SÍLVIA AMÉLIA FERREIRA LIMA

Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais

São Paulo

2012

SÍLVIA AMÉLIA FERREIRA LIMA

Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais

São Paulo

2012

SÍLVIA AMÉLIA FERREIRA LIMA

Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

De acordo:_____
Orientador

São Paulo
2012

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

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.2725
FMVZ

Lima, Sílvia Amélia Ferreira
Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais / Sílvia Amélia Ferreira Lima. -- 2012.
70 f. : il.

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

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

1. Cães. 2. Células-tronco. 3. Saco vitelino. 4. Períodos gestacionais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais", protocolado sob o nº 2811/2012, utilizando 2 (dois) cães, sob a responsabilidade do(a) Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Culture ana characterization of stem cells from the yolk saco f dog in diferente gestational stages", protocol number 2811/2012, utilizing 2 (two) dogs, under the responsibility Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LIMA, Sílvia Amélia Ferreira

Título: Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus amados pais Manoel Santana e Maria Amélia, aos meu irmãos Israel e Manuela e à minha cunhada Milena. Sem Deus e sem a minha família, eu não teria condições de ter finalizado o meu mestrado. Todos, de alguma forma, no meu sustento e/ou emocional, contribuíram para que eu conseguisse passar por essa etapa de minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo o que me foi concebido até hoje, pela família maravilhosa e por todas as oportunidades oferecidas para mim durante meu percurso. Agradeço, também, pelos momentos difíceis e pelos problemas que pude enfrentar, pois são nas adversidades que amadurecemos, crescemos e evoluímos.

À minha família, que apesar da distância, sempre esteve do meu lado, apoiando-me, torcendo por mim, sempre com muito amor. Agradeço imensamente aos meus queridos pais, irmãos e cunhada pelos conselhos profissionais, pelo apoio nas minhas decisões, pelo carinho nos momentos de ansiedade

À minha orientadora, Drª. Patrícia Braga, pela oportunidade e pela confiança.

À minha co-orientadora, Drª.Graciela Pignatari, pelas orientações durante todo o experimento.

À Profª. Drª.Maria Angélica Miglino, que me ofereceu a oportunidade para a realização do estágio curricular de graduação e para a realização deste mestrado.

Às Doutorandas Fabi e Isa, por toda a gentileza na condução dos seus ensinamentos e por me ajudarem, sem mensuração de esforços. Agradeço, também, pelo repasse dos seus conhecimentos sobre reprogramação celular e cultura placentária, bem como tantos outros ensinamentos valiosos.

Ao Doutorando Marcão, por me ensinar muito do que sabe sobre histologia, acompanhando de perto, com paciência. Agradeço imensamente pelos seus conselhos nos momentos difíceis em minha vida pessoal, e por ter sido compreensivo nos meus momentos de ansiedade. Tenho certeza de que ganhei um amigo que levarei para toda a vida.

À Mestranda Carol, por me ensinar sobre cultura de saco vitelino e membrana amniótica; por me ajudar nos experimentos, estando sempre do meu

lado, e, principalmente, agradeço pela amizade forte e sincera. Agradeço, também, pelos numerosos conselhos e momentos de alegria. Meu carinho e ternura serão eternos.

Ao Mestrando João, pela ajuda com as fotos de diferenciação celular e por cuidar dos camundongos Nudes.

Ao Mestrando Leandro, pela ajuda na histologia, pela sua alegria contagiante e suas paródias musicais divertidas.

Às alunas de Iniciação Científica, em especial a Jeniffer e Thais, por me ajudarem intensamente na histologia e obtenção dos animais durante as campanhas de castração. Bem como às alunas Gabriele, Larissa e Ivy, pela ajuda na organização do laboratório.

À minha querida amiga Graziela Menck, do laboratório LTIAM, pelo carinho e convívio familiar. Sou muito grata pela amizade forte e sincera que se iniciou durante o estágio curricular, e que, mesmo depois, entrando no mestrado em laboratórios diferentes, sempre torceu por mim e me acompanhou de perto na vida pessoal e profissional. Propiciou a mim momentos de alegria e de carinho. Tornou-se uma grande amiga!

À Elaine Fernandes, que me apoiou muito no começo do mestrado e mesmo após a sua saída do departamento, a amizade e apoio continuaram fortes.

Ao casal de amigos do departamento, Renata Nogueira e Luiz Nogueira, pela amizade e carinho, juntamente com a doce filha Larissa que sempre me encanta com seu sorriso e doçura.

Aos meus queridos amigos e colegas de departamento, Aline Ambrogi, Amanda Martins, Bruno Bertassoli, Carlos Sarmento, Daniela Moraes, Diego Leão, Dilayla Abreu, Franceliusa Delys, Márcio Rodrigues, Maria Angélica Machado, Paulo Ramos, Thais Lessa e Valdir Pavanello, pelo carinho, amizade e pelas festas.

A todos os demais amigos e colegas do programa de pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Universidade de São Paulo, por todos os momentos que passamos juntos, seja nos momentos livres no departamento, seja nos almoços, nas festas, nas conversas pelos corredores. É impossível falar o que sinto por cada um, mas agradeço por não terem apenas passado pela minha vida, já que permanecerão eternamente no meu coração.

Aos funcionários Rose Eli, Ronaldo Agostinho, Maicon Silva, Jaqueline Santana, Rosemari dos Santos, Ednaldo (Índio), Diogo Palermo, Bernadete Silva, Ana Paula da Silva e Lucinéia Bárbara, pela solicitude sempre que necessário.

Ao IPEN pelo fornecimento dos camundongos Nudes, e em especial à funcionária Neide, que sempre foi muito atenciosa comigo.

Aos meus amigos do colégio e da graduação, especialmente a Annelise (Anne), Carolina Scalise, Cristiane (Dsk), Cristina (Graveto), Edson (Ud), Gisela Alves, Helena (Rét), Marisol Watanuki, Rafael (Nino), Tarini (Tata), Vivian (Sussu), por estarem até hoje presentes em minha vida, torcendo por mim.

Aos meus queridos vizinhos da “Vila Chaves” Aline, Eduardo, Eliciane, Lucas, Mariana, Rodolfo, Victor e Vivian, pelos grandes momentos juntos, pelas conversas e pelos encontros com rodadas de chimarrão.

À Bruna Pacheco pela permanente gentileza, amizade e momentos divertidos em festas.

Aos animais, sem os quais esse experimento não poderia se tornar realidade. Nossas pesquisas tiveram como objetivo buscar conforto para animais e seres humanos.

A CAPES, que proporcionou a bolsa de estudo.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar sería menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

LIMA, S. A. F. **Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais.** [Culture and characterization of stem cells from dogs´ yolk sac in pregnancy stages]. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O saco vitelino é o único anexo embrionário presente em todas as espécies animais cuja função é manter o desenvolvimento primário do feto até que a placenta assuma esta função. Além disso, ele desempenha funções importantes como: nutrição do embrião, síntese proteica, atividade fagocitária, transferência de materiais e hematopoiese. A utilização de células-tronco embrionárias gera muitas discussões devido às questões éticas associadas à obtenção destas células, além de questões religiosas e também as relações de baixa plasticidade das células-tronco adultas motivam os pesquisadores ao crescente interesse em outras fontes de células-tronco. Com isso, células provenientes de tecidos como as dos anexos embrionários chamam cada vez mais atenção devido à sua facilidade de acesso, crescimento rápido e boa plasticidade. Nosso grupo tem demonstrado que as células do saco vitelino têm boa capacidade de proliferação e são multipotentes. Vários pesquisadores vêm demonstrando que o período no qual as células são obtidas pode ser de fundamental importância para a diferenciação. Sendo assim, neste projeto tivemos como objetivo estabelecer e caracterizar células-tronco de saco vitelino de cães em dois estágios gestacionais, visando analisar de forma comparativa o perfil de expressão de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos e pluripotência de forma a entender o comportamento das mesmas. Neste trabalho observamos que as células de saco vitelino obtidas de gestações com 40 e 50 dias aderiram ao plástico, tiveram morfologia fibroblastóide, boa proliferação celular, se diferenciaram em adipócitos, condrócitos e ostéocitos e expressaram alguns marcadores mesenquimais, sugerindo assim ser uma célula-tronco mesenquimal. Além disso, não levaram à formação tumoral quando injetadas em camundongos imunossuprimidos, nudes.

Palavras-chave: Cães. Células-tronco. Saco vitelino. Períodos gestacionais.

ABSTRACT

LIMA, S. A. F. **Culture and characterization of stem cells from the yolk sac of dogs at different stages of pregnancy**. [Cultura e caracterização das células-tronco provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais]. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The yolk sac is an embryonic attachment present in all animal species, which function is to keep the primary development of the fetus until the placenta assumes this function. Moreover, it plays important roles as: nutrition of the embryo, protein synthesis, phagocytic activity, transfer of materials and hematopoiesis. The use of embryonic stem cells generates many discussions because of the ethical and religious issues associated with the obtaintion of these cells. Also the relationship of low plasticity of adult stem cells motivates researchers to explore other sources of stem cells. Thus, cells from tissues such as the embryonic anexes call more attention, due to its ease of access, rapid growth and good plasticity. Our group has shown that cells of the yolk sac has good ability to proliferate and are multipotent. Several researchers have shown that the period in which the cells are obtained can be critical for differentiation. Therefore, in this project we aimed to establish and characterize stem cells from dog yolk sac in two stages of pregnancy, in order to analyze comparatively the expression profile of mesenchymal, hematopoietic and plurypotency markers, and study their behavior and plasticity potencial in vitro. In this study we observed that yolk sac cells obtained from pregnancies at 40 and 50 days adhered to plastic, had fibroblast like-morphology, good cell proliferation and differentiated into adipocytes and osteocytes and expressed some mesenchymal markers, therefore suggesting to be a mesenchymal stem cell. Also, they did not lead to tumor formation when injected into immunosuppressed mice, nude.

Keywords: Dogs. Stem cells. Yolk sac. Gestational periods.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 OBJETIVOS 16
2.1 OBJETIVO GERAL 16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16
3 REVISÃO DE LITERATURA 17
3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CÃO 17
3.2 O SACO VITELINO 19
3.3 CÉLULAS-TRONCO 20
3.4 CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO 22
4 MATERIAIS E MÉTODOS 24
4.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO DE CÃES COM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS 24
4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS PROVENIENTES DO SACO VITELINO DE CÃES. 25
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO 25
4.3.1 Caracterização morfológica 26
4.3.1.1 Análise morfológica das células 26
4.3.1.2 Análise morfológica das células após Coloração de Azul de Toluidina 26
4.3.1.3 Análise morfológica das células após Coloração de Hematoxilina-Eosina 27
4.3.2 Caracterização celular 27
4.3.2.1 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT 27
4.3.2.2. Análise imunocitoquímica das células-tronco de saco vitelino 28
4.3.3 Caracterização funcional 29
4.3.3.1. Diferenciações adipogênica e osteogênica 29
4.3.3.2. Diferenciação condrogênica 31
4.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO DE CÃES 32
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SACO VITELINO 32
5 RESULTADOS 34

5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE SACO VITELINO DE CÃES EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS 34
5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO 36
5.3.1 Caracterização Morfológica.....36
5.3.1.1 Análise morfológica das células por microcópia de luz 37
5.3.1.2 Análise morfológica das células após Coloração de Azul de Toluidina.....38
5.2.1.3 Análise morfológica das células após Coloração de Hematoxilina-Eosina....40
5.3.2 Caracterização celular.....41
5.3.2.1 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT 41
5.3.2.2 Análise imunocitoquímica das células-tronco de saco vitelino 42
5.3.3 Caracterização funcional 47
5.3.3.1. Diferenciações adipogênica e osteogênica 47
5.2.3.2 Diferenciação Condrogênica 51
5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO DE CÃES 53
5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SACO VITELINO 57
6 DISCUSSÃO 60
7 CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS.....64

1 INTRODUÇÃO

Dentro dos avanços da Medicina, a utilização de transplante de células com objetivos terapêuticos vem sendo discutida há duas décadas, iniciando-se com o transplante de células de ilhotas pancreáticas para tratamento de diabetes (TZAKIS et al., 1990). Desde então, a Medicina Regenerativa vem também explorando as conhecidas células-tronco, devido à promessa de plasticidade celular. Dentre as células-tronco com maior plasticidade celular encontram-se as células-tronco embrionárias, porém são as que concentram maiores dificuldades quanto à sua utilização devido às questões éticas associadas. Muito utilizadas são as células-tronco adultas, entretanto estas apresentam limitada plasticidade, e por isso há um crescente interesse em obter outras fontes de células-tronco (INSAUSTI, 2010). Uma saída seria a utilização de células-tronco de origem fetal, pois apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2005). O mesmo é defendido por outros pesquisadores, levantando ainda a vantagem de que as células fetais podem ser interessantes para terapia celular e gênica ex vivo por apresentarem também diferenças na expressão gênica (GOTHERSTROM et al., 2004; O'DONOGHUE; FISK, 2004).

O saco vitelino é um anexo fetal, sendo que as células-tronco obtidas do saco vitelino humano apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2006) e, uma vez estando situadas na interface materno-fetal (MIHU et al., 2009), elas se tornam mais propícias a transplantes por possuírem baixa resposta imunológica (CUI et al., 2005). Wenceslau et al., 2011 demonstraram que as células-tronco do saco vitelino de cão podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* por um longo período sem a alteração de sua plasticidade e assim terem uma variedade de aplicações devido a esta capacidade.

Nosso grupo tem interesse em explorar mais as possibilidades de utilização de células-tronco de saco vitelino, verificando seu potencial terapêutico e aplicabilidade, área ainda muito pouco explorada. Para tanto, neste projeto tivemos como objetivo principal obter e caracterizar células provenientes do saco vitelino de cães em diferentes estágios gestacionais, comparando a expressão de marcadores

de pluripotência e verificando o comportamento biológico destas células. Além disso, este projeto visa comparar se a expressão de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos, endoteliais e de pluripotência são diferentes de acordo com o período gestacional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo estudar as células-tronco derivadas do saco vitelino de fetos de cães de diferentes períodos gestacionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolamento e cultivo das células-tronco do saco vitelino dos fetos de cães em diferentes idades gestacionais.

Caracterização celular e funcional *in vitro* das células-tronco derivadas de saco vitelino de fetos de cães.

Avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco do saco vitelino de cães em camundongos imunossuprimidos, nudes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO CÃO

A duração do período gestacional no cão é um dado que apresenta pequenas variações de acordo com os autores Jackson (2005), o qual diz que a duração é entre 58-64 dias; McGeady et al. (2006) 57-63 dias; Maddox-Hyttel, Sinowatz e Vejlsted (2010) 58-68 dias , enquanto que para Pretzer (2008) é de 61 dias.

Segundo Pretzer (2008), de forma geral, a gestação canina é dividida em três períodos: o período de ovo que vai da fecundação até o 17° dia, o período embrionário que compreende do 19° ao 35° dias e, por último, o período fetal indo do 35° dia ao nascimento.

O período de ovo se inicia com a fertilização, na qual há a formação do zigoto, dentro da tuba uterina. À medida que migra em direção ao útero, o zigoto passa por sucessivas clivagens (divisões mitóticas) dando origem à mórula. As células derivadas da clivagem chamam-se blastômeros e se tornam cada vez menores com as divisões, já que ainda estão envoltas pela zona pelúcida.

Por volta do oitavo dia de gestação, os blastômeros, células totipotentes, passam por uma primeira diferenciação. Os blastômeros que permanecem numa posição mais externa adquirem uma característica epitelial, sendo denominado de trofoblasto ou trofoectoderma. Internamente ao trofectoderma se forma uma cavidade chamada de blastocele ou cavidade blastocística.

Com isso, o grupo de blastômeros mais internos é deslocado para um dos pólos embrionários constituindo então a massa celular interna. Esta primeira diferenciação que ocorre no blastocisto é importante, pois as duas populações de células formadas originarão partes específicas do concepto. O trofectoderma é responsável pela formação dos anexos embrionários e a massa celular interna pelo embrião propriamente dito (McGEADY et al., 2006; RAMOS, 2006; PRETZER, 2008; DERUSSI; LOPES, 2009; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

Durante o período embrionário, as células do trofoblasto que estão mais em contato com o epitélio endometrial proliferam e dão origem ao sinciciotrofoblasto. A camada de trofectoderma que permanece mais interna e com limites celulares bem definidos passa a ser denominada de citotrofoblasto. Ao mesmo tempo, a massa celular interna está passando por transformações tais como: a segregação e delaminação levando à sua subdivisão em hipoblasto e epiblasto. Entre estas camadas é formada uma membrana basal extracelular. Dessa forma, a união do hipoblasto, membrana basal extracelular e epiblasto, dará origem o disco embrionário bilaminar (McGEADY et al., 2006; RAMOS, 2006; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010). Neste período ocorre a formação dos anexos embrionários: saco vitelino, âmnio, córion, alantoide e placenta.

A partir de dobras formadas pelo epiblasto origina-se uma cavidade denominada cavidade amniótica. As células epiblásticas mais externas à esta cavidade se diferenciam em amnioblastos, que formam a membrana amniótica, a qual é constituída por uma camada de epitélio simples, uma espessa membrana basal e um mesênquima avascular (BENIRSCHKE; KAUFMAN, 2000; McGEADY et al., 2006; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

A formação inicial do saco vitelino primitivo se dá pela proliferação do hipoblasto que passa a revestir toda a cavidade blastocística. Nesse ponto o saco vitelino é uma membrana bilaminar constituída por uma camada de células trofoblásticas e pelo endoderma extra embrionário. Depois, o mesoderma também sofre proliferação e se justapõe entre o endoderma e o trofectoderma, dando origem ao saco vitelino trilaminar. Em cães, o saco vitelino apresenta importância relevante por ser responsável, principalmente, pela nutrição inicial do embrião participando da formação de uma placenta córiovitelina (McGEADY et al., 2006; MIGLINO et al., 2006; RAMOS, 2006; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

O alantóide é originado da parede posterior do saco vitelino, como um divertículo da região do intestino primitivo. Com isso, ele é constituído por uma camada de endoderma e outra de mesoderma esplâncnico ou visceral. Com seu crescimento em direção ao celoma extra-embrionário, o alantóide fica interposto ao âmnio e cório. (SADLER, 2005; McGEADY et al., 2006; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

O córion se desenvolve a partir da associação do mesoderma extra-embrionário com o trofectoderma. Esse anexo, juntamente com o alantóide, dá origem a placenta córioalantoide, que substitui a placenta córiovitelina inicial, característica dos carnívoros. O cório viloso é restrito a uma zona na placenta da cadela, sendo então classificada como zonária. Devido à atividade invasiva do sinciciotrofoblasto deixando o cório em íntimo contato com o endotélio uterino, a placenta é classificada também como endoteliocorial. Também por isso, no momento do parto, parte do tecido uterino é perdida, sendo esta placenta classificada como decídua (BJÖRKMAN; DANTZER; LEISER, 1989; MIGLINO et al., 2006; McGEADY et al., 2006; MADDOX-HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2010).

3.2 O SACO VITELINO

O saco vitelino nos mamíferos é composto por três camadas de tecido celular, separadas por duas membranas basais. Suas células apresentam citoplasma com inúmeros vacúolos, mitocôndrias bem desenvolvidas e um extensivo complexo de Golgi (DUNTON et al., 1986). É formado a partir do disco embrionário, que forma uma única camada celular da endoderme, denominado saco vitelino uni laminar ou onfalopleura. O saco vitelino bilaminar é formado pela associação do endoderma extra-embrionário com o trofectoderma adjacente e, finalmente, o crescimento do mesoderma entre os dois primeiros, juntamente com a vasculatura fetal, dão origem ao saco vitelino trilaminar (WOODING; FLINT, 1994). O saco vitelino completa seu desenvolvimento no momento em que a porção extra embrionária de celoma se alarga e, assim, o saco vitelino é uma esplancnopleura, a qual inicialmente tem uma extensa conexão com a somatopleura coriônica (MOSSMAN, 1987).

Segundo Hafez e Hafez (2004) durante e logo após o processo de implantação em animais domésticos, o crescimento externo do mesoderma extra embrionário ocorre a partir do ectoderma, mais precisamente da linha primitiva que migra entre o trofoectoderma e o endoderma. Esta lâmina mesodérmica se divide e combina com o trofoectoderma para formar o saco vitelino.

O saco vitelino de gatos e cães persistem até o final da gestação (TIEDMANN, 1979), em ovelhas apresenta rápida regressão entre os dias 23 a 35 de gestação (LIU et al., 1991), nos humanos na décima semana já se encontra como resquício (MOORE; PERSAUD, 2008), nos suínos involui no final do primeiro terço da gestação (MINUTH; TIEDEMANN, 1980) e em bovinos e bubalinos involui em torno do dia 45 de gestação (ASSIS NETO, 2005; MORINI et al., 2008).

Dentre as funções do saco vitelino temos a produção e transporte de proteínas necessárias para o desenvolvimento do embrião e a participação no intercâmbio de metabólitos. Nos mamíferos a sua função é complexa, participando da hematopoiese e transferência de material materno, tais como: vitaminas, aminoácidos e imunoglobulinas, produzindo ainda as células germinativas, que constituirão as células precursoras dos gametas (WOLF, 2003; GALDOS-RIVEROS et al., 2010).

Segundo Rüsse et al. (1992) a importância do saco vitelino como órgão placentário e hematopoiético são bem conhecidos nos roedores, o mesmo não ocorre no caso do saco vitelino em cães, aonde se tem um número de informações escassas sobre sua real função.

3.3 CÉLULAS-TRONCO

A terapia celular visa à recuperação de tecidos e órgãos lesados através da introdução de novas células, capazes de recuperar as áreas afetadas e restabelecer a função previamente perdida. As células-troncos podem ser uma possibilidade no tratamento de doenças degenerativas, congênitas, traumas e injúrias das mais variadas etiologias. Antes da aplicação de terapias celulares é importante a identificação das fontes confiáveis e renováveis de células-tronco; o isolamento de subpopulações celulares desejadas; a obtenção do número adequado de células, o entendimento de como as células respondem ao ambiente de lesão e ao ambiente normal, além do entendimento de como as células migram e estabelecem conexões apropriadas e também como as células podem modular a resposta imununológica.

As células-tronco possuem capacidade de auto renovação ilimitada e potencial de diferenciação que lhes confere um papel primordial e vital durante o processo de desenvolvimento e ao longo da vida, além de serem células indiferenciadas (ASAHARA, 2004; MIMEAULT, 2006). Estas células são classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes de acordo com o potencial de diferenciação. As células totipotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário ou de anexos embrionários, gerando qualquer tipo celular; as pluripotentes são as capazes de se diferenciarem em qualquer tecido embrionário, sendo as progenitoras de tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), também chamadas de células-tronco embrionárias; as multipotentes ou adultas são células que podem se diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão, possuindo plasticidade limitada e, por fim, as oligopotentes ou unipotentes são as progenitoras de um tipo celular (ZHANG et al., 2006).

As numerosas pesquisas com células-tronco adultas (CTA) e embrionárias (CTE) realizadas durante as últimas décadas forneceram informações importantes sobre a morfologia, processos fisiológicos e de desenvolvimento dos tecidos, bem como a formação dos órgãos, manutenção, regeneração e reparo após lesões.

As CTE foram isoladas pela primeira vez, em 1981, em blastocistos de camundongos, sendo um dos maiores acontecimentos no campo do desenvolvimento biológico (EVANS, 1989).

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram isoladas inicialmente em 1970, por Friedstein et al. como células da medula óssea com capacidade de formar unidades de colônia semelhantes a fibroblasto *in vitro*.

Em 1991, Caplan definiu o termo CTM como sendo uma célula capaz de dar origem a outras linhagens de células diferentes a da sua origem, mas em 2005, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e dos Tecidos da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu que as CTM devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura; devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não expressar os marcadores CD45; CD34; CD14 ou CD1b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e, devem se diferenciar em osteoblasto, adipócitos e condroblastos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006; SEMEDO et al., 2009; BASSI; AITA; CÂMARA, 2011). As

células-tronco adultas, também chamadas de células-tronco mesenquimais são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos (CAPLAN, 2007).

Elas possuem baixa taxa de crescimento *in vivo*, capacidade de regeneração e habilidade de se diferenciar entre as várias linhagens celulares de origem mesenquimal e substituem células que foram perdidas pela senilidade ou por injúrias (CONRAD; HUSS, 2005). Além das linhagens celulares citadas acima, já foi demonstrado que as CTMs podem se diferenciar em células não hematopoiéticas de vários tecidos, incluindo fígado (ALISON et al., 2000), sistema nervoso central (MEZEY et al., 2000), rins (KALE et al., 2003), pele (BADIAVAS et al., 2003), trato gastrointestinal (OKAMOTO et al., 2002), coração (ORLIC et al., 2001) e músculo esquelético (FERRARI et al., 1998).

As células-tronco fetais (CTF) são uma fonte de células-tronco facilmente acessíveis a partir de tecido extra embrionários, que geralmente são descartados após o nascimento e que podem ser obtidas através da placenta (PAROLINI; CARUSO, 2011), saco vitelino (WENCESLAU et al., 2011), âmnion (URANIO et al., 2011) e córion (FUKUCHI et al., 2004). Estas células podem substituir as células-tronco adultas e embrionárias na terapia celular (MARCUS et al., 2008), pois apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade (MIKI et al., 2005) e, se tornam mais propícias a transplantes por possuírem uma baixa resposta imunológica, uma vez que estão na interface materno-fetal (LI et al., 2005; MIHU et al., 2009). Além disso, as células-tronco provenientes de tecidos extra embrionários, possuem uma capacidade de diferenciação em células especificas como cardiomiócitos, somadas as estabelecidas propriedades de diferenciação em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (KIM et al., 2007) o que tornam essas células, fontes alternativas de células multipotentes (YEN et al., 2005).

3.4 CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO

Há um crescente interesse pela busca de novas fontes de células-tronco, devido às questões éticas e a formação de teratoma que envolvem a utilização das CTE, bem como a baixa plasticidade das CTA. Dessa forma, muitos pesquisadores

vêm estudando células-tronco de origem fetal (CTF) por apresentam características similares com as CTA mesenquimais, porém receberam essa denominação por se encontrarem no período fetal do desenvolvimento embrionário.

O saco vitelino é o primeiro local de formação de células sanguíneas nos estágios iniciais da embriogênese e por isso, levantou-se a hipótese de que as células-tronco provenientes do saco vitelino seriam capazes de originar linfócitos, granulócitos, monócitos, eritrócitos, e megacariócitos (PALIS; YODER, 2001; ZHANG et al., 2003) e também o tecido das veias, artérias e capilares (MEDVINSKY et al., 2008; WANG, et al., 2008). Estas células possuem morfologia homogênea e não expressam marcadores de células maduras na sua superfície ou antígenos codificados pelo MHC (complexo de histocompatibilidade principal) associados à rejeição de enxertos de tecidos (HOLLANDS, 1987). Por não expressarem antígenos do MHC, estas células têm a capacidade de escapar à rejeição imunológica, podendo ser doadas para receptores alogênicos e xenogênicos (ESKOLA, 1977). Por sua vez, as células maduras, diferenciadas, provocam rejeição por histoincompatibilidade entre doador e receptor. Por esta razão, as células-tronco do saco vitelino se tornam uma fonte de células-tronco relevantes para a terapia celular (WILPSHAAR et al., 2002).

Wenceslau et al. (2011) demonstraram que células-tronco do saco vitelino obtidas de cães podem ser cultivadas e expandidas *in vitro* por um longo período sem a alteração de sua plasticidade. Nosso grupo também já isolou células-tronco de saco vitelino de equinos, onde foi observado que as mesmas possuem características mesenquimais com expressão de marcadores, aderência ao plástico e diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos (FRANCIOLLI, 2012). Além disso, esse mesmo comportamento foi observado em roedores da espécie Neocromys lasiurus (FAVARON, 2012).

Dessa forma, nosso projeto tem como objetivo estabelecer o cultivo de células-tronco de saco vitelino de cães em diferentes períodos gestacionais visando analisar a relação entre período gestacional e características peculiares em relação a expressão de marcadores mesenquimais, hematopoiéticos, endoteliais e de pluripotência.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO DE CÃES COM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS

As células-tronco fetais do saco vitelino de cães foram obtidas em campanhas de castração através do “Programa Permanente de Controle Reprodutivo de Cães e Gatos no Município de São Paulo”, do Centro de Controle de Zoonoses, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Convém ressaltar que este projeto está diretamente correlacionado com o projeto de pós-doutoramento da Dra. Graciela C. Pignatari intitulado “Análise do potencial terapêutico das células-tronco fetais de saco vitelino no tratamento de linfedema murinho induzido”.

Os úteros gravídicos de cães foram coletados através da técnica de ovariosalpingohisterectomia após sedação dos animais. Os cães foram sedados com 0,1 mg/kg de acepromazina (Acepran, Univet, São Paulo, Brasil), 0,5 mg/kg de xilazina (Anasedan, Vetbrands, Jacareí, Brasil) e 20 mg/kg de quetamina (Dopolen, Vetbrands). Terminada a coleta, os úteros foram transportados em gelo e tampão salifna-fosfato (PBS) contendo 5% de solução de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) até o Laboratório de Células-Tronco (LCT) da FMVZ-USP, onde foram seccionados cirurgicamente para a retirada dos fetos e o material foi fotografado e mensurado pela técnica de Evans e Sack (1973). Em seguida, o saco vitelino foi transferido para um tubo cônico contendo tampão salina fosfato (PBS) e 5 % de solução de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich) e, lavado extensivamente com PBS.

Após lavagem, o saco vitelino em um primeiro momento foi apenas fragmentado com o auxílio de um bisturi e os fragmentos foram digeridos durante 30 min com a enzima colagenase tipo I (1mg/mL- Invitrogen, CA, USA). Em seguida, a enzima foi inativada com soro fetal bovino, centrifugadas e o precipitado celular foi ressuspendido em meio α–MEM (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) acrescido de 15% de soro fetal bovino definido (Hyclone, Thermo Scientific, UT, USA), 1% de

Aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 1 % solução de antibiótico-antimicótico (Sigma-Aldrich) e 1% de L-Glutamina (Invitrogen) e mantidas a 37ºC em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS PROVENIENTES DO SACO VITELINO DE CÃES

O procedimento de congelamento foi iniciado com a lavagem das células com PBS, seguida de tripisinização. Após tripsinização, as células foram submetidas à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm e o precipitado formado foi ressupendido em solução de congelamento contendo: 90% de SFB (Invitrogen) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - LGC). Em seguida, os tubos foram colocados por 24h em freezer -80ºC e posteriormente transferidos ao nitrogênio líquido. Após 30 dias do congelamento, as células foram descongeladas rapidamente em banho-maria e colocadas em cultivo com o objetivo de analisar se as mesmas conservam suas características após congelamento.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO

Dentro desse aspecto, as células foram caracterizadas biologicamente com base na caracterização morfológica (microscopia óptica de luz e colorações de Azul de Toluidina e Hematoxilina-Eosina), celular (proliferação celular por MTT, imunofenotipagem) e funcional (diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica).

4.3.1 Caracterização morfológica

A morfologia das células-tronco de saco vitelino foi visualizada diariamente em microscopia de luz sem e com colorações de Azul de Toluidina e Coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

4.3.1.1 Análise morfológica das células

As células derivadas do saco vitelino de cães em cultivo foram submetidas à análise morfológica por microscopia de luz, em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100 - Japão) e fotografado semanalmente.

4.3.1.2 Análise morfológica das células após Coloração de Azul de Toluidina

A coloração de azul de toluidina foi realizada para analisar a morfologia das células-tronco derivadas do saco vitelino de cães. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 35 mm, fixadas com paraformaldeído 4% (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso do fixador e coradas com azul de toluidina (Merck) durante 10 minutos. Passado esse período de incubação, o corante foi retirado e o poço lavado com PBS. As células foram analisadas através de microscopia de luz e a morfologia observada registrada fotograficamente em microscópio óptico invertido (Olympus BX 50 F4, Tókio, Japão).

4.3.1.3 Análise morfológica das células após Coloração de Hematoxilina-Eosina

Ainda visando analisar a morfologia destas células, as mesmas foram submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina. Para isso, as células foram cultivadas em placa de 35 mm. Após as 24 horas de cultivo, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Merck) por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para a retirada do excesso de fixador, coradas com hematoxilina (Merck) por 10 minutos e novamente lavadas com PBS. Por fim, as células foram coradas pela eosina (Merck) por 3 minutos e novamente lavadas com PBS para a retirada do excesso de corante.

As células foram analisadas através de microscopia de luz e a morfologia observada registrada fotograficamente em microscópio invertido (Olympus BX 50 F4, Tókio, Japão).

4.3.2 Caracterização celular

Para a caracterização celular das células-tronco do saco vitelino de cães realizamos ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT e análise da expressão de marcadores mesenquimais e de pluripotência através de ensaios imunocitoquímicos.

4.3.2.1 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

O ensaio colorimétrico de viabilidade celular MTT, descrito por Carmicheal et al. (1987), consiste na redução do MTT (3-[(4,5- *dimethylthiazol*-2-*yl*)- 2,5-*diphenyltetrazolium bromide*] - Sigma), composto de coloração amarela, pela enzima

desidrogenase mitocondrial (componente do complexo II do ciclo de Krebs), presente somente em células viáveis, gerando formazan, composto azul-violeta. O formazan uma vez precipitado a 1.000 rpm por 10 minutos e solubilizado em DMSO, é quantificado por espectrofometria a 550 nm.

O experimento foi realizado a cada 48 horas durante 10 dias para análise da proliferação celular das células-tronco do saco vitelino obtidas nos dois estágios gestacionais. Para tanto, aproximadamente 1 x 10^3 ou 5 x 10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 orifícios em um volume de 100 μL/poço para cada dia de experimento.

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

4.3.2.2. Análise imunocitoquímica das células-tronco de saco vitelino

As células-tronco derivadas do saco vitelino foram cultivadas em placas de 24 orifícios sob a lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 80%. Em seguida, as células foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada em PBS e fixadas em 4 % de paraformaldeído durante 15 minutos. Após fixação, as células foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada.

Em seguida, as células foram permeabilizadas com 0,1 % de Triton X-100 durante 15 minutos a temperatura ambiente. Ao final da permeabilização, as células foram lavadas novamente com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada lavagem e submetidas ao bloqueio em PBS contendo 2 % de soro albumina bovino (BSA)

durante 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti-vimentina, anti-PCNA3, anti-VEGF, anti-CD45, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, (concentração 200 µg/mL – Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluídos 1:100 em PBS contendo 2% de BSA e mantidas em câmera úmida por 16 horas a 4ºC. Após o período de incubação dos anticorpos primários, as células foram lavadas por três vezes com PBS e novamente incubadas com PBS contendo 2% de BSA durante 1h a temperatura ambiente. Passado o período de incubação, os anticorpos secundários diluídos 1:1000 em PBS contendo 2% de BSA marcados com FITC (Santa Cruz) ou Texas Red foram adicionados e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as lâminas foram montadas em meio de montagem Vectashield *VECTASHIELD® Mounting Medium* contendo DAPI (Vector Laboratories, CA, USA) e a imunoreatividade foi avaliada em microscopia de epifluorescência Eclipse 80*i* e no programa *NIS Elements* version 3.22 (Nikon, Tókio, Japão).

4.3.3 Caracterização funcional

As células-tronco derivadas do saco vitelino de fetos caninos foram submetidas à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos.

4.3.3.1 Diferenciações adipogênica e osteogênica

Aproximadamente 40.000 células/mL (diferenciação em adipócitos e osteócitos) e 5.000 células/mL (controle) foram cultivadas em placas de 24 poços. A diferenciação foi iniciada no mínimo 24 horas após o início do cultivo ou quando as células atingiam confluência em torno de 80%. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 1 mL de meio de indução (adipócitos ou

osteócitos) ou somente o meio α-MEM (LGC) acrescido de 7,5% SFB (Invitrogen) no controle. As placas foram mantidas em estufa úmida a 37ºC com 5% de CO_2 e metade do meio foi trocado 2 vezes por semana, até a diferenciação celular e monitoradas por microscopia invertida.

O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o α-MEM 15% SBF, suplementado com 10 µM de dexametasona (Decadron injetável, Schering-Plough,SP, Brasil), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 5 µM de indometacina (Sigma-Aldrich) e 5 µM de rosiglitazona (Sigma-Aldrich) e para os osteócitos o α-MEM 7,5% SBF suplementado com 0,1 µM de dexametasona (Decadron injetável), 100 µM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) e 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich).

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

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

As células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixadas e novamente lavadas com álcool isopropílico a 60% e em seguida o corante *oil red* (0,36% de *oil red* em álcool isopropílico a 60%) foi adicionado. Após 20 min de incubação a temperatura ambiente, o corante foi removido e as células foram lavadas com água destilada para remoção do excesso de corante. Após a remoção as lâminas foram montadas com glicerol e imediatamente analisadas em microscópio Eclipse 80i e no programa *NIS Elements version 3.22* (Nikon, Tókio, Japão), uma vez que, o rompimento dos vacúolos após coloração é muito rápido.

As células que foram diferenciadas em osteócitos foram coradas com 40 mM de *Alizarin Red S* em Tris pH 4,1 *(Sigma*). Passado 20 min da incubação, as células foram lavadas com água para a retirada do excesso de corante. Em seguida, as lâminas foram montadas com Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, USA) e levadas à análise em microscópio Eclipse 80i e no programa NIS Elements version 3.22 (Nikon).

4.3.3.2 Diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogência foi realizada utilizando o kit *Poietics human* ADSCS *Chondrogenesis Differentiation Kit* (Lonza).

Primeiramente as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e aproximadamente um milhão de células foram ressuspendidas em 2 mL de PBS. Em seguida as células foram centrifugadas a 150 x g durante 5 minutos e ressupendidas em 1 mL do meio de diferenciação incompleto do kit preparado seguindo as instruções do fabricante e dividida em dois tubos cônicos a fim de se obter no final aproximadamente 5 x 10^5 células por tubo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 150 x g e o precipitado celular formado foi ressuspendido em 1 mL de meio de diferenciação completo contendo 10 ng/mL de TGFβ-3 As células foram novamente centrifugadas a 800 rpm durante 5 minutos para formação do botão celular e então o tubo foi colocado cuidadosamente com tampa semiaberta na estufa a 37ºC em atmosfera úmida de 5 % de CO2. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana durante um período de no mínimo 21 dias.

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

Após inclusão, cortes de 3-4 µM foram realizados em micrótomo e colocados sobre lâminas silanizadas durante aproximadamente 12 h com o objetivo de escorrer o excesso de paraplast e assim, fixar o corte. Ao final, as amostras foram coradas com HE e Tricomo de Masson e analisadas em microscópio invertido Olympus BX50F4.

4.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO DE CÃES

Para a observação da formação de tumores, aproximadamente um milhão células-tronco do saco vitelino foram inoculadas subcutaneamente na região cervical dos camundongos imunossuprimidos, nudes.

Primeiramente, as células foram lavadas, tripsinizadas e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm com PBS para retirada dos resíduos de meio de cultivo. Em seguida, as células foram ressuspendidas novamente centrifugadas e o precipitado foi ressuspendido para contagem das células. Ao final, aproximadamente $1x10^6$ células foram ressuspendidas em 30 µl de solução fisiológica e aplicadas com auxilio de uma seringa de insulina.

Os animais foram mantidos durante aproximadamente 60 dias, no qual foram fotografados semanalmente para a verificação de formação de nódulo.

Passado este período, os animais foram eutanasiados seguindo as recomendações do Comitê de Ética em pesquisa e todas as amostras de tecidos com característica tumoral foram coletadas e fixadas. Os órgãos como coração, pulmão, cérebro, rins e músculos foram coletados para análises histopatológicas através da coloração de HE.

Os materiais coletados foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e as amostras foram submetidas aos protocolos rotineiros de inclusão em paraplast e coradas através das técnicas rotineiras de HE (WALLINGTON, 1972).

4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SACO VITELINO

Diante da disponibilidade do material, fragmentos provenientes dos úteros coletados foram submetidos à análise histológica. Para tanto, os tecidos coletados foram fixados em paraformaldeído a 8%, processados seguindo protocolos rotineiros de histologia e posteriormente corados com Hematoxilina-eosina. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente por 10 minutos para retirar o excesso de

fixadores. A etapa seguinte, a de desidratação, foi feita através de imersões do tecido em concentrações crescentes de etanóis (70%, 80%, 90%, e duas vezes em etanol 100%) por 15 minutos cada. A etapa de diafanização foi realizada com duas imersões em xilol por 15 minutos cada uma. Os tecidos foram incluídos em parafina líquida duas vezes. A primeira inclusão foi a 60° C por 1 hora, e a segunda por 16 horas, na mesma temperatura.

Depois, a amostra do tecido foi emblocada em parafina. O bloco foi hidratado, ficando 16 horas em um recipiente com água. Só então foi colocado em um micrótomo, fatiador especialmente idealizado que corta por meio de uma lâmina de aço, cortes sequenciais de 5µm de espessura. Estes cortes foram cuidadosamente assentados em lâminas histológicas, e depois colocados na estufa por 16 horas a 50°C, para que ocorra a desparafinização.

Primeiramente foi realizada a coloração de Hematoxilina-eosina, corante básico que cora componentes ácidos como o núcleo, e a eosina é um corante ácido que cora componentes básicos como o citoplasma. Para realização dessa coloração, os cortes de tecido foram desparafinados com duas imersões em xilol durante 10 minutos cada, seguidas de imersões subsequentes em concentrações decrescentes de etanóis (100%, 95%, 70%) por 3 minutos cada. Eles foram lavados em água corrente por 3 minutos e depois colocados na coloração de Hematoxilina de Mayer durante 6 minutos, e novamente lavados em água corrente por 10 minutos, para retirada do excesso do corante. Logo após, foram imersos rapidamente em álcool ácido e, depois, novamente lavados em água corrente durante 10 minutos. As lâminas então foram coradas em eosina por 1 minuto e, posteriormente, foi realizado o processo de desidratação com uma imersão rápida em etanol 95%, e duas imersões com etanol 100% por 3 minutos cada. Em seguida, foram realizadas duas imersões em xilol por 5 minutos cada.

Depois das imersões, cada lâmina recebeu uma lamínula, fixada com Permount e o tecido corado foi analisado usando microscópio de luz Nikon Eclipse E-800.

5 RESULTADOS

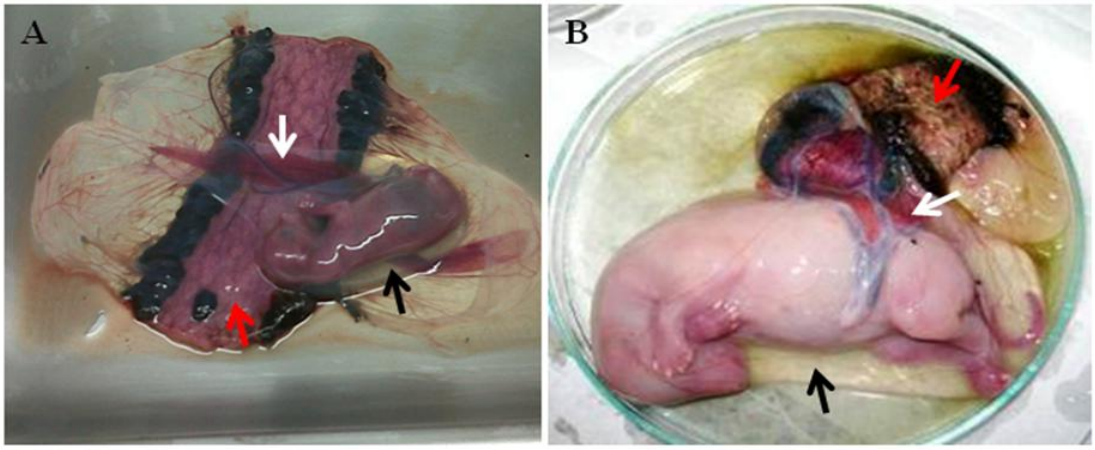
5.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DE SACO VITELINO DE CÃES EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS

Para a realização desse projeto, duas cadelas sem raça definida (SRD), com idades gestacionais diferentes foram utilizadas e após a retirada se seus fetos, os mesmos foram submetidos à análise aproximada das idades com base na medida da crista nucal até a primeira vértebra sacral (Crow-Rump) baseada na técnica preconizada por Evans e Sack (1973). De acordo com esta análise pudemos perceber que os fetos coletados tinham idades gestacionais aproximadas de 40 e 50 dias. Dessa forma, identificamos essas coletas como 40d e 50d.

Na coleta 40d, obtivemos um útero gravídico com 6 fetos e na coleta 50d, 9 fetos. Convém ressaltar que as coletas foram realizadas em dias diferentes.

A figura 1A mostra a imagem de um dos fetos de idade gestacional 40d com a presença de seus anexos embrionários e a figura 1B os fetos 50d, observe a presença da cinta placentária (setas vermelhas), saco vitelino (setas brancas) e membrana amniótica (setas pretas).

Figura 1 – Feto Canino com aproximadamente 40 e 50 dias de gestação

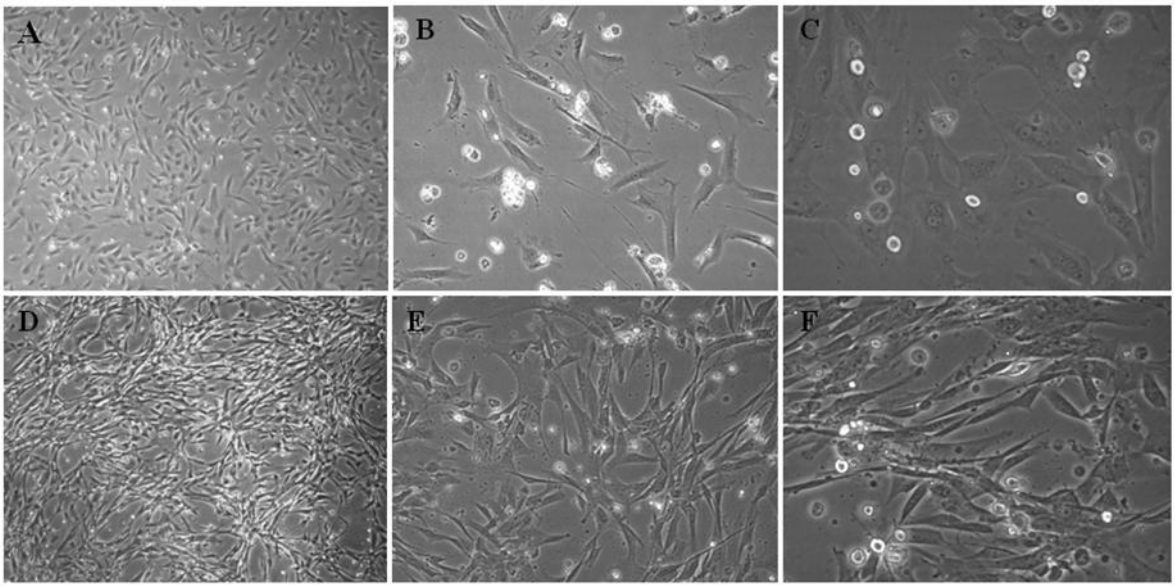


Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Feto Canino com idade gestacional de aproximadamente 40 dias. Observe a presença da cinta placenária, (seta vermelha), membrana amniótica (seta preta) e saco vitelino (seta branca). B) Feto Canino com idade gestacional de aproximadamente 50 dias. Nesta figura também podemos observar a cinta placentária (seta vermelha), membrana amniótica (seta preta) e saco vitelino (seta branca).

5.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS PROVENIENTES DO SACO VITELINO DE CÃES

A figura 2 mostra, logo após o descongelamento, que as células aderiram à placa e se multiplicaram normalmente. Na figura 2A, B e C, temos as células que foram descongeladas na passagem P3, após 2 dias do descongelamento, nos aumentos de 4x, 10x e 20x. As células atingem a confluência de forma rápida após a tripsinização, sendo mostrado na figura 2D, E, e F mostra que em P4, novamente se repetiu a característica de alta replicação.

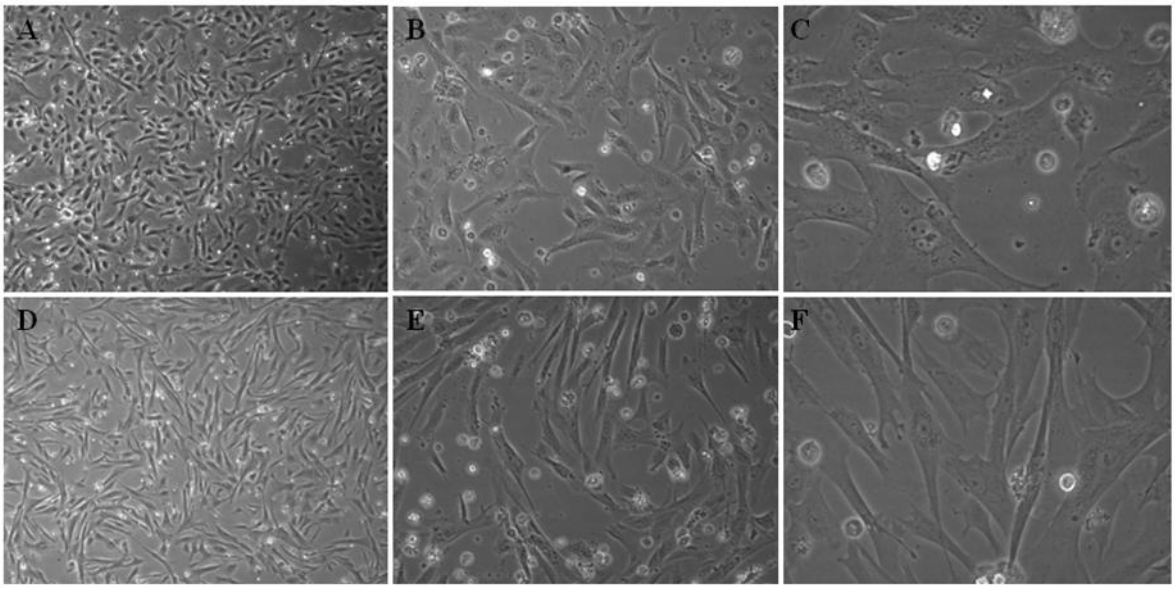
Figura 2 - Fotomicrografia das células-tronco de saco vitelino, 40d após descongelamento para análise de seu potencial de criopreservação



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A,B,C) Células 40d, passagem P3 e aumentos de 4x, 10x e 20x, respectivamente. D,C,E) Células 40d, passagem P4 e aumentos de 4x, 10x e 20x.

Na figura 3 foi feito o mesmo que na figura 2, porém, as células foram descongeladas em P5 (Figura 3A, B e C) e a confluência também foi atingida em 2 dias após o descongelamento, sendo em seguida as células tripsinizadas novamente atingindo boa confluência em 2 dias na sexta passagem (P6) (Figura 3D, E e F).

Figura 3 - Fotomicrografia das células-tronco de saco vitelino 50d após descongelamento para análise do seu potencial de criopreservação



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A,B,C) Células 50d ,passagem P5 e aumentos de 4x, 10x e 20x, respectivamente. D,C,E) Células 50d, passagem P6 nos aumentos de 4x, 10x e 20x.

5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DAS CÉLULAS-TRONCO FETAIS DO SACO VITELINO

A caracterização biológica das células-tronco de saco vitelino foi feita por caracterização morfológica (microscopia de luz, colorações de HE e toluidina), celular (análise de viabilidade, MTT, imunofenotipagem por ensaios imunocitoquímicos) e funcional (diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica).

5.3.1 Caracterização Morfológica

A caracterização morfológica das células foi realizada através de monitoramento diário das células por microscopia de luz e também pelas colorações de Azul de Toluidina e Hematoxilina-Eoxina.

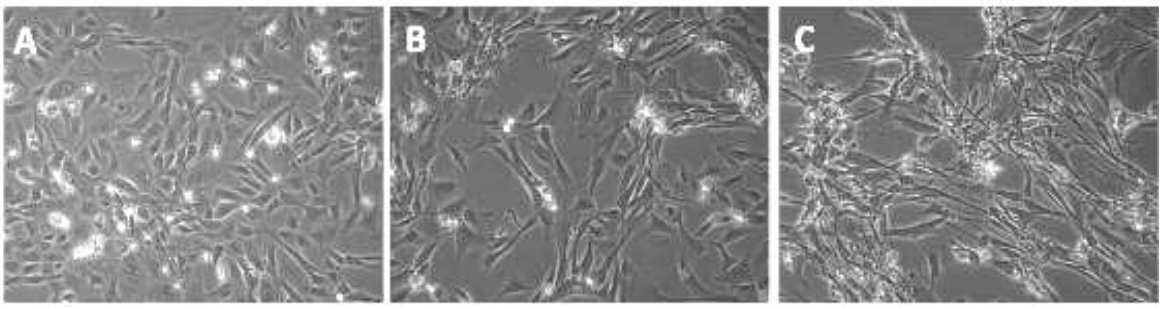
5.3.1.1 Análise morfológica das células por microcópia de luz

Nos primeiros dias de cultura, mesmo utilizando a técnica de colagenase I para a digestão enzimática do tecido, além das células ainda restavam alguns fragmentos de tecidos, dos quais desprendiam células. Também se observava uma grande quantidade de hemácias devido a grande vascularização do tecido.

Além disso, todos os dias observamos em microscópio a morfologia das células, tanto de 40d quanto de 50d nota-se dois tipos celulares, um com morfologia epitelial e o outro fibroblastóide. Porém, o tipo celular com formato epitelial esteve presente apenas no início do cultivo celular, morrendo a cada troca de meio e a cada nova tripsinização e com isso permanecendo apenas o tipo fibroblastóide. Esse tipo de cultura mista tem sido observado com frequência quando isolamos células-tronco de saco vitelino e de membrana amniótica.

A figura 4A-C representa as células-tronco de saco vitelino provenientes de fetos com aproximadamente 40 dias de gestação onde observamos as células com morfologia fibroblastóide bem características de células-tronco. A figura 4A mostra as células após 10 dias de cultivo, a figura 2B 17 dias de cultivo e figura 4C 42 dias.

Figura 4 - Fotomicrografia das células-tronco de saco vitelino provenientes de fetos com aproximadamente 40 dias de gestação

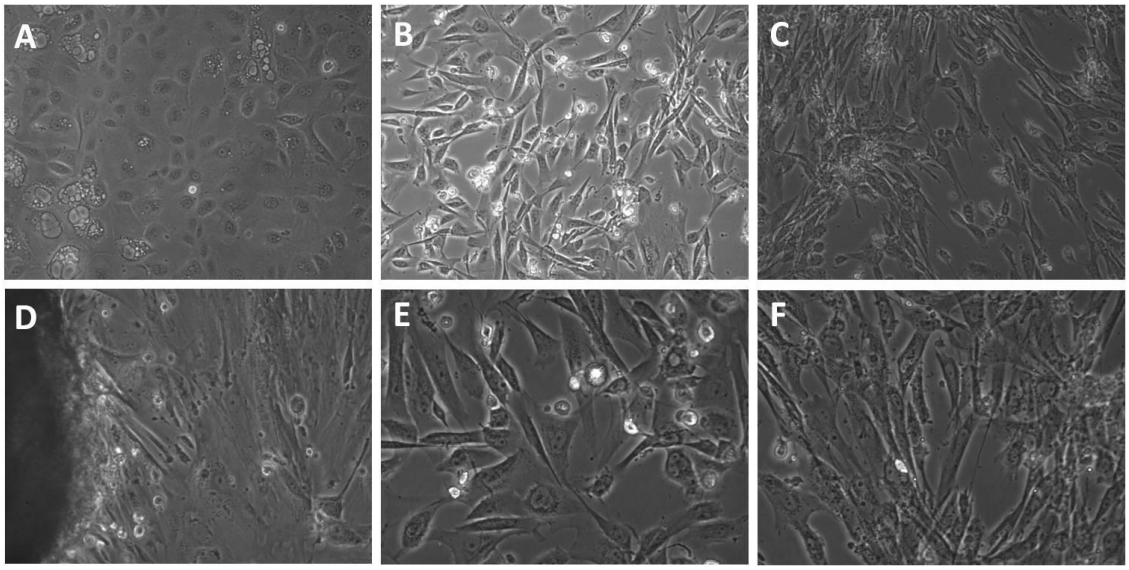


Fonte: (PIGNATARI, et al., 2012)
Legenda: A) 10 dias de cultivo, B) 17 dias de cultivo, C) 42 dias de cultivo. Em todas as imagens o aumento foi de 100x.

Na primeira passagem das células de saco vitelino de aproximadamente de 50 dias (Figura 5A e D), também foi possível observar a presença de dois tipos

celulares, epitelial e fibroblástica. Na figura 5D, ainda visualizamos fragmentos de saco vitelino liberando células com formato fibroblástóide, resquício da digestão enzimática da cultura primária e na Figura 5A observamos que aparentemente as células de saco vitelino de cão com formato epitelial estão sofrendo processo de morte celular, porém após a passagem 3 (P3), 25 dias de cultivo (Figura 5B) não observamos mais a presença de células epiteliais. As células fibroblastóides aparentemente apresentam alta capacidade proliferativa, pois após 46 dias de cultura as células continuam crescendo.

Figura 5 - Fotomicrografia da cultura de saco vitelino de aproximadamente 50 dias



Fonte: (PIGNATARI, et al., 2012)
Legenda: A, D) 7 dias de cultivo, passagem 1; B, E) 25 dias de cultivo, passagem 3; C,F) 46 dias de cultivo, passagem 7. A-C) Aumento de 10x. D-F) 20x.

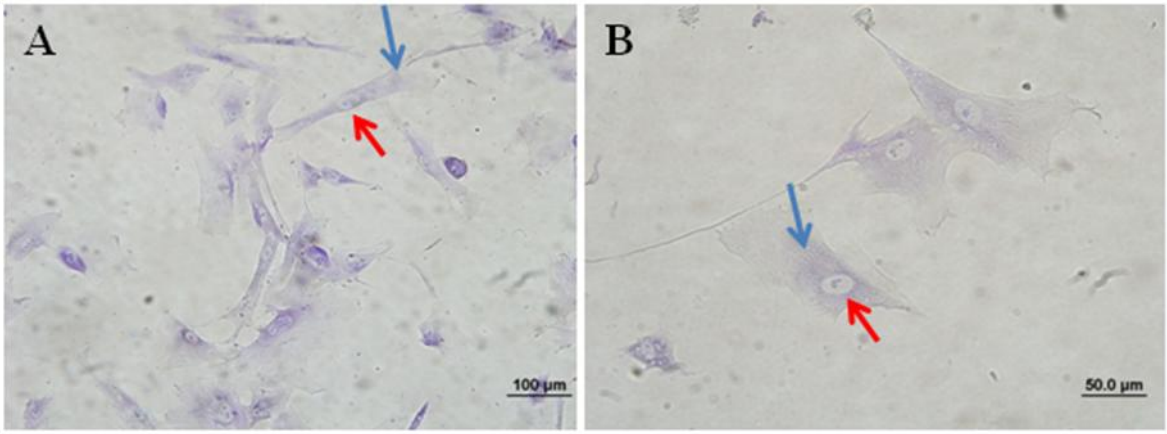
5.3.1.2 Análise morfológica das células após Coloração de Azul de Toluidina

A coloração por azul de toluidina foi realizada para auxiliar na caracterização da morfologia celular.

A figura 6A e B representa os resultados obtidos com a coloração de azul de toluidina nas células-tronco de saco vitelino dos fetos de 40d. Com esta coloração,

notamos que a célula possui formato fibroblastóide (seta azul, Figura 6A) e núcleo grande (seta vermelha, Figura 6A), características de células-tronco mesenquimais.

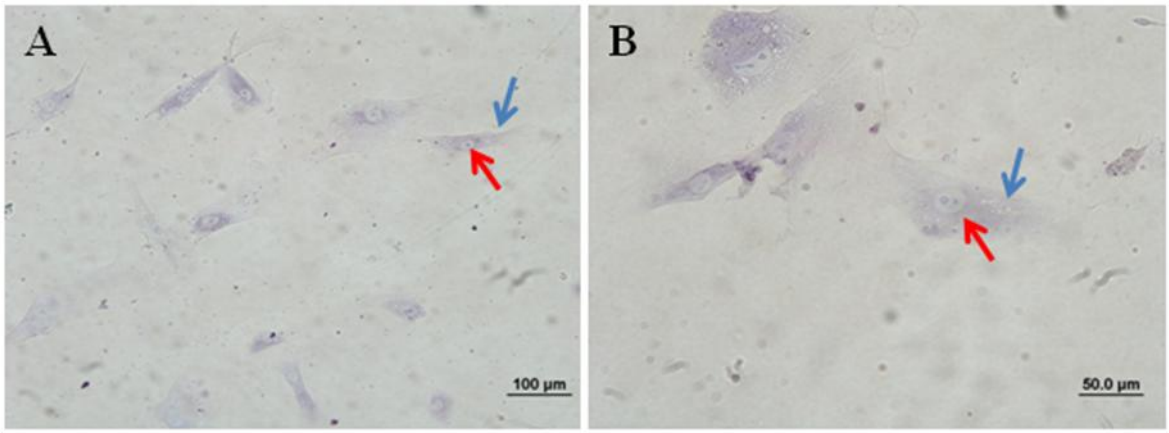
Figura 6 - Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina das células-tronco de saco vitelino de fetos caninos, fetos de 40 dias



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Aumento 200x. Seta vermelha núcleo e seta azul citoplasma.
B) Aumento de 400x.

Na figura 7A e B, temos a fotomicrografia das células-tronco do saco vitelino de fetos com 50d nos aumentos de 20x e 40x respectivamente. A seta vermelha na figura 7A novamente indica o núcleo, que proporcionalmente ao citoplasma é considerado grande em comparação com uma célula com formato epitelial. Já, a seta azul mostra que de fato a morfologia das células lembra um fibroblasto.

Figura 7 - Fotomicrografia de coloração de azul de toluidina das células-tronco de saco vitelino de fetos caninos, 50d

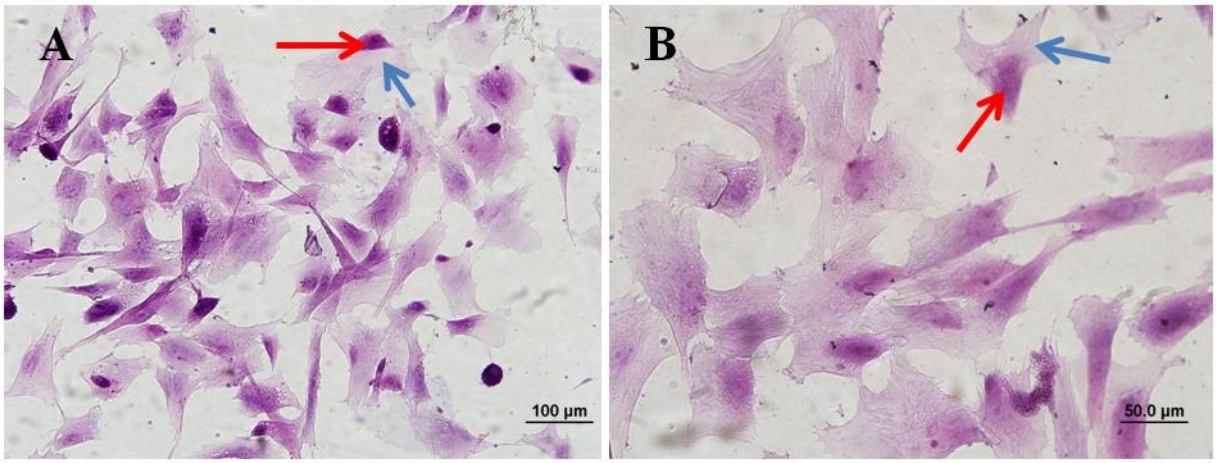


Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda: A) Aumento 200x. Seta vermelha núcleo e seta azul citoplasma. B) 400x.

5.2.1.3 Análise morfológica das células após Coloração de Hematoxilina-Eosina

A escolha dessa coloração foi feita para que pudéssemos confirmar o que foi visto com o Azul de Toluidina em relação à morfologia das células-tronco de saco vitelino de 40d e 50d. Na figura 8A e B pudemos confirmar o formato fibroblastóide com núcleo grande e citoplasma escasso, característico de células-tronco mesenquimais. Nota-se aspecto regular do contorno dessas células e elevada confluência.

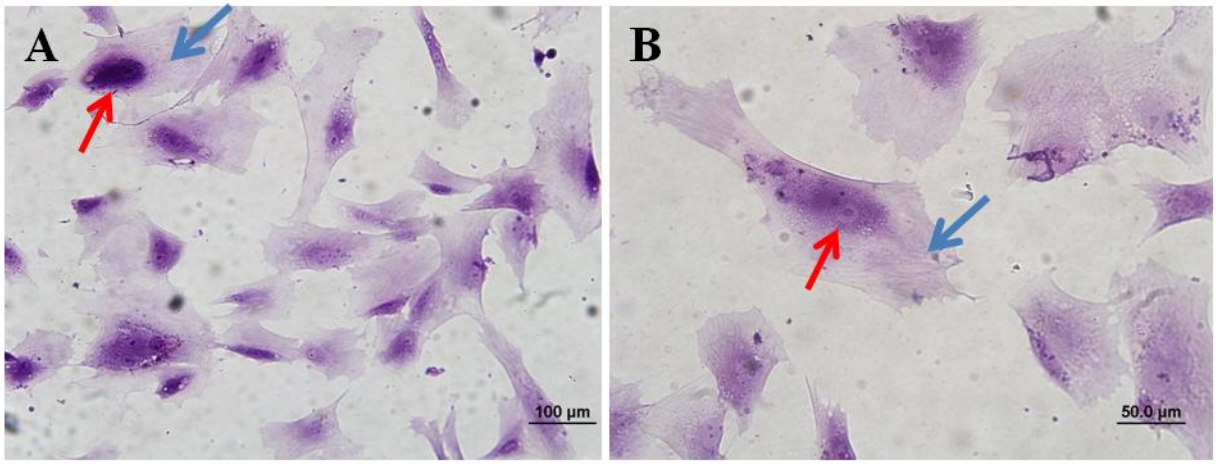
Figura 8 - Fotomicrografia da coloração de hematoxilina-eosina das células de saco vitelino de fetos caninos, 40d



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Aumento 200x e B) 400x. Seta vermelha indica núcleo e a seta azul indica o citoplasma.

Na figura 9A e B também foi possível observar o formato fibroblastóide com núcleo grande e o mesmo aspecto regular do contorno dessas células, além da elevada confluência.

Figura 9 - Fotomicrografia da coloração de hematoxilina-eosina das células de saco vitelino de fetos caninos, 50d



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Aumento 200x e B) 400x. Seta vermelha indica núcleo e seta azul indica citoplasma.

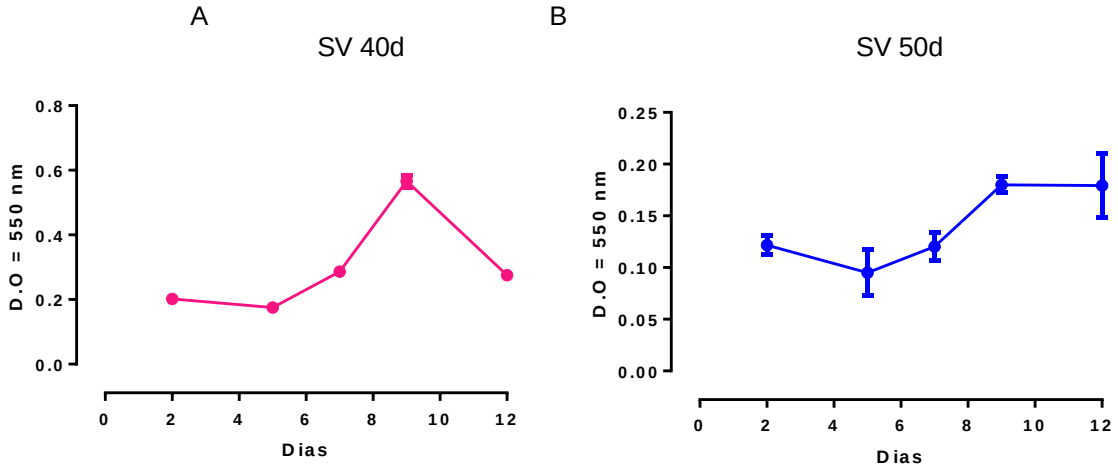
5.3.2 Caracterização celular

A caracterização celular das células-tronco do saco vitelino de cães, com idades gestacionais de 40 e 50 dias, foi feita através de ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT e análise imunocitoquímica das células-tronco de saco vitelino.

5.3.2.1 Ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT

As células-tronco de saco vitelino, 40d e 50d foram submetidas aos ensaios de MTT para averiguar o potencial de crescimento celular. Através destes experimentos pudemos observar um bom potencial de crescimento celular para ambas as células, como podem ser visto nos gráficos 1A e B. Nota-se que as células têm um crescimento nos primeiros dias de cultivo e que, com o passar dos dias, esse crescimento vai diminuindo como era esperado, embora as células 50d permanecem num estado estável de crescimento diferentemente da 40d.

Gráfico 1 - Análise da proliferação celular pelo método colorimétrico MTT das células-tronco do saco vitelino, 40d e 50d

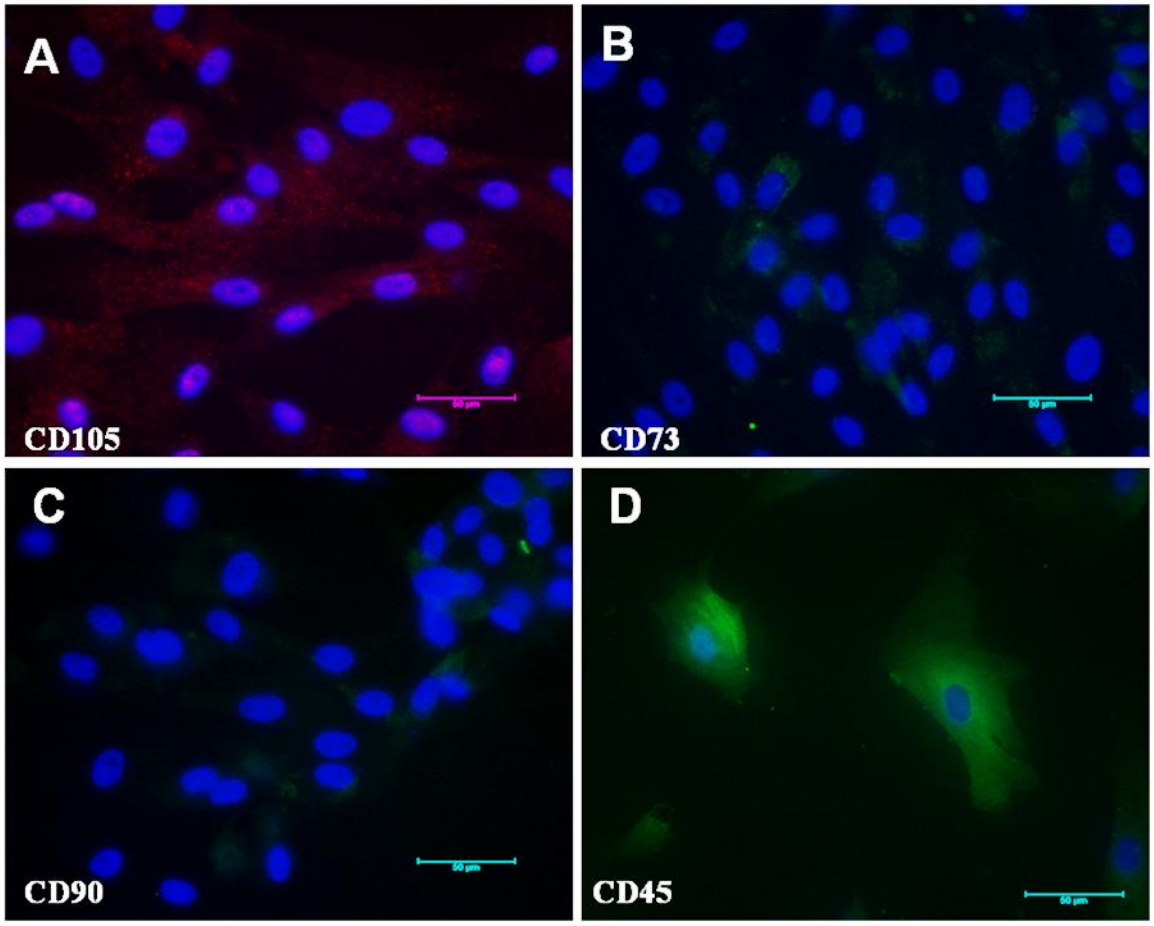


Fonte: (PIGNATARI et al.,, 2012)
Legenda: A) Células 40d. B) Células 50d.

5.3.2.2 Análise imunocitoquímica das células-tronco de saco vitelino

As análises imunocitoquímicas utilizando um painel de anticorpos foram realizadas nas células 40d e 50d a fim de avaliar se essas células expressam proteínas típicas de células-tronco mesenquimais. Na figura 10 temos os resultados referentes às células-tronco do saco vitelino de 40d, onde observamos que houve expressão dos marcadores de células-tronco mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) como era esperado. Observamos também a expressão de CD45, que é um marcador de células hematopoiéticas e que não são expressos em células-tronco mesenquimais.

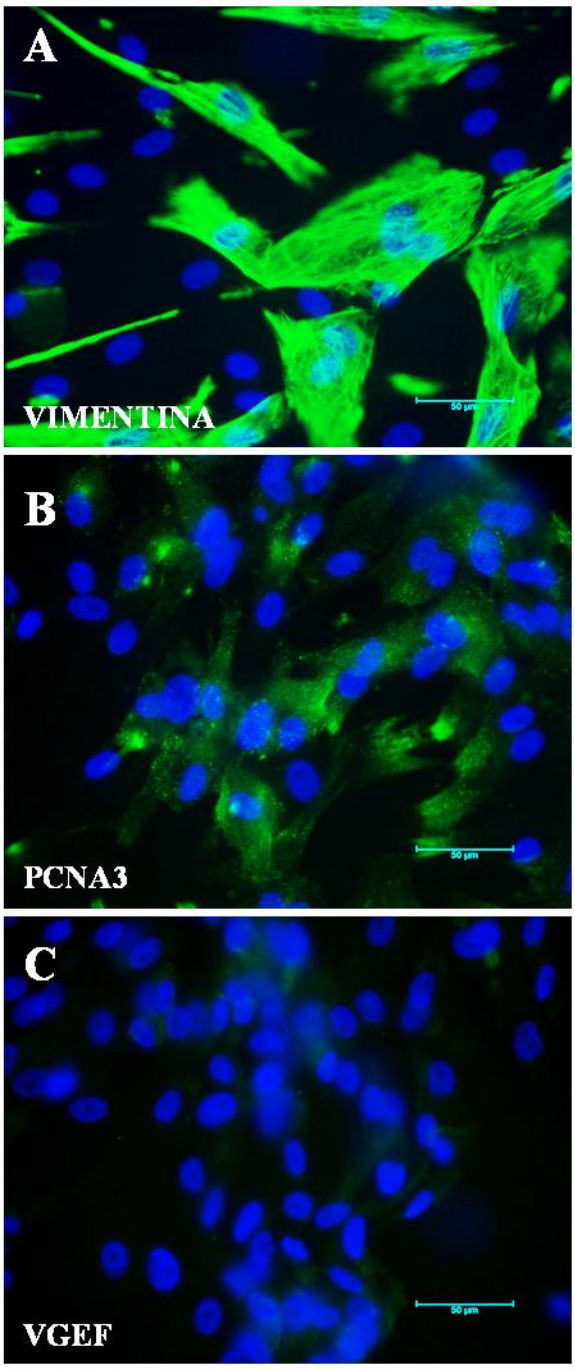
Figura 10 – Análise da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais (CD73, CD90 e CD105) e o marcador hematopoiético (CD45) nas células-tronco de saco vitelino 40d



Fonte: (LIMA, S..A..F, 2012)
Legenda: Células-tronco de saco vitelino, 40d foram fixadas em paraformaldeído a 4%, bloqueadas em PBS contendo 2% de BSA e os anticorpos anti- CD105, anti-CD73, anti-CD90 e anti-CD45 foram adicionados. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado ao Texas Red (A) e FITC (B,C,D), os núcleos foram corado com DAPI, e os respectivas sobreposições foram montados, e exibidos em aumento de 400X. A) CD105; B) CD73; C) CD90 e D) CD45.

A figura 11 apresenta ainda os resultados obtidos com as células de 40d utilizando os seguintes marcadores vimentina, PCNA3 e VEGF. Na figura 9A observamos a expressão de Vimentina que é uma proteína do citoesqueleto como era esperado. Houve também a expressão de PCNA3 que indica a proliferação celular, uma vez que estas células se encontravam em intensa proliferação. Entretanto, não observamos a expressão de VGEF comumente expresso em células do saco vitelino.

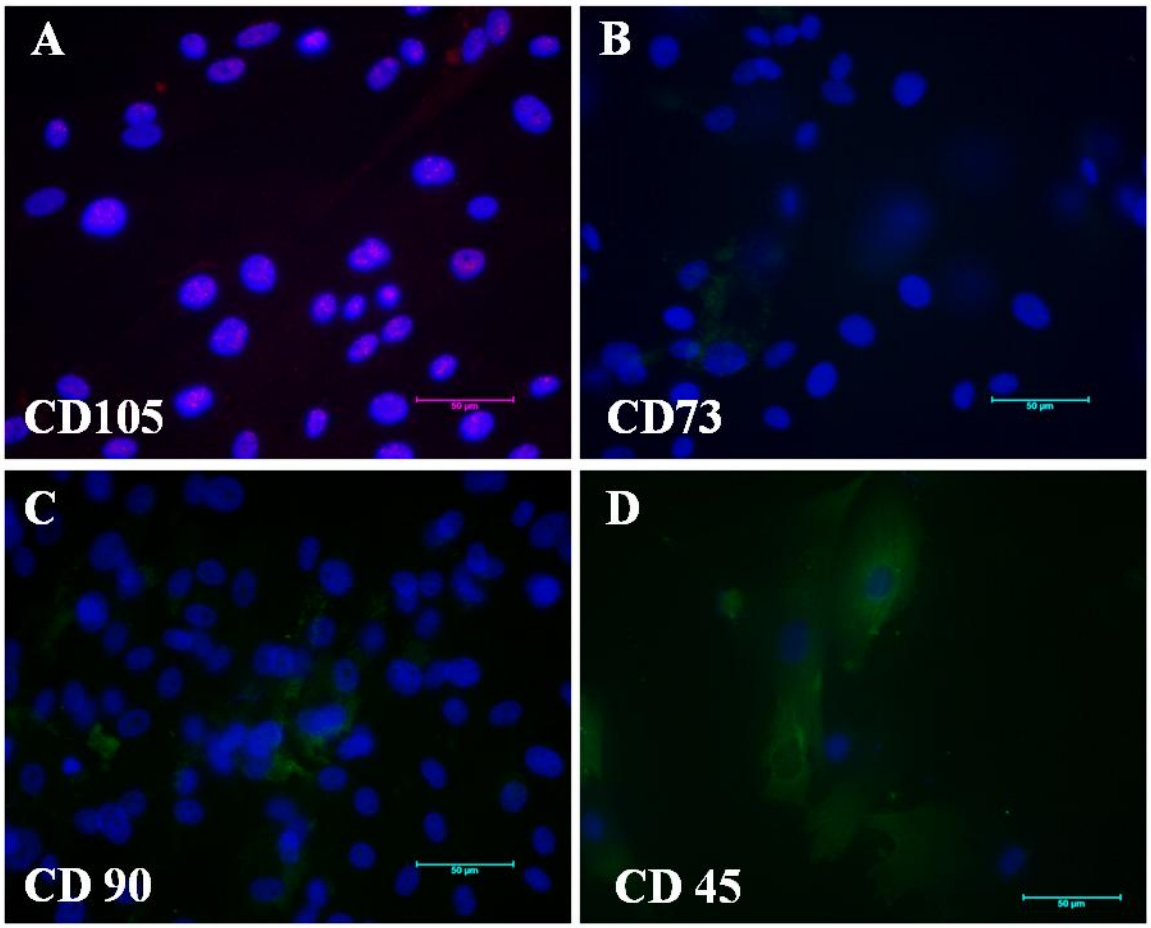
Figura 11 – Análise da expressão de vimentina, PCNA3 e VEGF nas células-tronco de saco vitelino de 40d de gestação



Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda: Células-tronco de saco vitelino, 40 d foram fixadas em paraformaldeído a 4%, bloqueadas em PBS contendo 2% de BSA e os anticorpos anti-vimentina, anti-PCNA3, anti-VEGF foram adicionados. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado ao FITC e os núcleos foram corado com DAPI, e as respectivas sobreposições foram montados, e exibidos em aumento de 400X. A) vimentina; B) PCNA3; C) VEGF.

Realizamos os mesmos painéis de anticorpos para a realização do ensaio imunocitoquímico das células-tronco provenientes do saco vitelino de 50d, observamos a expressão de CD73, CD90 e CD105, sendo este último aparentemente menos expresso que nas células 40d. Como nas células 40d também houve expressão de CD45 (Figura 12).

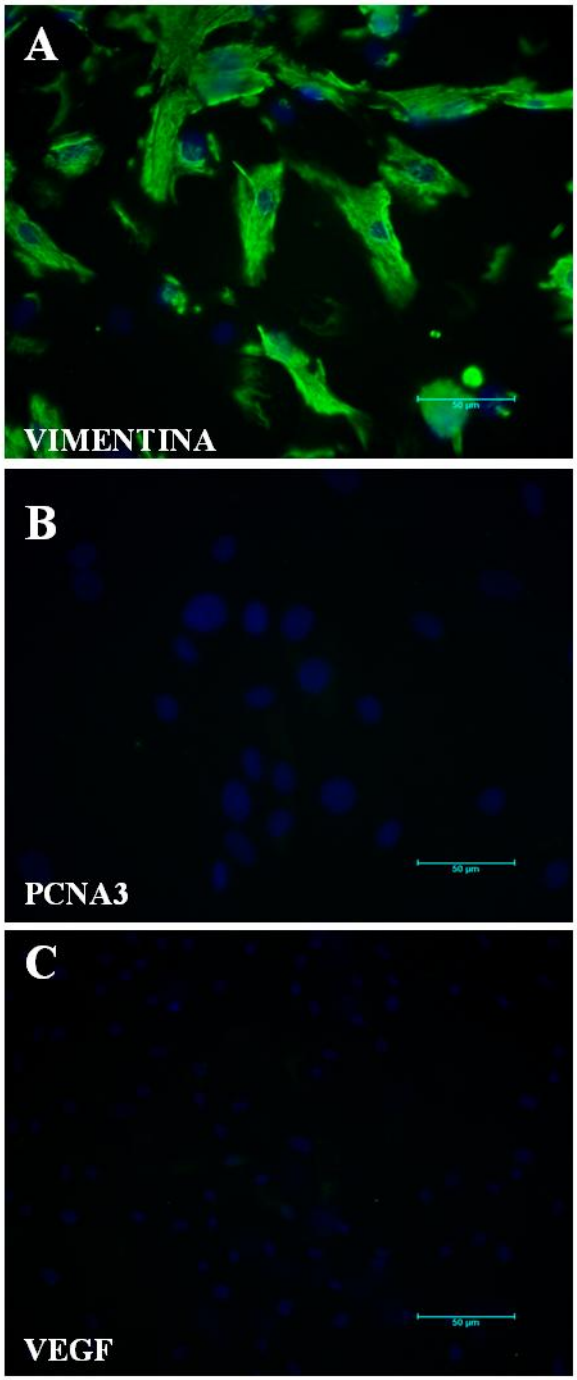
Figura 12 – Análise da expressão de CD45, CD73, CD90 e CD105 nas células-tronco de saco vitelino de 50d de gestação



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: Células-tronco de saco vitelino, 50d foram fixadas em paraformaldeído a 4%, bloqueadas em PBS contendo 2% de BSA e os anticorpos anti- CD105, anti-CD73, anti-CD90 e anti-CD45 foram adicionados. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado ao Texas Red (A) e FITC (B,C,D), os núcleos foram corado com DAPI, e os respectivas sobreposições foram montados, e exibidos em aumento de 400X. A) CD105; B)CD73; C) CD90 e D) CD45.

Nas células de 50d, observamos a expressão de vimentina como era esperado (Figura 13A), leve expressão de PCNA3 (Figura 13B) e de VEGF (Figura 13C).

Figura 13 – Análise da expressão de VIMENTINA, VEGF e PCNA nas células-tronco de saco vitelino de 50d de gestação



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: Células-tronco de saco vitelino, 50d foram fixadas em paraformaldeído a 4%, bloqueadas em PBS contendo 2% de BSA e os anticorpos anti-vimentina, anti-PCNA3, anti-VEGF foram adicionados. A imunoreatividade foi revelada pelo anticorpo ligado ao FITC e os núcleos foram corado com DAPI, e as respectivas sobreposições foram montados, e exibidos em aumento de 400X. A) vimentina; B) PCNA3; C) VEGF.

5.3.3 Caracterização funcional

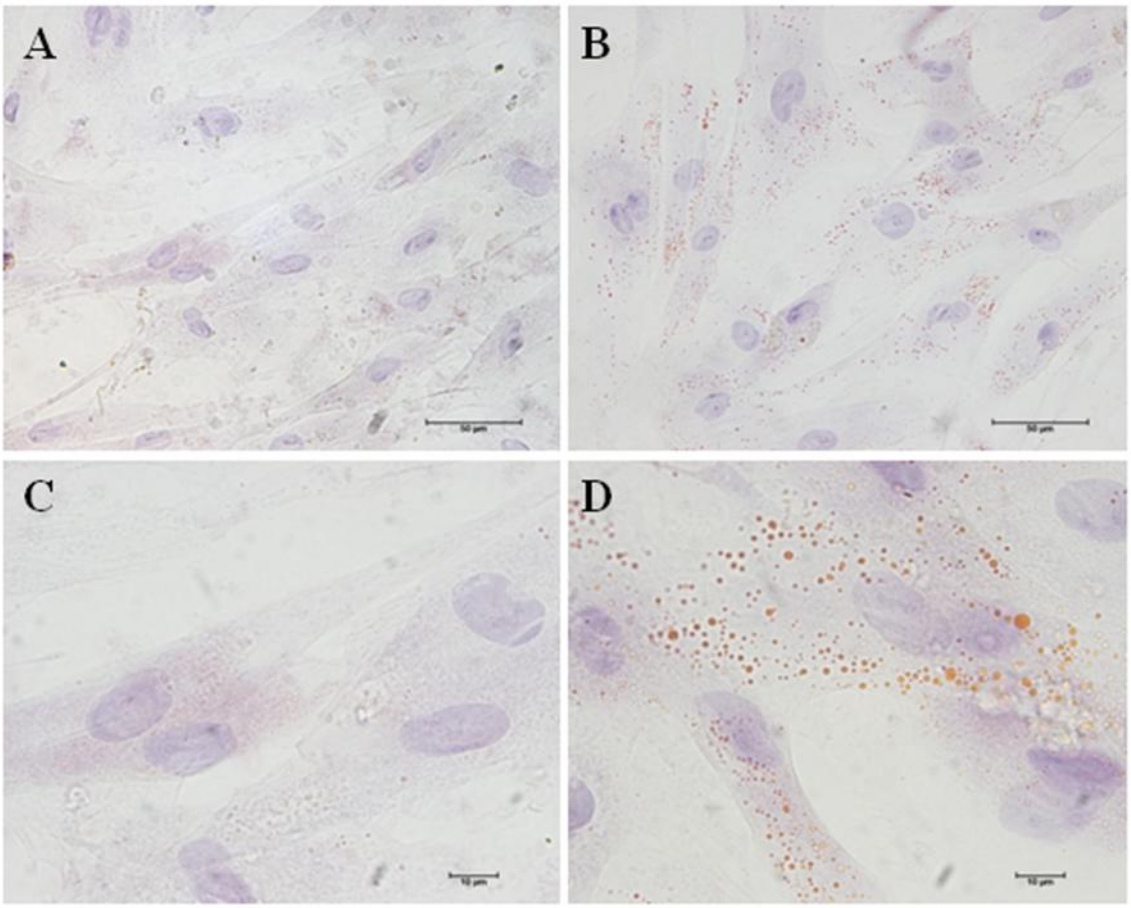
A caracterização funcional das células-tronco do saco vitelino foi feita através de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.

5.3.3.1 Diferenciações adipogênica e osteogênica

As células derivadas do saco vitelino de 40d e 50d foram submetidas à diferenciação em adipócitos e osteócitos por cultivo em meios específicos.

Conforme a figura 14 conseguimos observar que nas células-tronco de saco vitelino de 40d houve a diferenciação em adipócitos, pois encontramos a presença de vacúolos de gordura indicando sua diferenciação em células de linhagem adipogênica após a adição de indutores descritos nos materiais e métodos. Nas Figuras 14A e C temos o controle, ou seja, células sem o meio de indução, no aumento de 40x e 100x respectivamente e na figura 14B e D temos o teste, ou seja, células com meio adicionado de indutores adipogênicos.

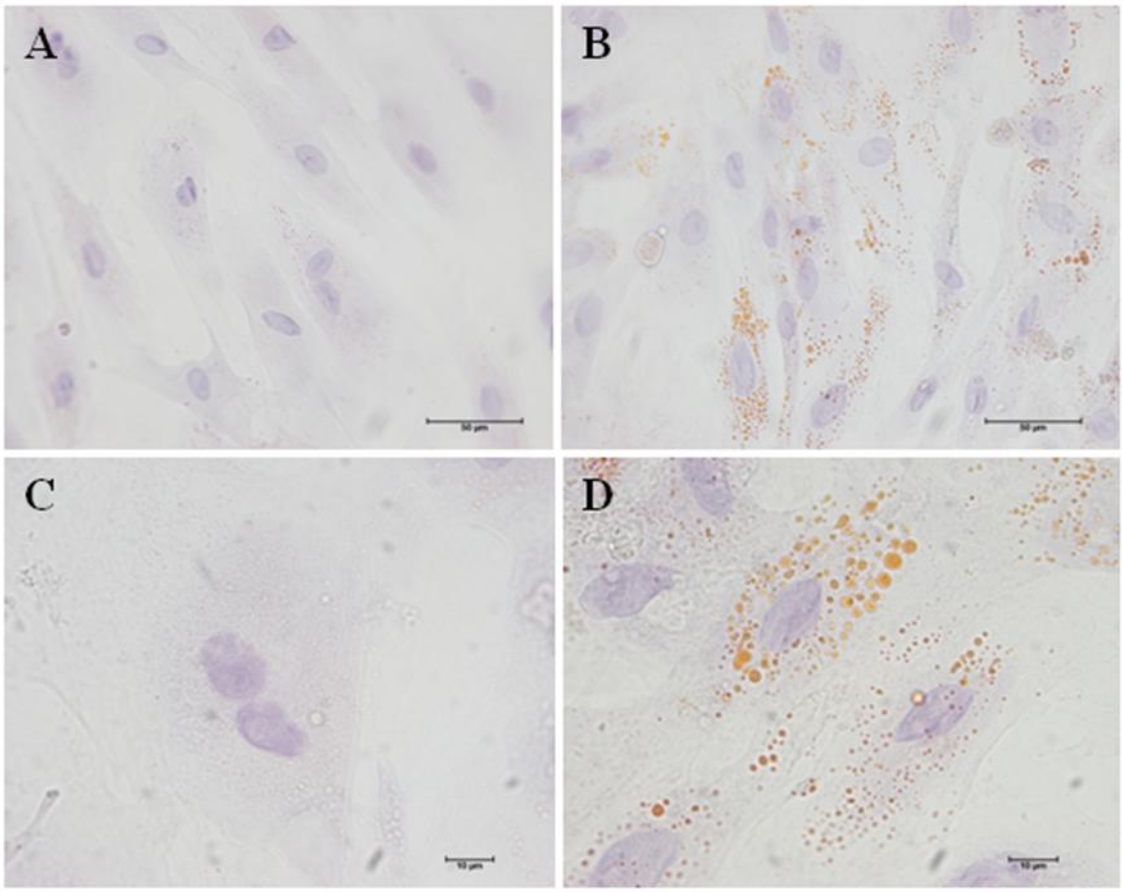
Figura 14 - Diferenciação das células-tronco de saco vitelino de 40d em adipócitos



Fonte: (PIGNATARI et al., 2012)
Legenda - Diferenciação adipogênica das células-tronco de saco vitelino de fetos de 40d. A,C) Controle; B,D) Teste. A B) Aumento 40x; C,D) 100x

Nas figuras 15A e C temos o controle no aumento de 40x e 100x respectivamente e na figura 15B e D, as células diferenciadas em adipócitos. Nota-se que tanto em 40d quanto em 50d houve a diferenciação adipogênica.

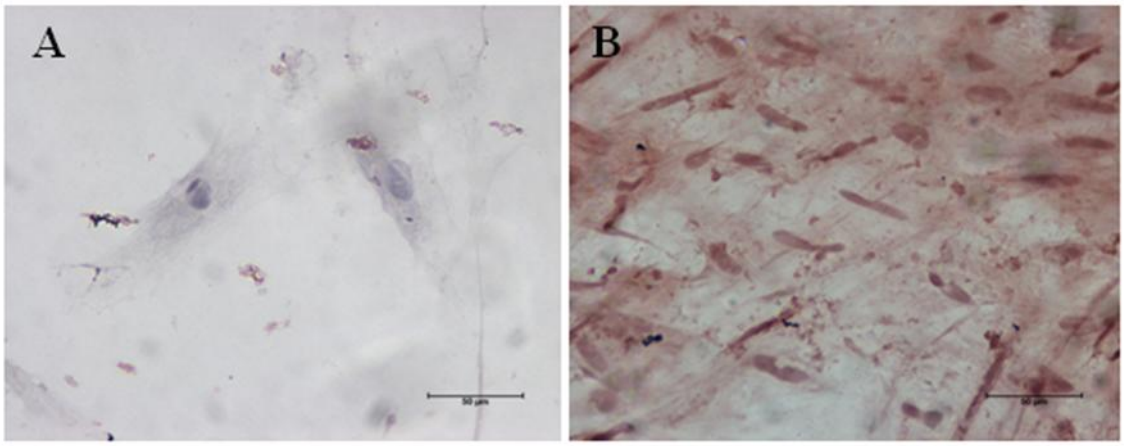
Figura 15 – Diferenciação das células-tronco de saco vitelino de 50d em adipócitos



Fonte: (PIGNATARI et al., 2012)
Legenda - Diferenciação adipogênica das células-tronco de saco vitelino de fetos de 40d. A,C) Controle; B,D) Teste. A B) Aumento 40x; C,D) 100x

Na figura 16 pudemos notar que houve diferenciação osteogênica no saco vitelino de 40d. Observe na figura 16A, o controle dessas células sem o meio indutor osteogênico mostrando a morfologia regular das células e na 14B pouquíssima deposição de matriz.

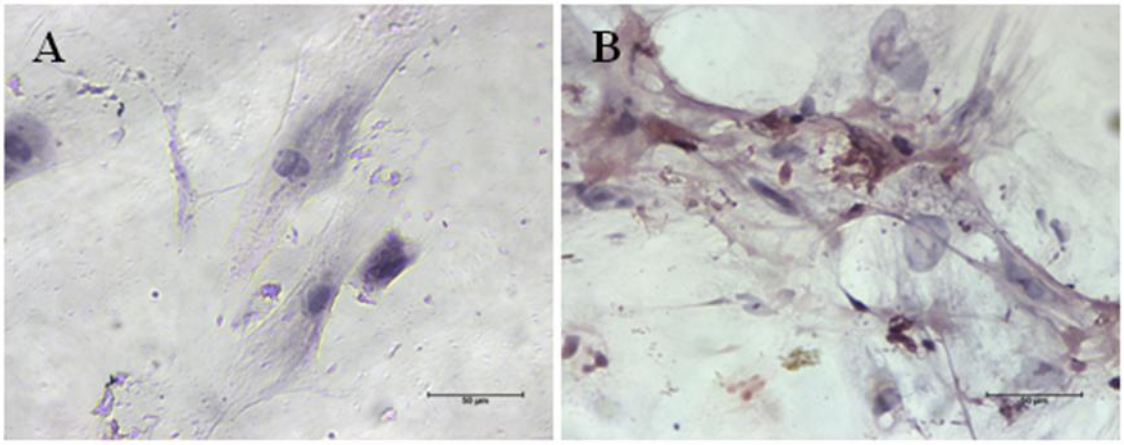
Figura16 - Diferenciação das células-tronco de saco vitelino de 40d em osteócitos



Fonte: (PIGNATARI et al., 2012)
Legenda - A) Controle; B) Teste. Aumento de 40x.

Na figura 17 apresentamos os resultados referentes as células-tronco de saco vitelino 50d, onde em 17A temos o controle e em 17B, as células submetidas ao protocolo de diferenciação onde também observamos pouquíssima deposição de matriz como nas células 40d.

Figura 17- Diferenciação das células-tronco de saco vitelino de 50d em osteócitos



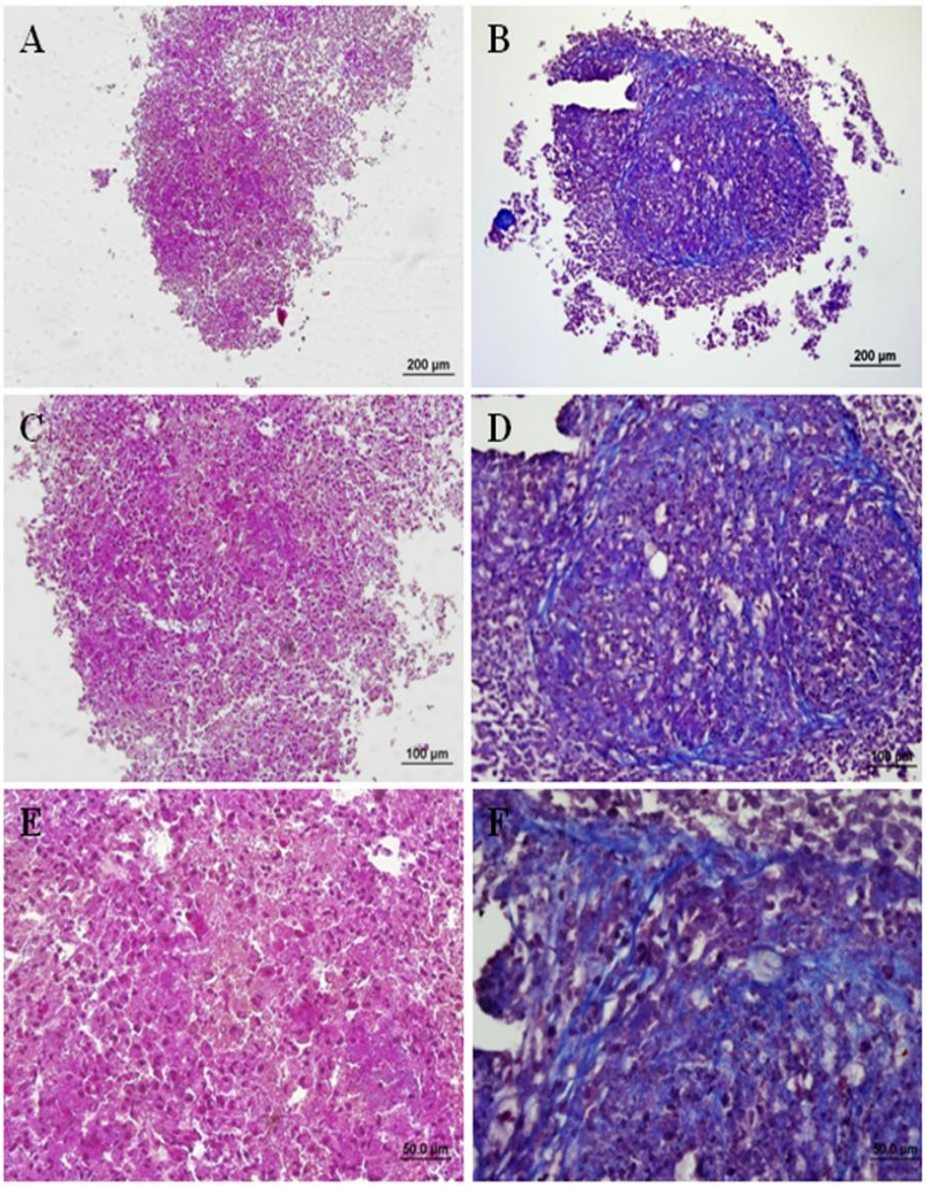
Fonte: (PIGNATARI et al., 2012)
Legenda: A) Controle; B) Teste. Aumento de 40x.

5.2.3.2 Diferenciação Condrogênica

Foi realizada a diferenciação condrogênica das células-tronco de saco vitelino de 40d e 50d. Em ambos os testes, houve a formação da esfera na qual emblocamos para a análise histológica. Já nos controles não foi observada formação esférica do botão celular. Convém ressaltar que, infelizmente, durante o processamento o material proveniente das células 50d foi perdido. Dessa forma não poderemos dizer se houve ou não diferenciação.

Na figura 18A, C e E mostramos os controles das células-tronco de saco vitelino de 40d, sem o meio indutor de diferenciação. Enquanto que, na figura 18B,D e F mostramos a diferenciação dessas células em condrócitos utilizando meio indutor.

Figura 18 - Diferenciação das células-tronco de saco vitelino de 40d em condrócitos.



Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda: A, C, E) Controle; B, D e F) Células-tronco de saco vitelino 40d submetidas a diferenciação condrogência. Observe que as células se diferenciaram em condrócitos. A,B) Aumento de 100x; C, D) 200x;. E, F) 400x.

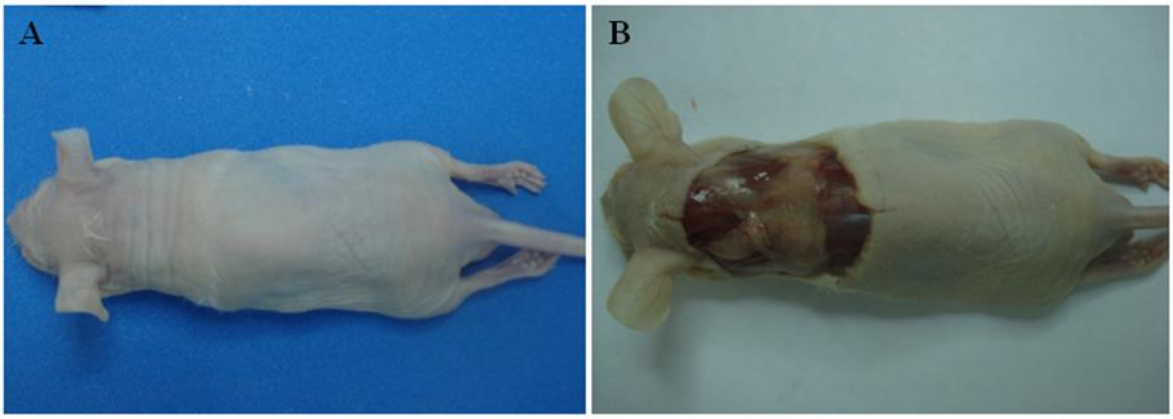
5.4 ANÁLISE DO POTENCIAL CARCINOGÊNICO DAS CÉLULAS-TRONCO DO SACO VITELINO DE CÃES

Os camundongos imunossuprimidos nudes foram utilizados para avaliação do potencial carcinogênico das células-tronco de saco vitelino.

Na figura 19A mostramos o camundongo nude após a eutanásia, sem alterações visíveis na região da nuca (local do inoculo) e na 19B, o animal após dissecação onde também não foi possível observar formação tumoral.

Além disso, foi realizada a abertura do abdômen para analisar se a posição dos órgãos estaria alterada, pois quando um dos órgãos possui um tumor grande ou esteja de tamanho aumentado devido alguma alteração em sua função (exemplo, hepatomegalia), o órgão pode empurrar os demais e com isso, mudaria a posição normal, o que não ocorreu. Além disso, com a abertura foi possível a retirada dos órgãos para análise histológica.

Figura 19 - Análise macroscópica dos camundongos imunossuprimidos, nude após injeção de células-tronco de saco vitelino, 40d antes e após dissecação

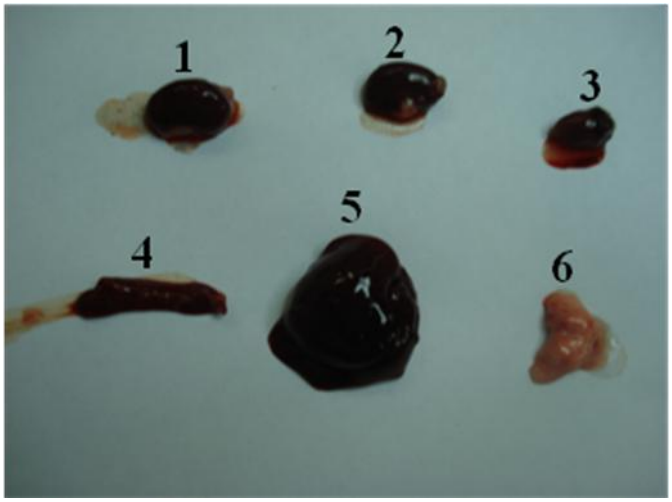


Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Análise macroscópica da região cervical. B) Análise macroscópica da região cervical após dissecação.

Como dito anteriormente os órgãos dos camundongos foram coletados e mostramos na figura 20, os órgão coletados sendo eles: rins (Figura 20 - 1,2),

coração (3), pâncreas (4), fígado (5) e pulmão (6), onde nenhuma alteração macroscópica em relação ao tamanho e a textura puderam ser observadas.

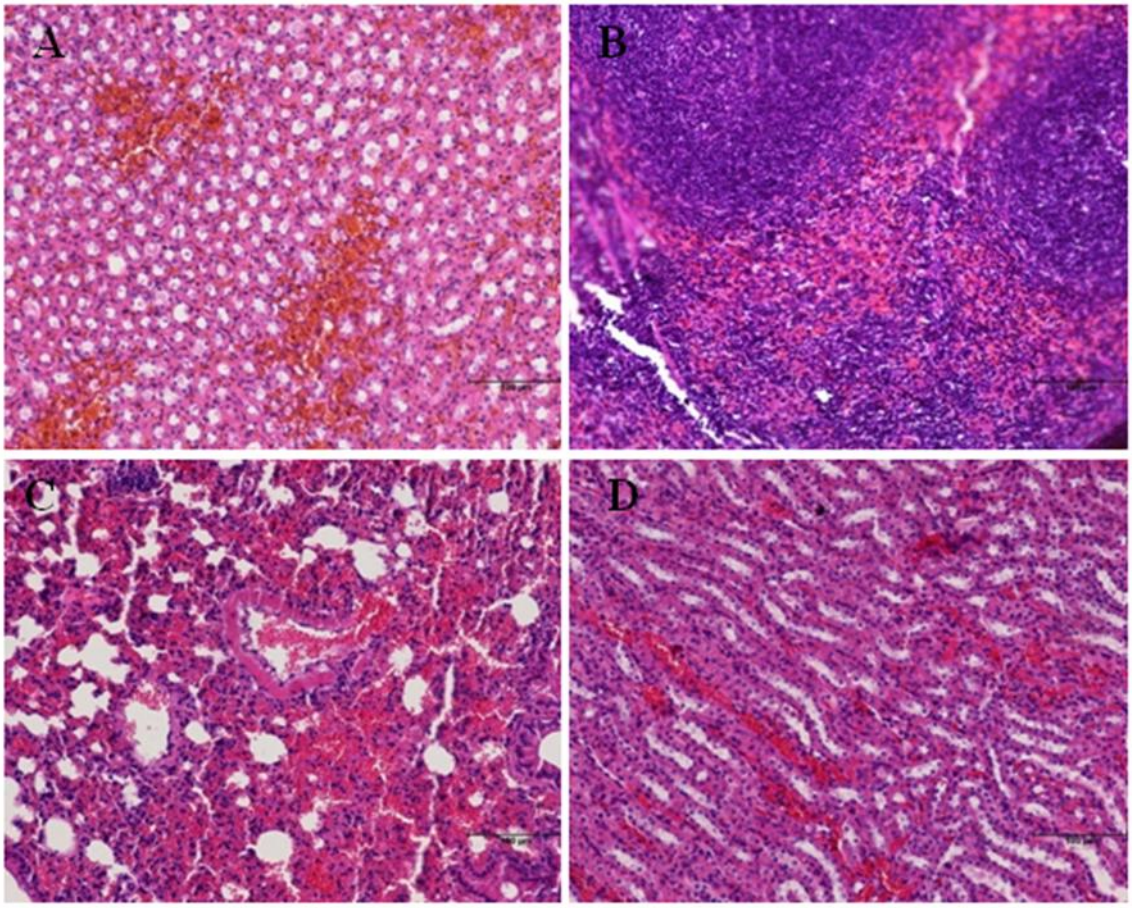
Figura 20 - Análise macroscópica dos órgãos após eutanásia e dissecação dos camundongos imunossuprimidos com células-tronco de saco vitelinode 40d após 60 dias da injeção



Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda: 1-2) Rim, 3)Coração, 4) Pâncreas, 5)Fígado, 6) Pulmão

A análise microscópica dos órgãos: fígado, pâncreas, pulmão e rim do camundongo após inóculo das células 40d não revelou alterações morfológicas, como era esperado, uma vez que não houve formação tumoral (Figura 21).

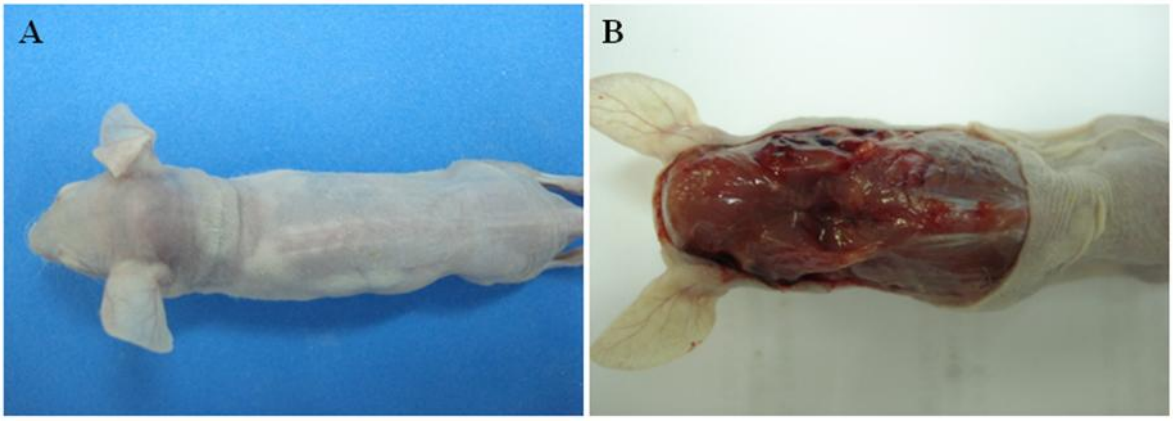
Figura 21 - Fotomicrografia da análise histológica dos órgãos fígado, pâncreas, pulmão e rim dos camundongos nudes injetados com células 40d e após 60 dias da injeção



Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda: A) Fígado. B) Pâncreas. C) Pulmão. D) Rim. A-D) Aumento de 200x

O mesmo procedimento foi realizado nos animais de 50 dias e também não observamos alterações visíveis na nuca como nota-se na figura 22 A e B, antes e após dissecação.

Figura 22 - Análise macroscópica dos camundongos imunossuprimidos, nude após injeção de células-tronco de saco vitelino, 50d antes e após dissecação



Fonte: (LIMA, S. A. F, 2012)
Legenda: A) Análise macroscópica da região cervical;. B) Análise macroscópica da região cervical após dissecação.

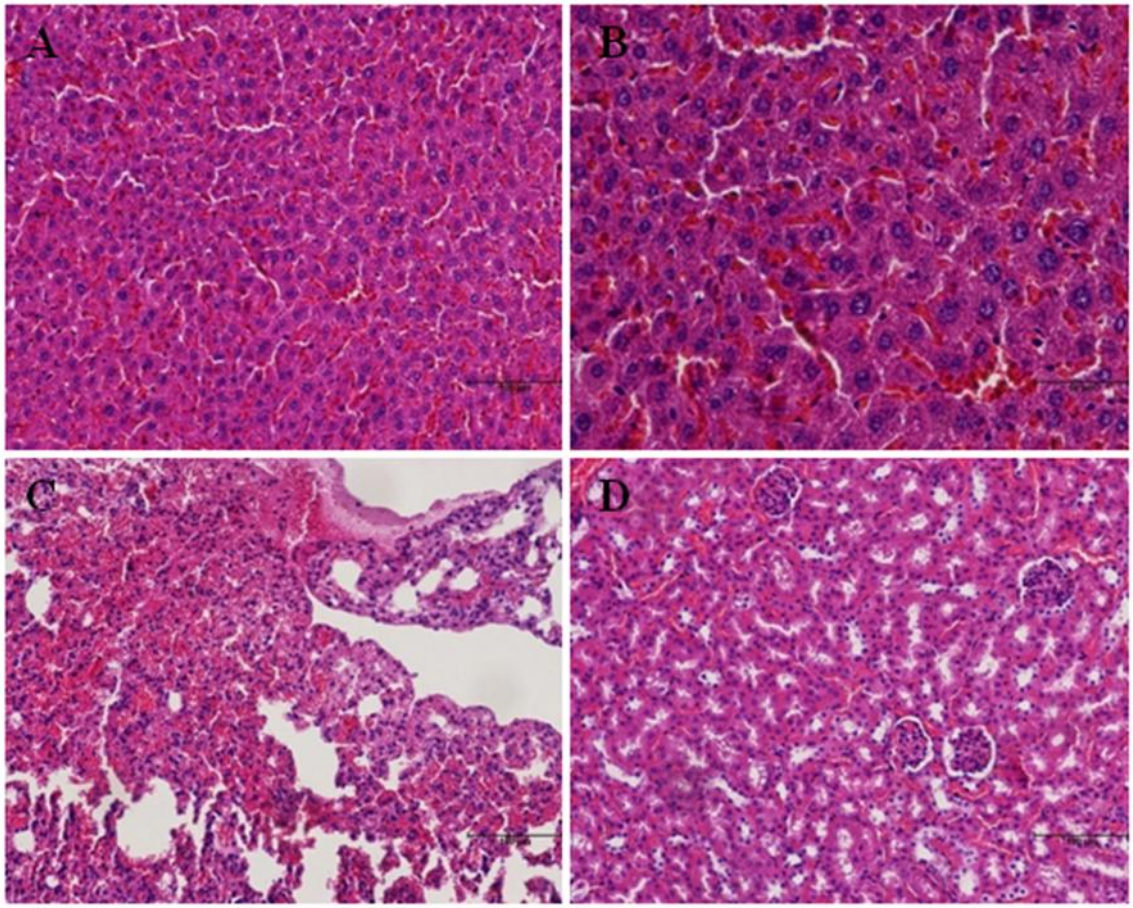
Com a abertura do abdômen do camundongo nude de 50d, notou-se que também não houve alterações da posição normal dos órgãos. Após essa análise, os órgãos foram removidos e podem ser observados na figura 23. Observe nesta figura que nenhuma alteração macroscópica em relação ao tamanho e textura foi encontrada nos seguintes órgãos: 1) Pâncreas, 2 e 5) Rim, 3) Coração, 4) Fígado, 6) Pulmão.

Figura 23 - Análise macroscópica dos órgãos após eutanásia e dissecação dos camundongos imunossuprimidos com células-tronco de saco vitelino de 50d e 60 dias após da injeção

Fonte: (LIMA, S. A. F., 2012)
Legenda : 1) Pâncreas, 2 e 5) Rim, 3) Coração, 4) Fígado, 6) Pulmão

Na figura 24, temos o resultado das análises histológicas do fígado, pâncreas, pulmão e rim mostrando que nenhuma alteração foi encontrada nesses órgãos.

Figura 24 - Fotomicrografia da análise histológica dos órgãos fígado, pâncreas, pulmão e rim dos camundongos nudes injetados com células 50d e após 60 dias da injeção

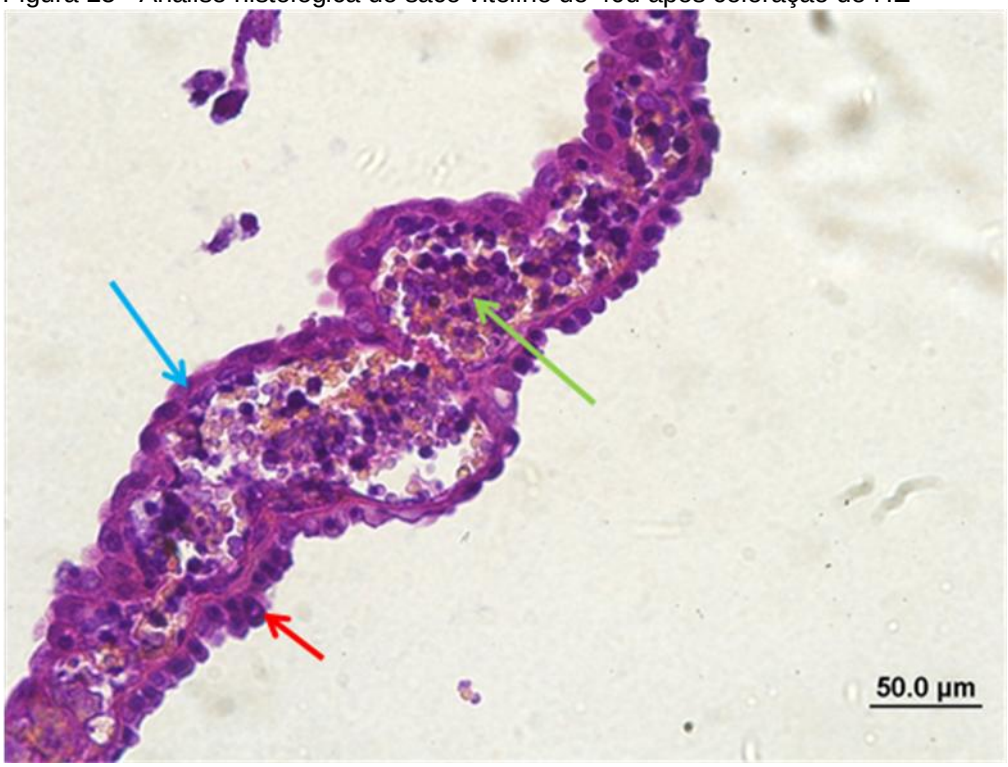


Fonte: (Lima, S. A. F, 2012)
Legenda:A) Fígado. B) Pâncreas. C) Pulmão. D) Rim. A-D) Aumento de 10x

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO SACO VITELINO

A análise histológica do saco vitelino de 40d foi realizada e o resultado após coloração de HE pode ser visualizado na figura 25. Observe, a presença de endotélio (seta azul), mesotélio (seta vermelha) e ilhas de eritroblasto (seta verde), como esperado.

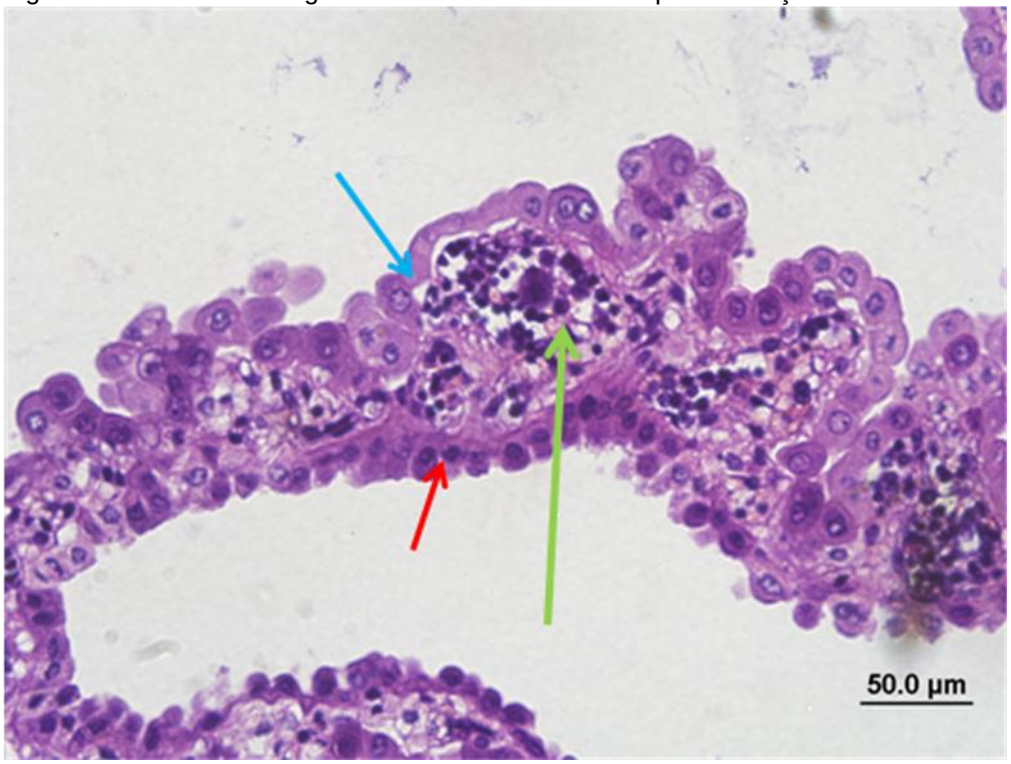
Figura 25 - Análise histológica do saco vitelino de 40d após coloração de HE



Fonte: (Lima, S. A. F., 2012)
Legenda: Saco vitelino de 40d. Seta vermelha indica mesotélio. Seta Azul indica endotélio. Seta verde indica ilha de eritroblastos. Aumento de 400x

Na figura 26, temos a análise histológica do saco vitelino de 50d na qual também podemos observar a presença de endotélio (seta azul), mesotélio (seta vermelha) e ilhas de eritroblasto (seta verde).

Figura 26- Análise histológica do saco vitelino de 50d após coloração de HE



Fonte: (Lima, S. A. F., 2012)
Legenda: Saco vitelino de 50d. Seta vermelha indica mesotélio. Seta Azul indica endotélio. Seta verde indica ilha de eritroblasto. Aumento de 400x

6 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados nesse trabalho, as células obtidas de saco vitelino de fetos de cães apresentaram características de células-tronco mesenquimais. Além disso, nossos resultados estão sendo condizentes com a literatura e com os experimentos anteriores do nosso grupo, que vem estudando a espécie canina e espécies de mamíferos, com protocolos diferentes, mostrando que *in vitro* essas células apresentam morfologia característica de células mesenquimais, boa plasticidade e diferenciação em linhagens de células adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas (WENCESLAU et al., 2011; FAVARON, 2012; FRANCIOLLI, 2012). Uma característica interessante dessas células é que não apresentam formação tumoral, o que as inviabilizaria como candidatas a terapia celular (WENCESLAU et al., 2011; FAVARON, 2012; FRANCIOLLI, 2012).

Neste trabalho conseguimos estabelecer novas culturas de células-tronco provenientes do saco vitelino de fetos caninos, utilizando o método por digestão enzimática por colagenase I em diferentes períodos gestacionais. Em pesquisas anteriores, o nosso grupo utilizava protocolos com explante no lugar da digestão enzimática com colagenase (WENCESLAU et al., 2011; FAVARON, 2012; FRANCIOLLI, 2012). Além disso, com este trabalho, pudemos observar uma grande eficiência na obtenção de um grande número de células, sugerindo que o método de obtenção de células usando colagenase I pode ser mais eficaz do que a cultura por explante, entretanto, esses dados precisam ser melhor investigados. No início da cultura é possível notar a presença de dois tipos celulares, sendo um com morfologia epitelial e outro fibroblastóide. Porém, é visível que tanto as células de 40d quanto as de 50d, com o passar dos dias, das trocas de meio e das tripsinizações, as células com formato epitelial começam a morrer e só sobram as fibroblastóides, que continuam crescendo bem e sobrevivendo a muitas passagens (tripsinizações). Isso é condizente com a literatura, na qual também encontraram esses dois tipos celulares quando utilizada a técnica de explante (WENCESLAU et al., 2011).

As CTMs são células-tronco não-hematopoiéticas multipotentes que aderem a placas de cultura, assemelham a fibroblastos *in vitro*, e formam colônias (BRUDER,

1998) e através das colorações de Azul de Toluidina e Hematoxilina-Eoxina, podemos visualizar melhor ao microscópio as características das células-tronco do saco vitelino e vimos que tem a mesma morfologia descrita na literatura.

Através do ensaio de proliferação celular pelo método colorimétrico de MTT, podemos observar um bom potencial de crescimento celular nas duas idades gestacionais, porém com o passar do tempo esse crescimento vai diminuindo, mas isso já era de se esperar, pois é um perfil característico de células-tronco um pico de crescimento com diminuição após as passagens.

Notamos que essas células possuem um bom potencial de criopreservação pois quando descongelamos estas células mantiveram boa aderência e rápida amplificação, fator importante quando se pensa em utilizar estas células na Medicina Regenerativa.

Além disso, observamos que tanto nas células de 40 dias como nas de 50 dias, houve expressão dos marcadores de células-tronco mesenquimais (CD73, CD90 e CD105), sendo que o CD105 foi menos expresso na de 40 dias. Observamos também em ambas as idades, a expressão de CD45 que é um marcador de células hematopoiéticas e que não são expressos em células-tronco mesenquimais. Porém, provavelmente foram expressas nessas células, pois esses marcadores também são encontrados no endotélio das células.

Observamos a expressão de vimentina nas duas idades gestacionais. Esse marcador deve sempre ser expresso, visto que é uma proteína de citoesqueleto, sendo usada apenas como controle da reação. Essas variações na expressão podem ser explicadas de acordo com a idade gestacional do embrião e o momento de diferenciação celular das células do saco vitelino, ou melhor, para que tipo celular elas deveriam se diferenciar em um dado momento gestacional, sendo na nossa hipótese correlacionado com a vasculogênese e a hematopoiese canina, sendo esses dados ainda pouco conhecidos.

Houve boa expressão de PCNA3, que indica a proliferação celular, nas de 40 dias, uma vez que estas células se encontravam em intensa proliferação. Porém foi muito baixa na de 50 dias, apesar das células estarem amplificando rapidamente. Entretanto, a suposta marcação baixa pode ser devido o uso de anticorpos humanos. Neste experimento, os únicos anticorpos de cães era o CD90 e o CD45.

As células de 40 dias não expressaram o VGEF comumente expresso em células do saco vitelino e as de 50 dias expressaram muito sutilmente. O mesmo pode ser devido ao uso de marcadores não imunoespecíficos, ou devido à mudança de padrão na produção de células como dito anteriormente.

Como houve diferenciação celular em adipócitos, ostéocitos condrócitos podemos sugerir que estas células são células-tronco mesenquimais embora os experimentos de ostéocitos para ambos os cultivos deve ser refeito bem como o procedimento de diferenciação condrogênica para as células 50d uma vez que, este foi perdido.

Através das injeções dessas células nos camundongos imunossuprimidos nudes, sugerimos que essas células não são cancerígenas e podem servir para estudos pré-clínicos de doenças.

7 CONCLUSÕES

- As células-tronco 40d e 50d possuem características de células-tronco mesequimais.
- As células-tronco 40d e 50d não produzem tumores quando injetadas em camundongos nudes.
- Até o momento não foram observadas diferenças relevantes nessas duas idades gestacionais.
- O método de digestão enzimática com colagenase I parece ser mais eficiente que por explante utilizado anteriormente por outros autores.
- novos estudos deverão ser realizados para melhor investigar a expressão de marcadores celulares nas células de saco vitelino de cão.

REFERÊNCIAS

ALISON, M. R.; POULSOM, R.; JEFFERY, R. Y.; DHILLON, A. P.; QUAGLIA, A.; JACOB, J.; NOVELLI, M.; PRENTICE, G.; WILLIAMSON, J.; WRIGHT, N. A. Cell differentiation: Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. **Nature**, v. 406, p. 257, 2000.

ASAHARA, T.; KAWAMOTO, A. Review: Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 287, p. C572-C579, 2004.

ASSIS-NETO, A. C.; OLIVEIRA, F. D.; CONSTANTINO, M. V. P.; MIGLINO, M. A. Morphology and involution of the yolk sac during early gestation bovine (*bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 40, n. 4, p. 1076, 2012.

BADIAVAS, E. V.; ABEDI, M.; BUTMARC, J.; FALANGA, V.; QUESENBERRY, P. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 245-250, 2003.

BASSI, E. J.; AITA, C. A. M.; CÂMARA, N. O. S. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? **World Journal of Stem Cells,** v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.

BITTENCOURT, P. R. M.; RIGO, R.; FURTADO, V. P. Hematopoietic stem cell mobilization therapy for multiple sclerosis: Method and toxicity. **Neurology,** v. 66, p. A396-A397, 2006. Supplement, 2.

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

BRUDER S. P.; FOX B. S. Tissue Engineering of Bone - Cell Based Strategies. **Clinical Orthopaedics and Related Research,** v. 367S, p. S68-S83, 1998.

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

CONRAD, C.; HUSS, R. Adult Stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v. 124, p. 201-208, 2005.

CUI, H. G.; CHEN, Y. H.; LI, H. Y. Clinical effect of amniotic membrane transplantation for reconstruction of conjunctival sac combined with orbital implantation. **Zhonghua Yan Ke Za Zhi.,** v. 41, p. 1005-1008, 2005.

CUMANO, A., GODIN, I. Pluripotent hematopoietic stem cell development during embryogenesis. **Current opinion in immunology,** v. 13, p. 166-171, 2001.

DERUSSI, A. A. P.; LOPES, M. D. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial da cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 4, p. 231-237, 2009.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2007.

DUNTON, A.; AL-ALOUSI, L. A.; PRATTEN, M. K.; BECK, F. The giant yolk sac: a model for studying early placental transport. **Journal of Anatomy**, v. 145, p. 189-206, 1986.

ESKOLA, J. Cell transplantation into immunodeficient chicken embryos. Reconstituting capacity of cells from the yolk sac at different stages of development and from the liver, thymus, bursa of Fabricius, spleen and bone marrow of 15-day embryos. **Immunology,** v. 32, p. 467-474, 1977.

EVANS, H. E.; SACK, W. O. Prenatal development of domestic and laboratory mammals: growth curves, external features and selected references. **Zentralbl Veterinarmed C**., v. 2, n. 1, p. 11-45, 1973.

EVANS, M. J. Potential for genetic manipulation of mammalian, **Molecular Biology and Medicine,** v. 6, p. 557–565 ,1989.

FAVARON, P. O. **Placentação em *Necroms lasiurus* (Rodentia,Cricetidae, Sigmodontinae): características da eritrofagocitose, transporte placentário, inversão e versatilidade vitelina.** 2012. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FERRARI, G.; CUSELL-DE ANGELIS, G.; COLETTA, M. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors**. Science,** v. 279, p. 1528, 1998.

FRANCIOLLI, A. L. R. Medicina veterinária regenerativa: Multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelinico no modelo equinio. 2012. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

FRIEL, E.; SAR, S.; MEE, J. P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and singnalling. **Advanced Drug Delivered Reviews,** v. 57, p. 1894-1903, 2005.

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

GALDOS-RIVEROS, A. C.; REZENDE, L. C.; PESSOLATO, A. G. T.; MIGLINO, M. A. A relação biológica entre o saco vitelino e o embrião. **Enciclopédia biosfera,** v.6. n. 11, p. 1-13, 2010.

GARCIA, S. M. L.; JECKEL NETO, E.; FERNANDEZ, C. G. **Embriologia.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1991, 350 p.

HOLLANDS, P. Differentiation and grafting of haemopoietic stem cells from early post-implantation mouse embryos. **Development,** v. 99, p. 69-76, 1987.

INSAUSTI, C. L.; BLANQUER, M.; BLEDA, P.; INIESTA, P.; MAJADO, M. J.; CASTELLANOS, G.; MORALEDA, J. M. The amniotic membrane as a source of stem cell. **Histology and Histopathology,** v. 25, p. 91-98, 2010.

KALE, S.; KARIHALOO, A.; CLARK, P. R.; KASHGARIAN, M.; KRAUSE, D. S.; CANTLEY, L. G. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule*.* **Journal of Clinical Investigation***,* v. 112, p. 42-49, 2003.

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

LEE, S. Y.; ANDERSON, J. W., SCOTT, G. L.; MOSSMAN, H. W. Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog: II. The Yolk Sac. **The American Journal of Anatomy,** v. 166, p. 313-327, 1983.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental Clinic of Endocrinology**, v. 10, p. 122-134, 1994.

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

MADDOX-HYTTEL, P.; SINOWATS, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology.** New York: Elsevier Health Science, 2010. 472 p.

McGEADY, T. A.; QUINN, P. J.; FITZPATRICK, E. S.; RYAN, M. T. **Veterinary embryology**. Blackwell Publishing: Iowa, 2006. 377 p.

MEDVINSKY, A.; TAOUDI, S.; MENDES, S.; DZIERZAK, E. Analysis and manipulation of hematopoietic progenitor and stem cells from murine embryonic tissues. **Current protocols in stem cell biology**, 2008. chap. 2, unit 2a.6. Doi 10.1002/9780470151808.sc02a06s4.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA G. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science,** v. 290, p. 1779, 2000.

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

MIHU, C. M.; RUS CIUCA, D.; SORITAU, O.; SUŞMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Romanian Journal of Morphology and Embryology,** v. 50, p.7-73, 2009.

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

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem Cells**, v. 24, p. 2319-1245, 2006.

MINUTH, W. W.; TIEDEMANN, K. The pig yolk sac II. **Histochemistry,** v. 68, n. 2, p 147-158, 1980.

MOORE, K.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica.** São Paulo: Elsevier, 2008. 462 p.

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

O'DONOGHUE, K.; NICHOLAS M. FISK, N. M. Fetal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v**. 18, n. 6, p. 853–875, 2004

OKAMOTO, R.; YAJIMA, T.; YAMAZAKI, M. Damaged epithelia regenerate by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. **Nature Medicine**, v. 8, p. 1011, 2002.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D. M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infracted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-705, 2001.

PALIS, J.; YODER, M. Y. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. **Experimental Hematology,** v. 29, p. 927-936, 2001.

PAROLINI, O.; CARUSO, M. Review: Preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: Na update. **Placenta**, v. 25, p. S186-195, 2011. Supplement, 2.

PIGNATARI, G. C.; RUSSO, F. B.; WINCK C. P.; FERNANDES, I. R., DIAS, J. L. R. M.; SANTOS, J. F.; NASCIMENTO, N.; MIGLINO, M. A.; BRAGA, P. C. B. B. Analysis of hematopoietic and mesenchymal stem cell marker form mouse and dog yolk sac in differents gestational stages. In: BRAZILIAN CONGRESS ON STEM CELLS AND CELL THERAPY, 7., 2012, São Paulo.

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

RÜSSE, I.; SINOWATZ, F.; RICHTER, L.; LEHMANN, M.; SCHALLENBERGER, E. The development of the yolk sac in ruminants (sheep and cattle). **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 21, n. 4, p. 324-47, 1992.

SANTOS, H. S.; AZOUBEL, R. **Embriologia comparada.** Jaboticabal. Funep, 1996, 188 p.

SEMEDO, P.; COSTA, M. C.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; SHIMIZU, M. H. M.; SEGURO, A. C.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Papel imunossupressor e remodelador das células-tronco mesenquimais em um modelo experimental de doençarenal crônica. **Einstein,** v. 7, n. 4, pt. 1, p. 469-479, 2009.

TIEDEMANN, K. On the yolk sac of the cat. Endoderm and mesothelium. **Cell Tissue Research**, v. 173, p. 109-127, 1976.

TZAKIS, A.; RICORDI, C.; ALEJANDRO, R,; ZENG, Y.; FUNG, J.; TODO, S.; DEMETRIS, A.; MINTZ, D.; STARZL, T. Pancreatic islet transplantation after upper abdominal exenteration and liver replacement. **Lancet**, v. 336, n. 8712, p. 402-405. 1990

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

WANG, X. Y.; LAN, Y.; HE, W. Y.; ZHANG, L.; YAO, H. Y.; HOU, C. M.; TONG, Y.; LIU, Y. L.; YANG, G.; LIU, X. D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**, v. 15, p. 2436-2443. 2008.

WENCESLAU, C. V.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D.; AMBRÓSIO, C. E.; LIZIER, N. F.; PIGNATARI, G. C.; KERKIS, I. Mesenchymal progenitor cells from canine fetal tissues: yolk sac, liver and bone marrow. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, p. 2165-2176, 2011.

WILPSHAAR, J.; BHATIA, M.; KANHAI, H. H.; BREESE, R.; HEILMAN, D. K.; JOHNSON, C. S.; FALKENBURG, J. H.; SROUR, E. F. Engraftment potential of human fetal hematopoietic cells in NOD/SCID mice is not restricted to mitotically quiescent cells. **Blood**, v. 100, p. 120–127, 2002

WOLF, E.; ARNOLD, G. J.; BAUERSACHS, S.; BEIER, H. M.; BLUM, H.; EINSPANIER, R.; FROHLICH, T.; HERRLER, A.; HIENDLEDER, S.; KOLLE, S.; PRELLE, K.; REICHENBACH, H. D.; STPJKOVIC, M.; WENIGERLIND, H.; SINOWATZ, F. Embryo-Maternal communication in Bovine – Strategies for Deciphering a Complex Cross-Talk. **Reproduction in Domestic Animal,** v. 38, p. 276-289, 2003.

WOODING, F. B. P.; FLINT, A. P. F. Placentation. In: MARSHALL, F. J. A.; PARKES, S. A. S.; LAMMING, G. E. (Ed.). **Marshall's physiology of reproduction**. 4th ed. Ithaca: Cornell University, 1994. v. 3, pt. 1, p. 233-260.

YEN, B. L.; HUANG, H. I.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 3–9, 2005.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature,** v. 425, p. 836–841, 2003.

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