o fabricante. As amostras foram transferidas para o gel contendo 12% de poliacrilamida SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA). Por um período de 2:30 horas, as amostras correram em 100 volts e depois o gel colocado junto com a membrana de nitrocelulose (Biotrace NT, Pall Life Sciences, Pensacolla, Florida, USA), e transferidas por 120 minutos a 80

volts úmido. Após o procedimento, a membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo 5% de BSA com solução tampão salina tris com Tween 20 por uma hora. Posteriormente o anticorpo primário rabbit polyclonal anti-Alix (0,5 µg/mL, N-20: SC-49267, Santa Cruz Biotechnology), o ACTB (0,5 µg/mL, SC-15363, Santa Cruz Biotechnology) e o Citocromo C (C-20: SC-8385, Santa Cruz Biotechnology) foram adicionados e incubados por pelo menos 12 horas a 4ºC. Em seguida a membrana foi lavada três vezes por cinco minutos em solução tampão salina tris a 0,1% Tween 20, seguido por incubação de uma hora com o anticorpo secundário Anti-rabbit IgG (HRP-linked Antibody 7074S) para Alix e Donkey anti-goat (IgG-HRP SC-2020) para Citocromo C. Posteriormente iniciou-se três lavagens das membranas com cinco minutos cada com 1X de tampão salina tris a 0,1% e acrescentou-se o ECL Plus Prime Western Blotting Detection System Solution (Amersham, Buckinghamshire, UK) para posterior revelação e captura da imagem das bandas pelo ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, USA).

5.2.4 Análise Estatística

As análises de quantificação e tamanho das VEs, foram analisadas pelo teste paramétrico de comparação das variâncias (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste comparativo de Tukey. O nível de significância considerado em todos os testes foi $p \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas no programa JMP 7.

6 RESULTADOS

6.1 OBTENÇÃO DOS ÚTEROS E CARACTERIZAÇÃO DO TEMPO GESTACIONAL

A utilização dos úteros gravídicos de cadelas submetidas a OSH, se mostrou eficiente para a obtenção da MAC (Figura 1).

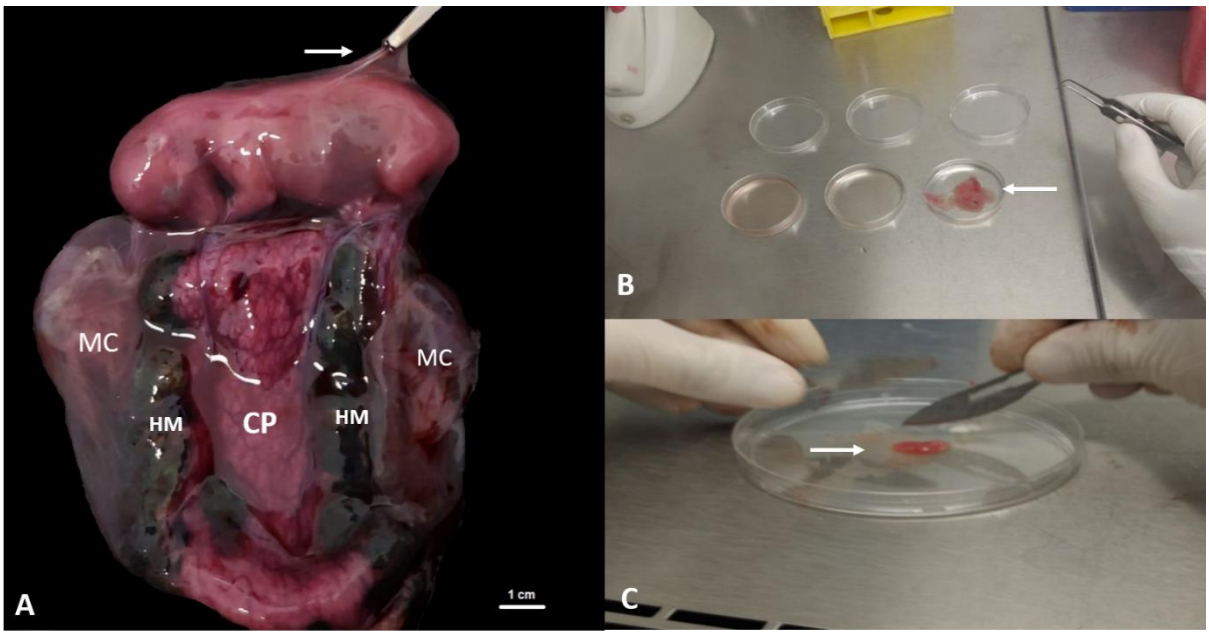
Figura 1 - Feto canino com idade aproximada de 45 dias.

Legenda: Feto apresentando desenvolvimento de membros, dígitos, vesícula optica e abdomem aumentado.
Fonte: Própria autoria.

O material foi cuidadosamente coletado e dissecado com o auxílio de um instrumental cirúrgico delicado, até que restasse apenas o feto envolvido pela MAC. A membrana amniótica foi retirada, dando preferência pela utilização da cobertura dorsal do feto, evitando o contato com células hematopoiéticas do cordão umbilical (Figura 2).

A limpeza do material com solução PBS e suplementado com penicilina/estreptomicina a 5% se mostrou eficiente, evitando assim, contaminações durante as etapas seguintes. O uso da colagenase tipo I apresentou um tempo variável de duas a três horas para digerir a MAC, sendo necessário a homogenização da amostra a cada 30 minutos para melhoria do processo.

Figura 2 – Coleta de membrana amniótica canina.

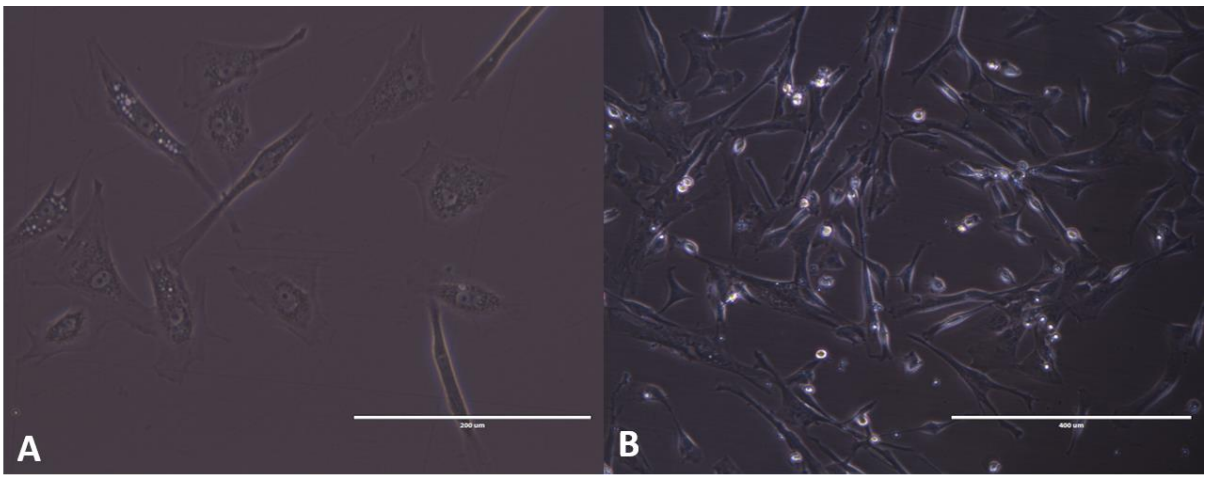


Legenda: Em A, feto canino após a retirada do corno uterino. Em B, membrana amniótica canina sendo limpa em diferentes placas contendo PBS com 5% de penicilina/estreptomicina. Em C, membrana amniótica canina sendo macerada com auxílio de lâmina de bisturi. (MC) membrana corioalantóide, (CP) cinta placentária, (HM) hematoma marginal, (seta branca) membrana amniótica.
Fonte: Própria autoria.

6.2 REPIQUE CELULAR

Após o processo de maceração e digestão enzimática as células foram cultivadas em condições controladas descritas anteriormente, e o seu crescimento verificado a cada 24 horas. Quando as células apresentavam 80% de confluência, foram tripsinizadas e cultivadas novamente em diversas passagens para sua expansão e conservação para um banco de células da MAC (Figura 3).

Figura 3. Fotomicrografia da morfologia das células derivadas da MAC



Legenda – Em A, células ainda em P0, após 48 horas de cultivo celular, as células apresentavam aderência ao plástico da garrafa de cultivo e com aspecto fibroblastóide. Em B, após sua passagem para P1 com alta intensidade e prontas para serem tripsinizadas novamente.
Fonte: Própria autoria.

6.3 CRIOPRESERVAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Após o processo de criopreservação, as células foram observadas quanto sua viabilidade. O cultivo dessas células se mostrou lento após o processo de criopreservação. As células apresentaram alta viabilidade celular pós-congelamento, próxima aos 90%.

Tabela 2 – Porcentagem de células viáveis após o processo de criopreservação

Quantidade de células plaqueadas	**% Mortas**	**% Vivas**
$4x10^4$	10,75%	89,25%

Fonte: Própria autoria.

6.4 CURVA DE CRESCIMENTO

O padrão de curva de crescimento foi possível ser estabelecido até a quinta passagem, devido ao número de células contadas ao final ser menor do que o número de células plaqueadas. Em segunda passagem (P2) foi possível notar um pico de crescimento e uma redução gradativa da proliferação até a quinta passagem (Figura 4). No *Doubling time* foi possível observar um aumento considerável no número de

dias necessários para a duplicação celular, ou seja, existe um declínio gradativo conforme o número de passagens aumentam (Figura 5).

Figura 4. Gráfico mostrando a curva de crescimento das células-tronco derivadas da membrana amniótica canina.

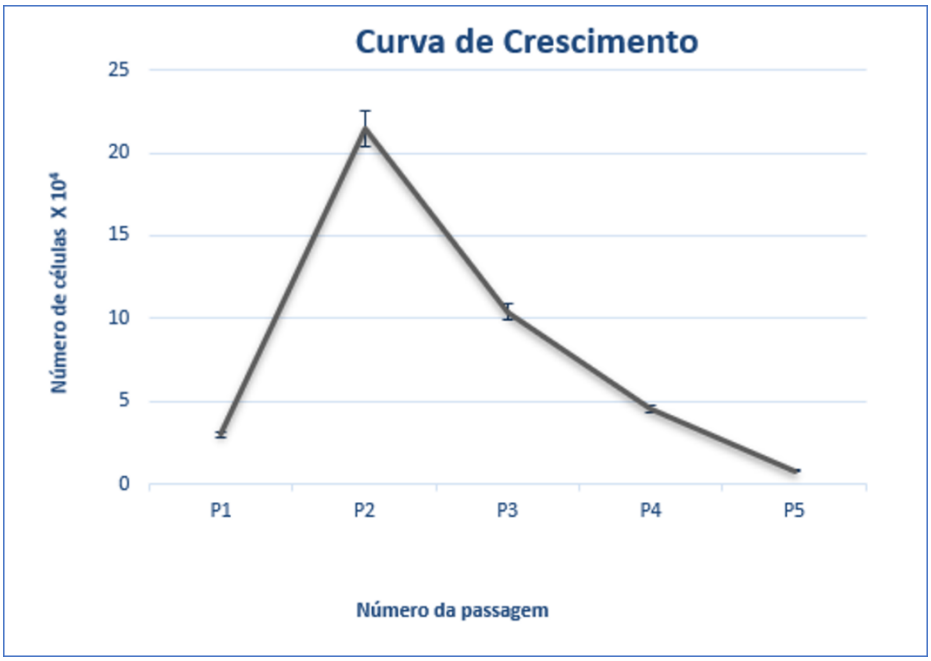
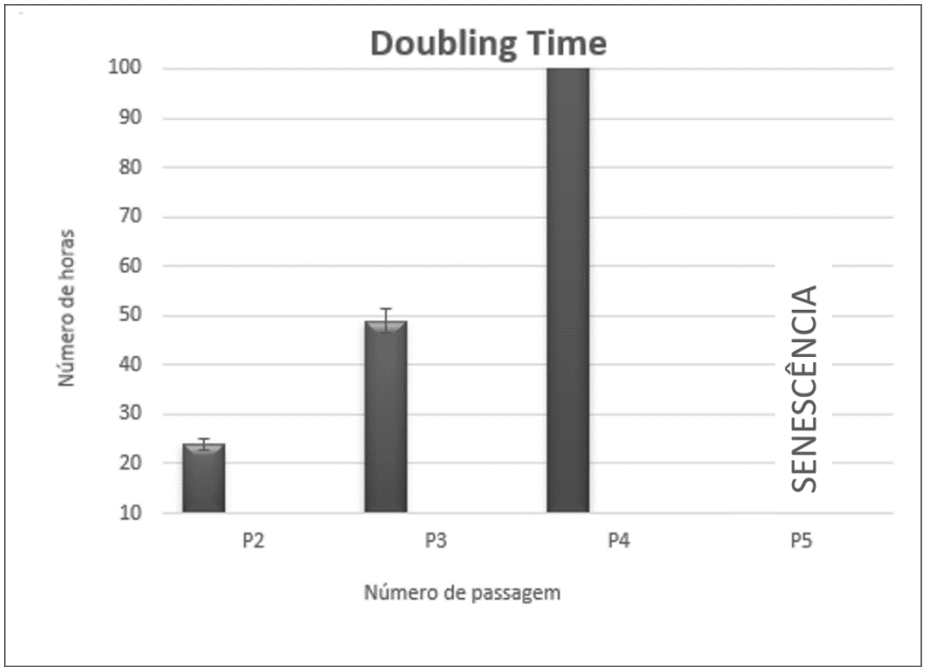


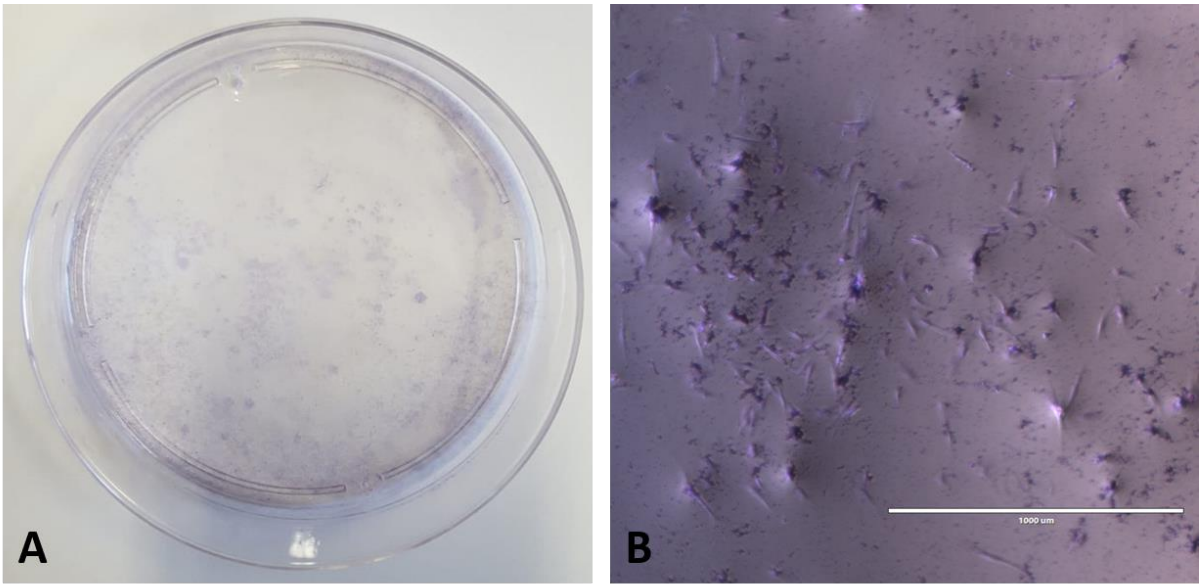
Figura 5. Gráfico mostrando o *Doubling time* das células-tronco derivadas da membrana amniótica canina. Observar que em quinta passagem (P5) as células entraram em apoptose celular.



6.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (UFC-F)

Foi realizada a UFC-F e estabelecido uma densidade de 1x104, apresentando formação de colônias após o período de 13 dias. Após a coloração, foi possível observar células aglomeradas e de coloração roxa (Figura 6).

Figura 6 – Placa com formação de colônias.



Legenda – Teste de Unidade Formadora de Colônia (UFC-F) de células da membrana amniótica canina com Giemsa. Em A, placa com UFC-F. Em B, fotomicrografia de UFC-F em aumento de 4x (Barra: 1000µm).
Fonte: Própria autoria.

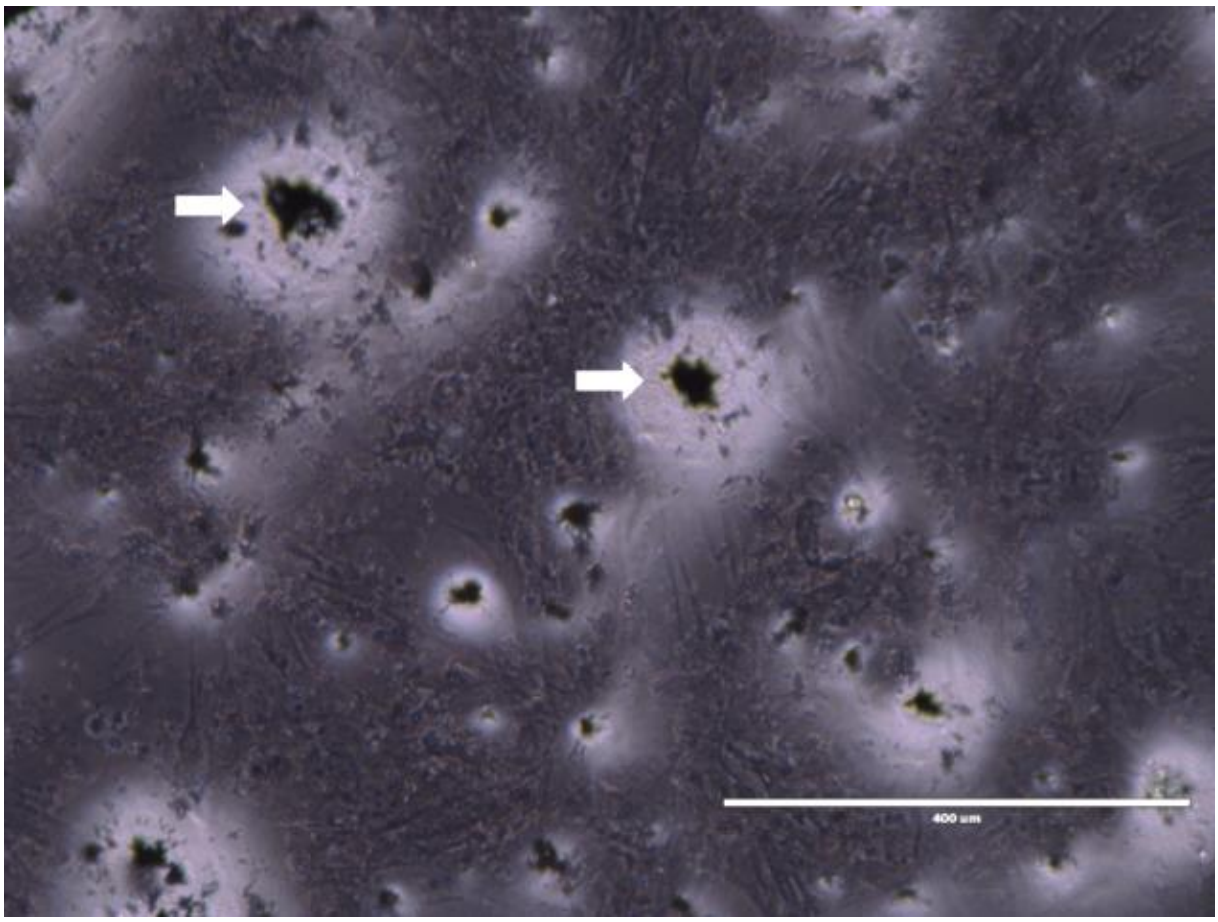
6.6 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO

As células de MAC foram submetidas e avaliadas quanto a sua capacidade de diferenciação em linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica.

6.6.1 Diferenciação Adipogênica

Após a diferenciação adipogênica foi possível notar o aparecimento de inúmeros vacúolos de gordura, e conforme o cultivo aumentava os vacúolos também se multiplicavam. Com a coloração de Sudan Black foi possível notar os vacúolos em cor preta (Figura 7).

Figura 7 – Diferenciação adipogênica.

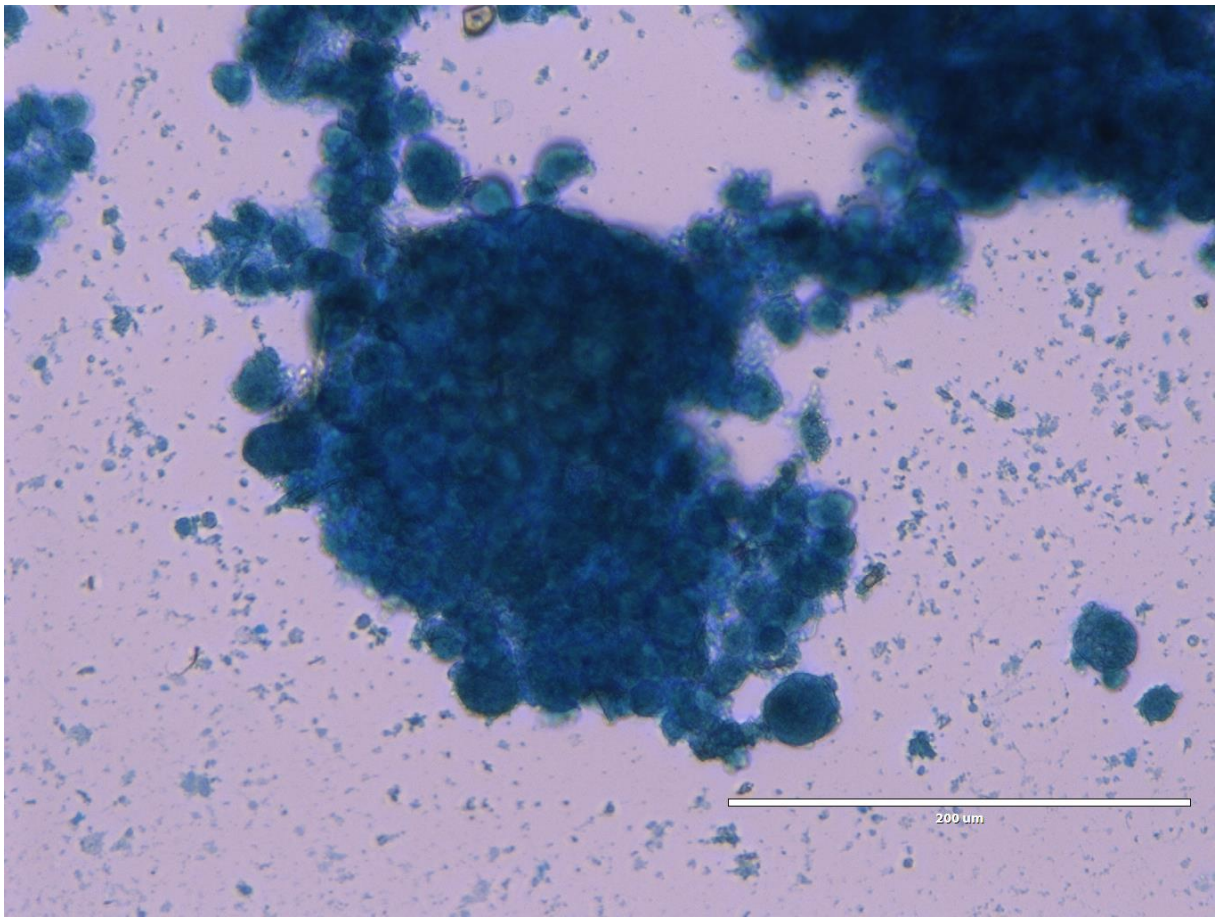


Legenda – Fotomicrografia das células de MAC pós processo de diferenciação em meio adipogênico. Observar a presença dos vacúolos (seta branca) ao redor das células. Coradas com Sudan Black. Aumento de 40X (Barra: 400µm).
Fonte: Própria autoria.

6.6.2 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

Foi possível observar na diferenciação condrogênica das células da MAC, a marcação em azul de colágeno (Figura 8).

Figura 8 – Diferenciação condrogênica.

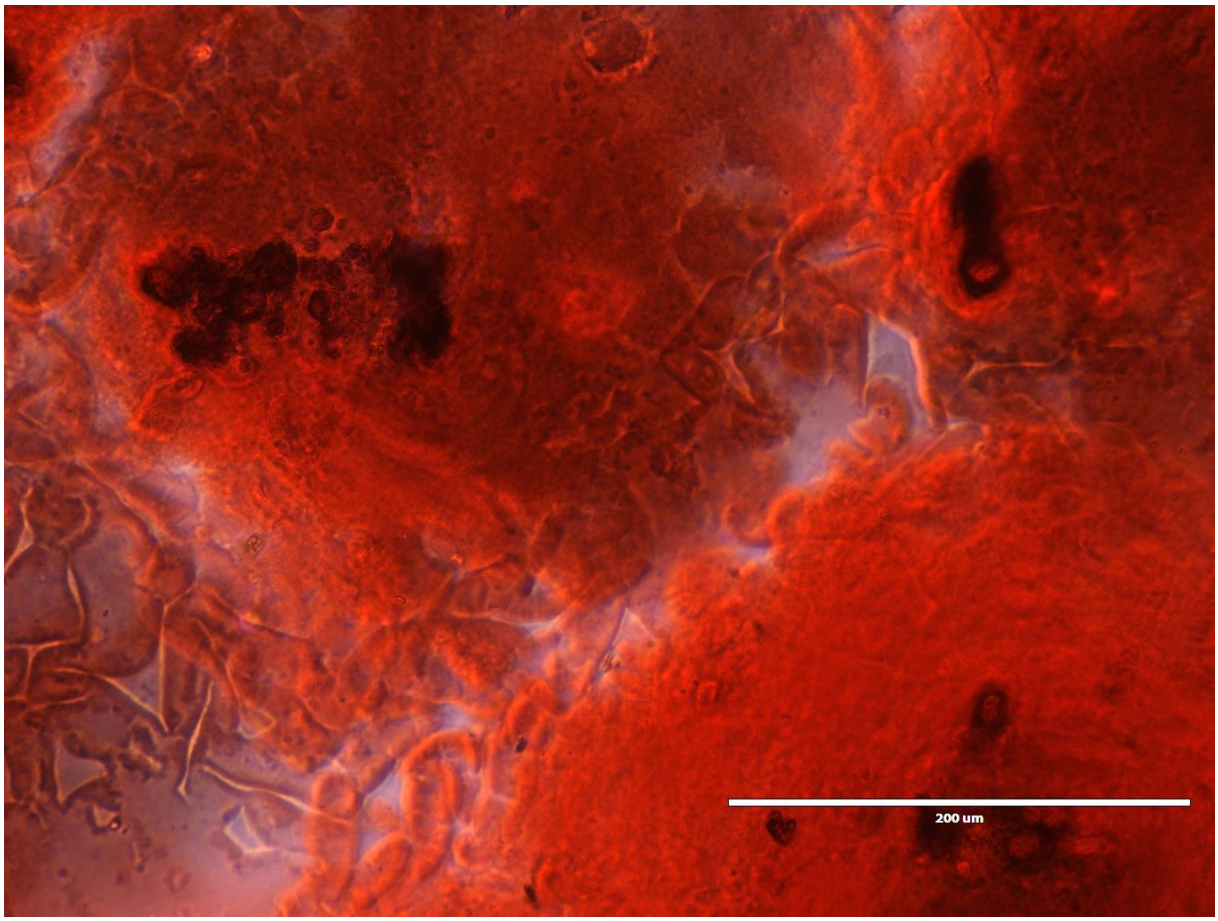


Legenda – Fotomicrografia das células de MAC pós processo de diferenciação em meio condrogênico coradas com Alcian Blue. Aumento de 20X (Barra: 200µm).
Fonte: Própria autoria.

6.6.3 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

As células da MAC foram cultivadas em meio diferenciador osteogênico. Foi possível observar a deposição de material mineral amorfo extracelular, corando toda a placa de vermelho (Figura 9)

Figura 9 – Diferenciação osteogênica.

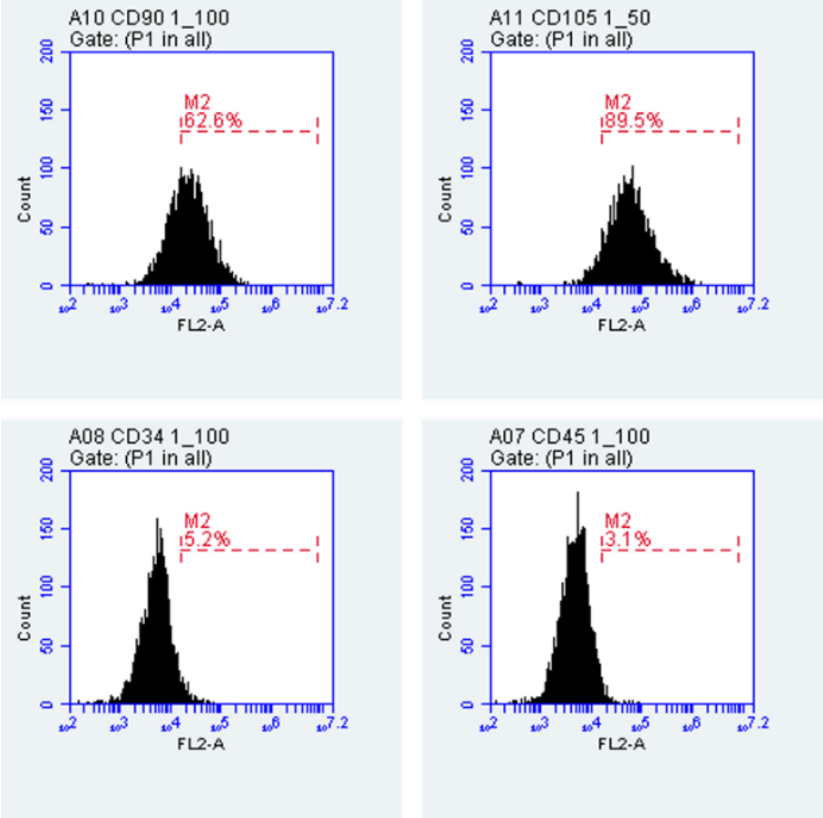


Legenda – Fotomicrografia das células de MAC pós processo de diferenciação em meio osteogênico coradas com Alizarim red. Aumento de 20X (Barra: 200µm).
Fonte: Própria autoria.

6.7 CITOMETRIA DE FLUXO

A análise da citometria de fluxo mostrou que as células mesenquimais derivadas da MAC, apresentaram marcação positiva para CD90 (62,6%) e CD105 (89,5%). A marcação negativa ficou restrita aos marcadores hematopoiéticos CD34 (5,2%) e CD45 (3,1%) (Figura 10).

Figura 10 – Análise da citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície.



Legenda – As linhagens CD90 e CD105 responderam positivamente a marcação. e os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 apresentaram marcação negativa.
Fonte: Própria autoria.

6.8 ISOLAMENTO DAS VEs

As amostras de meio de cultivo passaram por processos seguidos de centrifugação, como descrito anteriormente. As amostras permaneceram em freezer -80ºC até o seu descongelamento para o processo de ultracentrifugação, Nanosight e Western Blotting.

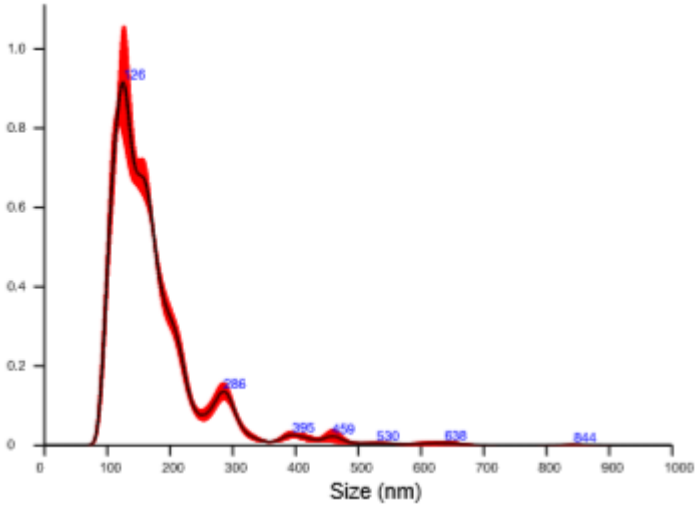
6.9 CARACTERIZAÇÃO DAS VEs POR NANOSIGHT

Foram observadas um total de nove amostras, contidas em placas de cultivo de seis poços, de células-tronco da membrana amniótica canina em passagens P0, P1 e P2.

As partículas observadas no Nanosight possuíram o tamanho esperado para serem classificadas como vesículas extracelulares pequenas (exossomos), P0 132nm, P1 130nm e P2 120nm (figura 11).

Em relação a concentração foi possível observar que a concentração de VEs foi maior na passagem P0 do que quando comparado as passagens P1 e P2.

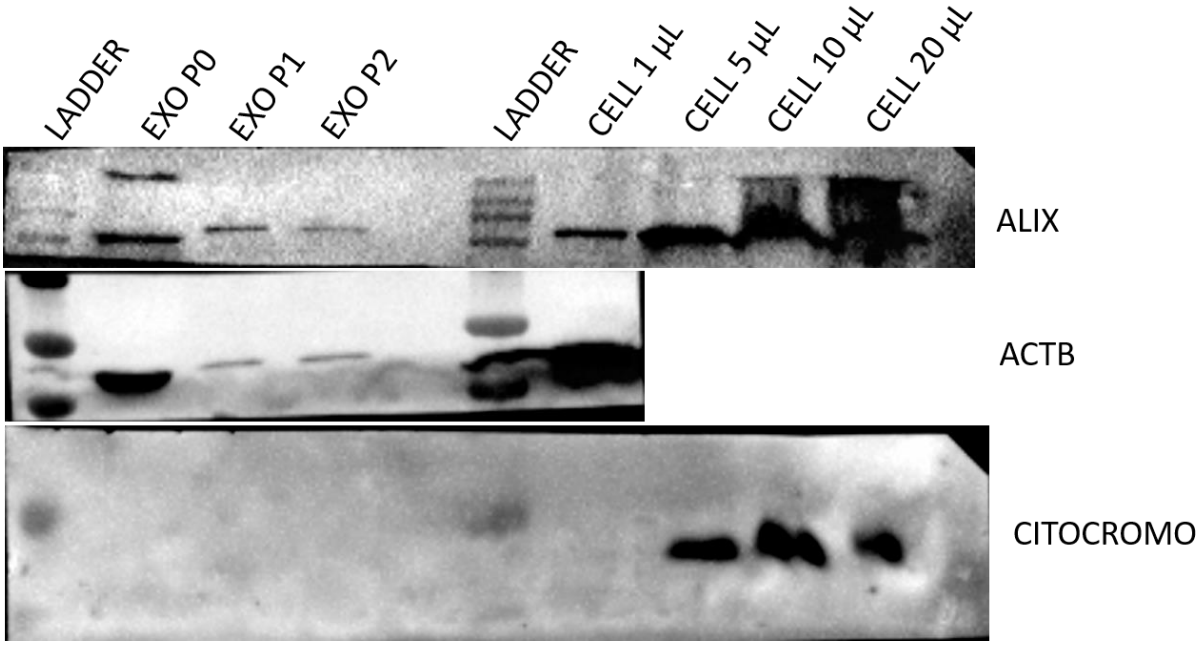
Figura 11 – Gráfico de tamanho de VEs derivados de MAC.



6.10 Western Blotting

Após a análise do Western Blotting para anticorpos específicos de exossomos, foi constatado a presença das proteínas ALIX e ACTB, comprovando que as partículas isoladas do cultivo de células-tronco da membrana amniótica canina são exossomos. As células da MAC também passaram por análise e marcaram positivo para Citocromo (Figura 12).

Figura 12 – Análise de Western Blotting.

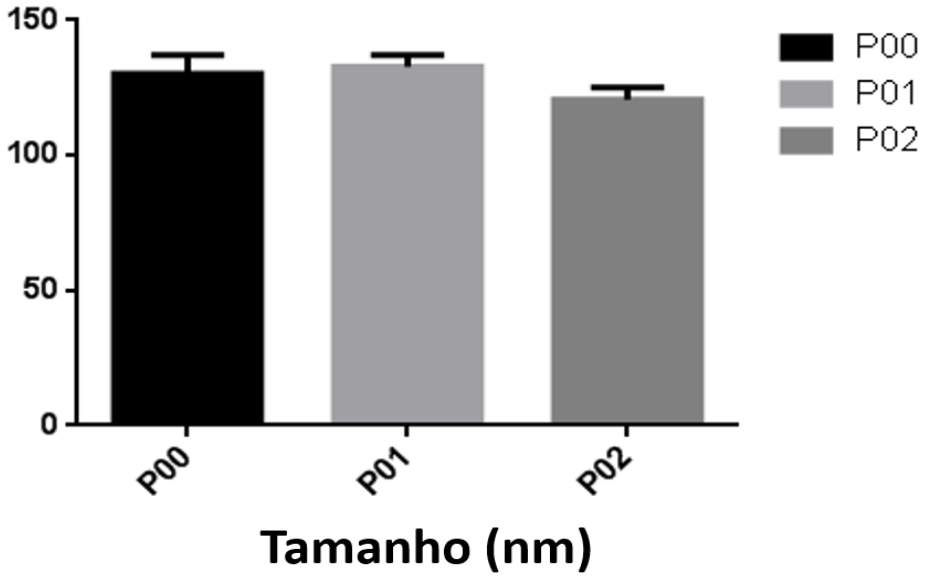


Legenda – Observar marcação positiva para Alix e ACTB em exossomos derivados de MAC. O Citocromo mostrou marcação positiva apenas para as células em diferentes concentrações.
Fonte: Própria autoria.

6.11 Análise estatística do tamanho e concentração das VEs

As partículas anteriormente isoladas possuíram o tamanho esperado para as VEs pequenas (exossomos) em todas as três fases de cultivo analisadas (P0 a P2), sendo P0=132nm, P1=130nm e P2=120nm (Figura 13).

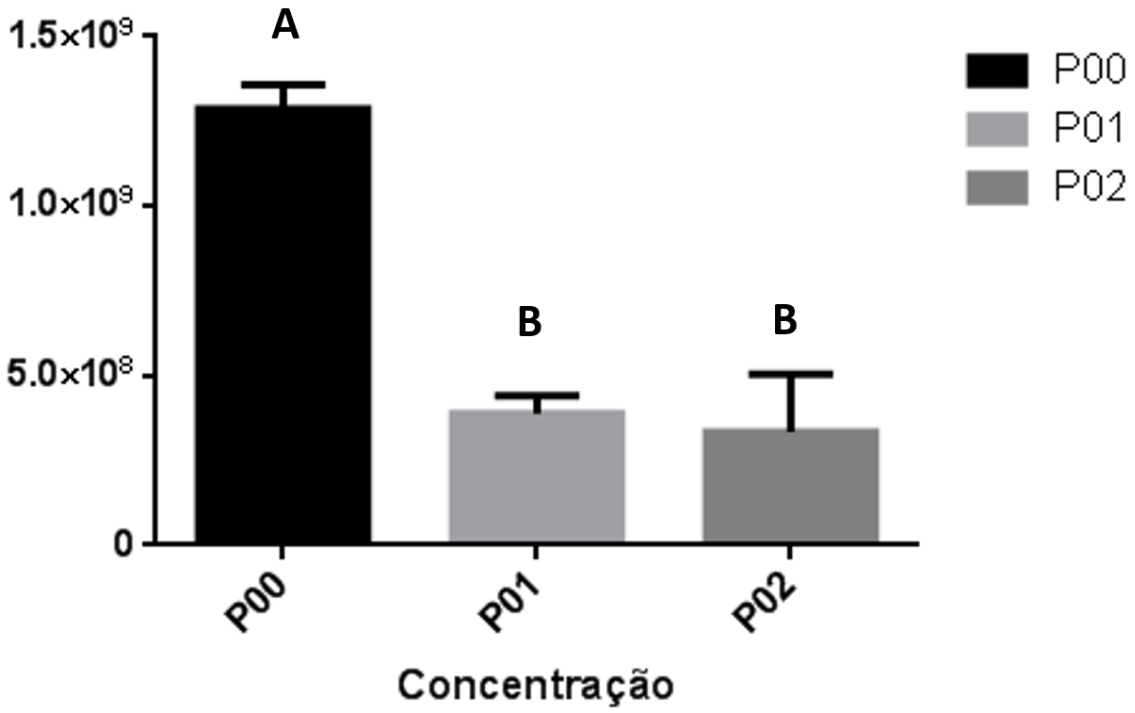
Figura 13 – Gráfico mostrando a média de tamanho encontrada em VEs derivadas de MAC em passagens P0 a P2.



Legenda – Observar que em todas as passagens medidas (P0 a P2) o tamanho das VEs derivadas de MAC apresenta o mesmo padrão.
Fonte: Própria autoria.

A concentração de VEs se mostrou diferente durante a comparação, sendo a fase P0 a qual apresentou o maior número de VEs quando comparado as outras passagens (P1 e P2) (Figura 14).

Figura 14 – Gráfico mostrando a média de concentração encontrada em VEs derivadas de MAC em passagens P0 a P2.



Legenda – Observar que as células em P0 demostraram um efeito de secreção muito maior de VEs pequenas quando comparadas as mesmas células em P1 e P2.
Fonte: Própria autoria.

7 DISCUSSÃO

A utilização de células-tronco mesenquimais de tecidos adultos para fins de pesquisa está sendo amplamente utilizado, devido ao seu auto potencial de proliferação. Com o aumento da idade e do aparecimento de doenças congênitas em cães, o estudo dessas células vem crescendo cada dia mais e consequentemente a busca por respostas sobre a sua biologia e função também, podendo inclusive ajudar na elucidação de questões relacionadas as essas mesmas células de humanos (RUSSELL et al., 2016).

A MAC, fonte de pesquisa desse projeto, é um tecido que faz parte do anexo fetal, e que é descartado como lixo biológico após o parto, portanto sua coleta não é invasiva, o que torna a coleta deste tecido uma fonte de CTM eticamente aceita.

Neste trabalho, foi estabelecido o cultivo e caracterização da MAC em terço final de gestação (45-63 dias), utilizando uma metodologia para caracterização fetal baseada em Evans; Sack, (1973) e Pieri et al., (2015) por meio da técnica de Crow-Rump (CR) e análise macroscópica dos embriões. A metodologia de cultivo e caracterização foi baseada no trabalho de Lange-Consiglio et al., (2012) o qual cultivaram membrana amniótica equina, Vidane et al., (2014) no cultivo de membrana amniótica felina e no trabalho de Park et al., (2012) com membrana amniótica canina.

A coleta da MAC foi realizada em condições estéreis, incisionando com o auxílio de uma lâmina de bisturi os cornos uterinos até a exposição dos fetos. A MAC foi separada mecanicamente do cório e passada por seguidas lavagens em solução de penicilina/estreptomicina a 5%. Em seguida foi macerada com o auxílio de lâminas de bisturi até apresentar-se de forma homogênea e pastosa. Deu-se início a digestão química para conclusão da primeira etapa. Após a digestão química as células foram plaqueadas juntamente com meio de cultura basal onde permaneceram até os processos de replicação.

Os protocolos adaptados de Park et al., (2012); Vidane et al., (2014) e Cardoso et al., (2016) utilizados para extração das células utilizadas nesse trabalho se mostrou eficiente. Todavia, a obtenção do tecido nem sempre é uniforme e constante, devido a dependência da disponibilidade de cadelas prenhes.

As células da MAC apresentaram-se proliferativas e de rápido crescimento, em formato fibroblastóide, corroborando os resultados de Lange-Consiglio et al.

(2012) e em equinos, Park et al. (2012) e Saulnier et al. (2016) em MAC e Vidane et al. (2014) em membrana amniótica felina, que mostraram que os cultivos da membrana amniótica apresentavam células em formato fibroblastóide e de rápido crescimento quando em cultivo primário.

A morfologia fibroblastóide e a aderência ao plástico, observada durante todo o cultivo das células da MAC, constitui uma característica das CTM, assim como descrito anteriormente por Dominici et al. (2006); Filioli Urânio et al. (2011); Park et al. (2012); Saulnier et al. (2016); Cardoso et al. (2016) e Borghesi et al. (2017).

Para a formação de um banco de CTM da MAC ser possível as células foram testadas após o processo de criopreservação para comprovar a viabilidade celular. Devido a grande porcentagem de células vivas (aproximadamente 90%), a formação do banco de células criopreservadas tornou-se possível para utilização em futuras pesquisas. Essa mesma capacidade de viabilidade celular foi descrita anteriormente por Lange-Consiglio et al. (2012) e Park et al. (2012) em células da MAC e Borghesi et al. (2017) em células da membrana amniótica de coelhos.

A curva de crescimento foi analisada e observada um rápido crescimento celular durante as primeiras passagens (P0 a P2), tendo seu pico de crescimento em P2 e posterior declínio nas próximas passagens. Esses resultados corroboram os achados de Vidane et al. (2014) na utilização das mesmas células de gatos e de Filioli Urânio et al. (2011) em cães. Porém nossos resultados foram diferentes quando comparados ao de Park et al. (2012) em seu trabalho com as mesmas células caninas, que relatou um crescimento constante até a vigésima passagem. No Double time, as células de MAC mostraram-se em crescente aumento do número de dias para duplicação celular, chegando a senescência em quinta passagem, quando não se mostrou mais viável, ou seja, a medida em que o número de passagens de cultivo aumentam, as células perdem sua capacidade de proliferação, compartilhando dos mesmos resultados de Filioli Urânio et al. (2011) em cães e Vidane et al. (2014) em gatos.

A avaliação da capacidade de formação de colônias (UFC-F) foi realizado, mostrando uma grande quantidade de UFC-F e com número variados de células, o que favorece sua aplicação em terapias clínicas (NARDI; MEIRELLES, 2006).

As células da MAC foram testadas quanto a sua capacidade de diferenciação celular em linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica, que também é um dos testes utilizados para classifica-las em CTM (DOMINICI et al., 2006; FILIOLI URÂNIO

et al., 2011; WENCESLAU et al., 2011; PARK et al., 2012; SAULNIER et al., 2016; CARDOSO et al., 2016; BORGHESI et al., 2017).

Na análise de citometria de fluxo, as células demonstraram marcação positiva para marcadores mesenquimais (CD90 e CD105) e não expressaram os marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34), confirmando assim um dos fatores impostos por Dlominici et al. (2006) para caracterizar uma célula-tronco como mesenquimal. Nossos resultados corroboram os de outros trabalhos com MAC (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012; PARK et al., 2012; CARDOSO et al., 2016), em coelhos (BORGHESI et al., 2017) e em membrana amniótica humana Yamahara et al. (2014), porém com membrana amniótica felina Vidane et al. (2014) relatou baixa expressão para marcadores CD105.

Nesse estudo além da caracterização de células-tronco da membrana amniótica canina, também foram avaliados os tamanhos e concentrações das vesículas extracelulares secretadas dessas células.

O protocolo de isolamento se mostrou eficiente, tendo no final as VEs analisadas pelo Nanosight com o tamanho esperado (até 150nm). Foi obtido o mesmo sucesso com esse protocolo no trabalho de Connolly et al., (2015) ao extrair VEs de adipócitos humanos e com Zhao et al., (2017) que em seu trabalho extraiu VEs de membrana amniótica humana.

Na caracterização por Nanosight foi possível notar que as VEs em diferentes passagens analisadas (P0 a P2), não obtiveram diferenças significativas em relação aos seus tamanhos quando comparadas entre si (P0=132nm, P1=130nm e P2=120nm). O mesmo resultado também foi possível ser identificado no trabalho de Connolly et al., (2015), com VEs derivadas de adipócitos humanos, que comparou a secreção de VEs pelas células no dia zero e no dia quinze de cultivo.

O tamanho encontrado pelas vesículas extracelulares nas diferentes fases de cultivo, sugere que elas sejam exossomos, pois possuem o tamanho esperado de até 250nm (ZHANG et al., 2015; THÉRY et al., 2018)

Ao analisar a concentração, também por Nanosight foi possível observar que as VEs se apresentaram em maior concentração na passagem P0 do que quando comparadas a P1 e P2. O mesmo resultado foi possível ser observado por Connolly et al., (2015) que analisou a concentração de VEs derivadas de adipócitos humanos as quais demonstraram que a produção de VEs por célula, foi maior no dia zero de cultivo quando comparado ao dia quinze.

O fato da produção de VEs ser maior em fases iniciais pode ser devido ao papel das VEs como comunicadoras intercelulares e que com a chegada do processo de senescência, ou seja, quando sua capacidade de se multiplicar chega ao fim, a capacidade de produção das VEs também diminui. Pode-se sugerir que o processo de passagem celular, afeta significativamente a capacidade de comunicação intercelular, o que pode ser a resposta para queda brusca na curva de crescimento após a segunda passagem (P2).

8 CONCLUSÕES

As coletas e isolamento de células-tronco derivadas da membrana amniótica canina foram realizadas. Além das células utilizadas para a realização desse experimento, foi criado um banco de células criopreservadas em primeira, segunda e terceira passagem. As células poderão ser utilizadas para tratamentos clínicos e futuros experimentos.

A caracterização celular foi realizada e obtido resultados característicos de células-tronco mesenquimais, como o formato fibroblastóide, a aderência ao plástico, alta viabilidade celular em passagens iniciais, a presença e formação de UFC-F, diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, marcação positiva para marcadores mesenquimais (CD90 e CD105) e baixa expressão para marcadores hematopoiéticos (CD45 e CD34).

O protocolo de isolamento de VEs pequenas obteve sucesso ao isolar apenas as vesículas extracelulares pequenas (exossomos). A grande quantidade de partículas pequenas no nanosight sugere uma alta secreção de exossomos por parte das células-tronco derivadas da membrana amniótica canina durante o cultivo.

A quantidade maior de exossomos presentes na passagem zero, quando comparada as passagens um e dois, sugere que a comunicação celular nesta fase é maior.

A caracterização por western blotting em conjunto com a análise de tamanho pelo nanosight nos confirma que as partículas são exossomos.

Devido a ausência de estudos relacionando as VEs pequenas de células-tronco da membrana amniótica canina, fomos o primeiro grupo a concluir que a grande concentração delas pode ser um fator chave para a resposta positiva a terapias clínicas utilizando células-tronco.

REFERÊNCIAS

ANDONOVSKA, D. et al. The advantages of the application of amnion membrane in the treatment of burns. **Prilozi**, v. 29, p. 183–198, 2008.

AKERS, J. C. et al. miRNA contents of cerebrospinal fluid extracellular vesicles in glioblastoma patients HHS. Public Access. **J Neuro Oncol**, v. 123, n. 2, p. 205–216, 2015.

ARSLAN, F. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 10, n. 3, p. 301–312, maio 2013.

AVILA, M. et al. Reconstruction of ocular surface with heterologous limbal epithelium and amniotic membrane in a rabbit model. **Cornea,** v. 20, n. 4, p. 414–420, 2001.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p. 1384–1392, 1 jun. 2007.

BARLOW, S. et al. Comparison of Human Placenta- and Bone Marrow–Derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 6, p. 1095–1108, 8 dez. 2008.

BÁTIZ, L. F. et al. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. **Front Cell Neurosci**, v. 9, 2016.

BIAN, S. et al. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. **J Mol Med**, v. 92, p. 387–397, 2014.

BITTENCOURT, M. K. W. et al. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Dogs With Keratoconjunctivitis Sicca. **Cell Medicine**, v. 8, p. 63-77, 2016.

BOBRIE, A. et al. Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses. **Traffic**, v. 12, p. 1659–1668, 2011.

BONAFEDE, R. et al. Exosome derived from murine adipose-derived stromal cells: Neuroprotective effect on in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. **Experimental Cell Research**, v. 340, n. 1, p. 150–158, 2016.

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.

BOSSOLASCO, P. et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Research**, v. 16, n. 4, p. 329–336, abr. 2006.

BRUNO, S. et al. Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

CARDOSO, M. et al. Characterization of teratogenic potential and gene expression in canine and feline amniotic membrane-derived stem cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 58–64, abr. 2016.

CHOI, D.-S. et al. Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. **Journal of Extracelullar Vesicles**, v. 1, 2012.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in Cell Biology**, v. 19, n. 2, p. 43–51, 2009.

CONNOLLY, K. D. et al. Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicles released pre-and post-adipogenesis. **Journal of Extracelullar Vesicles**, v. 4, 2015.

DANG, D. T. et al. Glutathione S-transferase π1 promotes tumorigenicity in HCT116 human colon cancer cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, p. 9485–9494, 2005.

DOMINICI M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8:315–317, 2006.

ERCOLIN, A. C. M. et al. Rabbit olfactory stem cells. Isolation protocol and characterization. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 1, 2016.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 2, n. 1, p. 11–45, mar. 1973.

FAVARON P. O. et al. The Amniotic Membrane: Development and Potential Applications – A Review. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 50, n. 6, p. 881-892, 2015.

FILIOLI URANIO, M. et al. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 5, p. 361–373, 1 maio 2011.

FREEDMAN, J. E. et al. Diverse human extracellular RNAs are widely detected in human plasma. **Nature Communications**, v. 7, p. 11106, 26 abr. 2016.

GALLO, A. et al. The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

GOMES, J. A. P. et al. Amniotic membrane use in ophthalmology. **Current Opinion in Ophthalmology**, v. 16, n. 4, p. 233–240, 2005.

GONG, M. et al. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. **Oncotarge**t, v. 8, n. 28, p. 45200–45212, 2017.

HAN, X.; GROSS, R. W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 6, p. 1071–1079, 2003.

HEIJNEN, H. F. G. et al. Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and □-Granules. **Blood**, v. 94, n. 11, p. 3791–3799, 1999.

HUANG, C.-C. et al. Exosomes as Biomimetic Tools for Stem Cell Differentiation: Applications in Dental Pulp Tissue Regeneration HHS Public Access. **Biomaterials**, v. 111, p. 103–115, 2016.

HUNG, M. E.; LEONARD, J. N. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery. **Journal of Extracelullar Vesicles**, v. 5, 2016.

KALRA, H.; DRUMMEN, G.; MATHIVANAN, S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 170, 6 fev. 2016.

KASTRINAKI, M.-C. et al. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using Different Membrane Markers: Comparison of Colony Cloning Efficiency, Differentiation Potential, and Molecular Profile. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 4, p. 333–339, 2008.

KIM, H. K. et al. Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor. **European Journal of Cancer**, v. 39, p. 184–191, 2003.

KITA, K. et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From the Sub-Amniotic Human Umbilical Cord Lining Membrane. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 4, p. 491–502, abr. 2010.

KOGA, Y. et al. Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. **Journal of Gastrointestinal Oncology J Gastrointest Oncol**, v. 2, n. 4, p. 215–222, 2011.

LAI, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 4, n. 3, p. 214–222, 1 maio 2010.

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.

LEE, O. K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood Jounal**, v. 103, n. 5, p. 1669–1675, 2004.

LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracelullar Vesicles,** v. 3, 2014.

LU, P. et al. Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 117–124, 2007.

LV, L.-L. et al. Isolation and Quantification of MicroRNAs from Urinary Exosomes/Microvesicles for Biomarker Discovery. **Int. J. Biol. Sci**, v. 9, 2013.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. **Nature**, v. 449, p. 682–688, 2008.

MALAK, T. M.; BELL, S. C. Differential expression of the integrin subunits in human fetal membranes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, p. 269–276, 1994.

MANÇANARES, C. A. F. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the yolk sacs of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 887–898, 1 out. 2015.

MATIKAINEN, T.; LAINE, J. Placenta—an alternative source of stem cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 544–549, 2005.

MICHAEL, A. et al. Exosomes from Human Saliva as a Source of microRNA Biomarkers. **Oral Dis**, v. 16, n. 1, p. 34–38, 2010.

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

MIHU, C. M. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, n. 1, p. 73-77, 2009

MORELLO, M. et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. **Cell Cycle**, v. 1222, p. 3526–3536, 2013.

MULCAHY, L. A. et al. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of Extracelullar Vesicles**, v. 3, 2014.

MUNICH, S. et al. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. **OncoImmunology**, v. 1, n. 7, p. 1074–1083, 2012.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: Isolation, in vitro expansion and characterization. **HEP**, v. 174, p. 249-282, 2006.

PARK, S.-B. et al. Isolation and Characterization of Canine Amniotic Membrane-Derived Multipotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

PAROLINI, O. et al. Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300–311, fev. 2008.

PERIN, L. et al. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. **Cell Proliferation**, v. 40, n. 6, p. 936–948, 1 dez. 2007.

PERKINS, G. L. et al. Serum Tumor Markers. **American Family Physician**, v. 68, n. 6, 2003.

PIERI, N. et al. Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 625–631, ago. 2015.

PNG, K. J. et al. A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. **Nature,** v. 481, 2012.

RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Distinct Stem Cells Subpopulations Isolated from Human Adipose Tissue Exhibit Different Chondrogenic and Osteogenic Differentiation Potential. **Stem Cell Rev and Rep**, v. 7, p. 64–76, 2011.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. The Rockefeller University Press J. **Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 2013.

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.

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

SHEDDEN, K. et al. Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells : Association with Gene Expression and Chemosensitivity Profiles Advances in Brief Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells : Association with. **Cancer Research**, v. 63, p. 4331–4337, 2003.

SINGH, A. B.; HARRIS, R. C. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. **Cellular Signalling**, v. 17, p. 1183–1193, 2005.

STEIGMAN, S. A.; FAUZA, D. O. **Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Amniotic Fluid and Placenta**. In: Current Protocols in Stem Cell Biology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. v. 1p. 1E.2.1-1E.2.12.

TAN, C. Y. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 76, 2014.

THÉRY, C. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. **Biology Reports**, v. 33410, p. 15–3, 2011.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8, n. 1, 2018.

THIND, A.; WILSON, C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. **Journal of Extracelullar Vesicles**, v. 5, 2016.

TIAN, T. et al. Dynamics of exosome internalization and trafficking. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 7, p. 1487–1495, jul. 2013.

VADER, P. et al. Extracellular vesicles for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 106, p. 148–156, 2016.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.

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

VILLARON, E. M. et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 89, n. 12, p. 1421–7, 1 dez. 2004.

WANG, J.-F. et al. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. **Haematologica**, v. 89, n. 7, p. 837–44, 1 jul. 2004.

WARD, D. J.; BENNETT, J. P. The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 37, n. 2, p. 191–193, 1984.

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.

XIN, H. et al. Exosome-Mediated Transfer of miR-133b from Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Neural Cells Contributes to Neurite Outgrowth. **Stem Cells**, v. 30, n. 7, p. 1556–1564, 2012.

YERI, A. et al. Total Extracellular Small RNA Profiles from Plasma, Saliva and Urine of Healthy Subjects. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44061, 17 dez. 2017.

YOU, Q. et al. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. **International Journal of Gynecology & Obstetrics,** v. 103, n. 2, p. 149–152, 1 nov. 2008.

ZHANG, B. et al. Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 174, 2016.

ZHANG, J. et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. 13, p. 17–24, 2015.

ZHAO, B. et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation. **Journal of Molecular Histology**, v. 48, p. 121–132, 2017a.

ZHOU, Q. et al. Sample collection Enrichment of exosomal RNA in breast milk. **Int. J. Biol. Sci**, v. 8, n. 1, p. 118–123, 2012.

ZUK, P. A. et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279–4295, 2002.