

RODRIGO VIANA SEPÚLVEDA

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PERIVASCULARES DO CORDÃO
UMBILICAL DE CÃES: OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

S479c
2014

Sepúlveda, Rodrigo Viana, 1986-
Células-tronco mesenquimais perivasculares do cordão
umbilical de cães : obtenção, cultivo e caracterização / Rodrigo
Viana Sepúlveda. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 55f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Cães. 2. Cordão umbilical. 3. Células-tronco. 4. Terapia
celular. 5. Medicina regenerativa. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896

RODRIGO VIANA SEPÚLVEDA

**CÉLULAS-TRONCO MENSENQUIMAIS PERIVASCULARES DO CORDÃO
UMBILICAL DE CÃES: OBTENÇÃO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO**

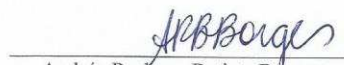
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de julho de 2014.


Emilly Correna Carlo Reis
(Coorientadora)


Adriano de Paula Sabino
(Coorientador)


Eliane Gonçalves de Melo


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, incentivo, confiança e orientação em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora, Professora Andréa, pela confiança, orientação, aprendizado, bom-humor e pela amizade construída nestes anos de convivência. Obrigado também pelas inúmeras oportunidades que vão além deste trabalho.

Ao meu grande amigo, Fabrício, pelo companheirismo de todas as horas e pela ajuda imensurável na realização deste trabalho, sempre com bom humor, um sorriso e muita paciência.

Ao amigo Renato, pela amizade construída nesses dois últimos anos que vai pela vida toda, pelas risadas no laboratório, os desabafos e por todo apoio nas atividades laboratoriais, inclusive em manter a nossa caixa secreta lá, “amaldiçoar” a estufa de secagem e surtar com o foco do microscópio invertido.

À Professora Emily pela apresentação ao cultivo celular, fornecimento dos protocolos de cultivo, pela confiança e ajuda durante a realização desse trabalho.

À Maninha por todo carinho demonstrado.

Aos amigos da pós-graduação, Vanessa, Flávia, Gustavo, Fernando e Ana Paula pela boa convivência.

A todos os alunos de iniciação científica pela ajuda no trabalho braçal.

Aos residentes do Hospital Veterinário que lembraram de mim durante as cesarianas.

Ao Professor Marcelo Lobato do Departamento de Física por autorizar o uso de seu laboratório.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA SÍMBOLOS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I	5
REVISÃO DE LITERATURA	6
CONSIDERAÇÕES FINAIS	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO II	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	29
MATERIAL E MÉTODOS	31
RESULTADOS	35
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	46
PERSPECTIVAS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
μL	microlitro
μL/mL	microlitro por mililitro
cm ²	centímetro quadrado
mL	mililitro
mm ³	milímetro cúbicos
U	unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Aspectos macro e microscópico do cordão umbilical de cão	36
Figura 2. Fotomicrografias das células obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical de cão	36
Figura 3. Curvas de crescimento e do tempo de duplicação de células obtidas do tecido perivascular de cães	38
Figura 4. Resultados dos ensaios de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica para células obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical de cães	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATB	antibiótico
CD	cluster de diferenciação
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
HLA-DR	receptor celular de superfície do complexo maior de histocompatibilidade
ISCT	International Society for Cellular Therapy
MEM	meio essencial mínimo
MHC	complexo maior de histocompatibilidade
MSC	célula-tronco mesenquimal
P2	segunda passagem
P4	quarta passagem
P7	sétima passagem
PBS	tampão fosfato-salino
RPM	rotações por minuto
SFB-MSC	soro fetal bovino qualificado para células-tronco mesenquimais
TGF- β	fator transformador do crescimento beta
UC	cordão umbilical
UFV	Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

SEPÚLVEDA, Rodrigo Viana, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Células-tronco mesenquimais perivascularares do cordão umbilical de cães: obtenção, cultivo e caracterização.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Adriano de Paula Sabino, Emily Correna Carlo Reis e Fabricio Luciani Valente.

A popularidade das células-tronco mesenquimais (MSCs) vem desde a descoberta de células aderentes, com formato fibroblastoide e capazes de se auto-renovar, formar colônias, além de originar diferentes tecidos como cartilagem, osso, gordura e músculos, sendo então objeto de estudos principalmente na medicina regenerativa. Diante disso, há uma busca constante por fontes de MSCs, sendo a medula óssea a principal fonte dentro da terapia celular, no entanto, rejeição, co-morbidades associadas a coleta e número limitado de doadores estimularam a busca por novas fontes deste tipo celular. O objetivo desse trabalho é descrever a obtenção, o cultivo e a caracterização de células obtidas a partir da digestão enzimática do tecido perivascular do cordão umbilical (UC) de cães, na esperança de estabelecer uma nova fonte deste tipo celular para as espécies canina e humana, através do modelo animal. Para isso, UCs obtidos a partir de cesarianas terapêuticas foram submetidos ao protocolo de digestão enzimática com colagenase e hialuronidase. As células obtidas a partir desse procedimento foram submetidas a três diferentes protocolos de cultivo a fim de estabelecer o melhor meio para esse tipo celular. Estabelecido o melhor meio, através da curva de crescimento e do tempo de duplicação, as células foram submetidas a ensaios de diferenciação para comprovação de sua multipotência. Foram obtidas culturas aderentes e com morfologia fibroblastoide a partir de todos os UCs utilizados, com um número inicial de células de $4,8 \times 10^5$ por UC. A curva de crescimento mostrou uma fase estacionária (lag) de 0 a 24 horas, seguida por uma fase de crescimento de 24 a 168 horas e, então, uma fase de decaimento celular. O tempo de duplicação foi mantido em torno de 15 horas até a sexta passagem, a partir do qual houveram indícios de senescência celular. O ensaio de diferenciação demonstrou a capacidade das células em diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos quando submetidos aos meios de indução. Diante dos resultados, acredita-se que as células obtidas a partir do tecido perivascular dos vasos sanguíneos do cordão umbilical de cães após sua digestão enzimática sejam células-tronco, com potencial de uso na terapia celular, necessitando da comprovação de linhagem mesenquimal.

ABSTRACT

SEPÚLVEDA, Rodrigo Viana, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, July, 2013. **Perivascular mesenchymal stem cells of the umbilical cord of dogs: harvesting, cultivation and characterization.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Adriano de Paula Sabino, Emily Correna Carlo Reis and Fabrício Luciani Valente.

The popularity of mesenchymal stem cells (MSCs) comes from the discovery of adherent cells with fibroblastic shape, ability of self-renewal, form colonies and give rise to different tissues such as cartilage, bone, fat and muscle, therefore is the object of studies mainly in regenerative medicine. There is a constant search for sources of MSCs, with the bone marrow being the major source for cell therapy. However, rejection, co-morbidities associated with collection and limited number of donors stimulated the search for new sources of this cell type. The aim of this paper is to describe the harvesting, culture and characterization of cells obtained from enzymatic digestion of dogs umbilical cord perivascular tissue, hoping to establish a new source of this cell type to canine and human species through the animal model. For this, umbilical cords (UCs) obtained from therapeutic caesarean section were submitted to the protocol of enzymatic digestion with collagenase and hyaluronidase. Cells obtained from this procedure were subjected to three different protocols of culture in order to establish the best medium to that cell type. Established the best media through the growth curve and doubling time, cells were tested for differentiation as evidence of their multipotency. Adherent cells with fibroblastic shape were obtained from all UCs used, with an initial cell number of 4.8×10^5 by UC. The growth curves showed a lag from 0 to 24 hours, followed by a phase of growth of 24 to 168 hours, and then a mobile phase of decay. The doubling time was kept around 15 hours until the sixth passage, from which there were signs of cellular senescence. The differentiation assay demonstrated the ability of cells to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes when subjected to the induction means. Given the results, it is believed that the cells obtained from the perivascular tissue of the blood vessels of the umbilical cord of dogs after enzymatic digestion are stem cells, with potential uses in cell therapy, requiring that their mesenchymal lineage is proven.

INTRODUÇÃO GERAL

Desde a descoberta de células aderentes, com formato fibroblastoide, capazes de se auto-renovar, formar colônias e originar diferentes tecidos mesenquimais como cartilagem, osso, gordura e músculos (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN & LALYKINA, 1970; FRIEDENSTEIN et al., 1974; FRIEDENSTEIN, 1976; FRIEDENSTEIN, CHAILAKHYAN & GERASIMOV, 1987), o termo células-tronco mesenquimais (MSCs), cunhado por CAPLAN (1991), ganhou popularidade e, desde então, vem sendo objeto de estudos nas mais diversas áreas, principalmente na medicina regenerativa.

Caplan (1991) definiu que MSCs são progenitores pós-natais capazes de originar todos os tecidos derivados do mesoderma. Contudo, atualmente sabe-se que essas células são capazes de originar tecidos que não somente os mesenquimais (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006), porém, o termo foi consagrado. Recentemente, foram adicionadas a essa definição as seguintes características: células progenitoras pós-natal de todos os tecidos derivados do mesoderma, encontradas in vivo na medula óssea, fígado, sinóvia, tecido adiposo, coração e outros tecidos conjuntivos, com potencial multipotente, podendo ser obtidas a partir de qualquer tecido conjuntivo (BIANCO, ROBEY & SIMMONS, 2008).

Apesar da imprecisão quanto a nomenclatura, não há dúvidas quanto ao potencial de uso destas células. As MSCs são alvos de pesquisas nas mais diferentes áreas constituindo uma importante ferramenta na engenharia tecidual sendo usadas nos mais diferentes tecidos (SERGERS & LEE, 2008; PASTIDES et al., 2013; WEISS, 2013).

Dessa forma, existe uma constante busca por fontes de MSCs, sendo a medula óssea a principal fonte de MSCs dentro da terapia celular, no entanto, rejeição, comorbidades associadas à coleta e número limitado de doadores estimulam a busca por novas fontes deste tipo celular (ARMITAGE, 1994).

Nesse contexto, com o isolamento de tipo celulares da geleia de Wharton do cordão umbilical por McElreavey et al. (1991), a obtenção de precursores mesenquimais após a digestão enzimática dos vasos sanguíneos do cordão umbilical por Romanov, Svintsitskaya & Smirnou (2003) e a caracterização de células obtidas a partir do tecido perivascular do cordão umbilical por Sarugaser et al. (2005), surgiu uma nova fonte de células-tronco, o tecido perivascular do cordão umbilical. Essa nova fonte de MSCs apresenta o benefício de não estar relacionada a co-morbidades associadas à coleta, além

de possuir uma fonte praticamente ilimitada, ocorrendo somente no Brasil, no ano de 2010, 2.862.000 partos com indivíduos nascidos vivos (BRASIL, 2012).

Diante disso, o objetivo desse trabalho é descrever a obtenção, o cultivo e a caracterização de células obtidas a partir da digestão enzimática do cordão umbilical de cães e, com isso, estabelecer uma nova fonte de células-tronco mesenquimais para as espécies canina e, através do modelo animal das mais diversas afecções, para a humana. Para isso, o trabalho foi dividido em dois capítulos sendo o primeiro uma breve revisão de literatura sobre o tema e o segundo, um trabalho original acerca da obtenção, do cultivo e da caracterização das células obtidas a partir do tecido perivascular do cordão de umbilical de cães.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, J.O. Bone marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.827–838, 1994.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v.2, p.313-319, 2008.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atenção à saúde do recém-nascido: guia para profissionais de saúde. 2 ed. Brasília, **Ministério da Saúde**, p.1-192, 2012.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.9, p.641–650, 1991.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315-317, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **International Review of Cytology**, v.47, p.327-359, 1976.

FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. **Cell Tissue and Kinetics**, v.20, p.263-272, 1987.

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

FRIEDENSTEIN, A.J., CHAILAKHYAN, R.K., LATSINIK, N.V., PANASYUK, A.F., KEILISS-BOROK, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v.17, p.331–340, 1974.

HORWITZ, E.M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., DEANS, R.J., KRAUSE, D.S., KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, p.393–395, 2005.

McELREAVEY, K.D.; IRVINE, A.I.; ENNIS, K.T.; MCLEAN, W.H. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p.29, 1991.

PASTIDES, P.; CHIMUTENGWENDE-GORDON, M.; MAFFULLI, N.; KHAN, W. Stem cell therapy for human cartilage defects: a systematic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.21, p.646-654, 2013.

PINTO, A.R.; SILVA, B.; DE OLIVERIRA, I.C.; PEREIRA, J.O.S.; NUNES, L. **Manual de normalização de trabalhos acadêmicos**. Viçosa, MG, 2011. 70p. Disponível em: <<http://www.bbt.ufv.br/>>. Acesso em: 04 de junho de 2014.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v.21, p.105–110, 2003.

SEGERS, V.F.M.; LEE, R.T. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v.451, p.937-942, 2008.

SARUGASER, R.; LICKORISH, D.; BAKSH, D.; HOSSEINI, M.M.; DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v.23, p.220-229, 2005.

WEISS, D.J. Concise review: current status of stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases. **Stem Cells**, v.32, p.16-25, 2013.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA

REVISÃO DE LITERATURA

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são um subtipo heterogêneo de células estromais (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014) podendo ser isoladas da medula óssea (GNECCHI & MELO, 2009), sangue periférico (TONDREAU et al., 2005), cordão umbilical (McELREAVEY et al., 1991; ISHIGE et al., 2009), placenta (IN'T ANKER et al., 2004), tecido adiposo (GRUBER et al., 2010) e polpa dentária (PONNAIYAN, BHAT & BHAT, 2012).

Esse tipo celular possui características vantajosas que a tornam atrativas para o uso na terapia celular (KIM & CHO, 2013).

As MSCs são capazes de diferenciar-se nas linhagens mesodermis convencionais como adipócitos, osteoblastos e condrócitos (PITTENGER et al., 1999; TREMAIN et al., 2001; JIANG et al., 2002), sendo que outros estudos mostraram que essa capacidade vai além destas linhagens, incluindo também aquelas dos folhetos ectodermal e endodermal, como hepatócitos (PETERSEN et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2002), neurônios (COGLE et al., 2004; TROPEL et al., 2006) e cardiomiócitos (PIJNAPPELS et al., 2008; ROSE, KEATING & BACKX, 2008).

Essa capacidade de diferenciação demonstra uma característica interessante das MSCs para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa, no entanto, não há comprovação de que seja essa diferenciação in vivo a razão para o sucesso nos testes clínicos realizados até hoje nos mais diferentes modelos de injúrias. Acredita-se que a capacidade de secretar fatores solúveis imunomodulatórios como, por exemplo, o fator transformador de crescimento β (TGF- β) e, portanto, agir de forma parácrina no nicho a qual está inserida, seja o real motivo do sucesso alcançado com as MSCs (PEREIRA et al., 1995; TOMA et al., 2002; SATAKE, LOU & LENKE, 2004; DAI et al., 2005; BAE et al., 2007).

Diversos autores demonstraram a capacidade de imunomodulação das MSCs tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa através da supressão da proliferação de linfócitos T, modulação das funções dos linfócitos B e células natural killers, inibindo produção de citocinas, além de prevenir a diferenciação, maturação e ativação de células dendríticas (DI NICOLA et al.; 2002; ZHANG et al., 2004; AGGARWAL & PITTENGER, 2005; AUGELLO et al., 2005; BEYTH et al., 2005; GLENNIE et al., 2005; GROH et al., 2005; JIANG et al., 2005; MACCARIO et al., 2005; CORCIONE et al., 2006; NAUTA et al., 2006; RAMASAMY et al., 2007; SPAGGIARI et al., 2008; ENGLISH et al., 2009).

Outra importante qualidade das MSCs é sua capacidade de realizar toda essa atividade imunomodulatória independentemente da existência de compatibilidade entre doador e receptor devido à baixa expressão, ou ausência total, do complexo maior de histocompatibilidade I (MHC-I) o que a torna imunoprivilegiada (SARUGASER et al., 2005; STAGG et al., 2006). Ainda, as MSCs podem, indiretamente, criar um ambiente imunossupressivo regulando a geração de linfócitos T regulatórios (ZAPPIA et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2009; MADEC et al., 2009; JOO et al., 2010; NEMETH et al., 2010; PATEL et al., 2010), o que pode torná-las úteis na imunoterapia (SINGER, KING & D'ALESSIO, 2014).

As MSCs apresentam também capacidade migratória para sítios com alta quantidade de mediadores inflamatórios através de quimiotaxia e interação célula-célula (FIEDLER et al., 2002; NAKAMIZO et al., 2005; FORTE et al., 2006; SON et al., 2006; BALL, SHUTTLEWORTH & KIELTY, 2007). Essa capacidade as tornam úteis em diversas condições, como infartos do miocárdio (JOHNSTONE et al., 1998), derrames (HAYNESWORTH et al., 1992; LENNON et al., 1996), traumas medulares (YOO et al., 1998), lesões renais agudas (DENNIS et al., 1999) e regeneração meniscal (DENNIS & CAPLAN, 1996), além de servir como carreadores de agentes terapêuticos contra algumas neoplasias, já que o microambiente tumoral constantemente produz citocinas inflamatórias, funcionando como um sinalizador para as MSCs (KIM & CHO, 2013).

Diversas fontes de MSCs são descritas na literatura, sendo a medula óssea a principal fonte (DOMINICI et al., 2006). Recentemente, estudos relataram a importância do nicho onde essas células estão inseridas no seu comportamento e no potencial de uso clínico (FUCHS, TUMBAR & GUASCH, 2004; KNOBLICH, 2008; DISCHER, MOONEY & ZANDSTRA, 2009; PEERANI & ZANDSTRA, 2010; YADLAPALLI & YAMASHITA, 2012).

O nicho de uma MSC pode ser definido com um microambiente altamente especializado que contém, além das MSCs, progenitores de diferenciação, fatores solúveis, outros tipos celulares e uma matriz extracelular. Todos esses componentes estão altamente integrados a fim de favorecer a ligação de receptores aos fatores solúveis ali presentes e favorecer o contato célula-célula, além de garantir a integridade física desse microambiente (DISCHER, MOONEY & ZANDSTRA, 2009).

Além disso, o nicho é um importante reservatório de células-tronco na fase adulta do organismo, sendo essas células mantidas em quiescência, objetivando evitar danos ao material genético, até que sejam requisitadas por algum motivo, como um trauma tecidual

isquêmico, podendo então as células-tronco se dividirem de forma simétrica ou assimétrica (FUCHS, TUMBAR & GUASCH, 2004).

Assim, a divisão simétrica das células-tronco corresponde a formação de duas células-tronco filhas ou duas células filhas diferenciadas. A divisão assimétrica corresponde a divisão de uma célula-tronco filha e uma célula diferenciada filha, dependendo do nicho ao qual estão inseridas (FUCHS, TUMBAR & GUASCH, 2004; KNOBLICH, 2008; PEERANI & ZANDSTRA, 2010; YADLAPALLI & YAMASHITA, 2012).

Inicialmente, foi proposto que todas MSCs eram derivadas a partir da medula óssea e sua função seria repor tecidos mesenquimais lesados em todo o corpo (CAPLAN, 1994). Contudo, devido a inabilidade de se comprovar a capacidade migratória a longas distâncias dessas células, juntamente com detecções variáveis na corrente sanguínea, essa hipótese foi descartada (KARP & LENG TEO, 2009).

Com isso, um novo nicho foi proposto para as MSCs, o tecido perivascular (SHI & GRONTHOS, 2003; CRISAN et al., 2008). Esse novo nicho explica como as MSCs podem participar da reparação de diversos tecidos mesenquimais ao longo do corpo, todavia, não explica sua presença em tecidos poucos vascularizados, como a cartilagem articular (ALSALAMESH et al., 2004; DOWTHWAITE et al., 2004; MEIRELLES, CHAGASTELLES & NARDI, 2006; COVAS et al., 2008).

Recentemente, Feng et al. (2011) levantaram a possibilidade da existência de vários nichos, além do tecido perivascular e da medula óssea, que atuariam em conjunto para a reparação tecidual, ao comprovar a presença de MSCs em um tecido avascularizado ampliando ainda mais a possibilidade de novas fontes e interações entre MSCs de diferentes nichos.

Diante do exposto, da premissa de que o nicho é o principal fator que irá determinar o destino de uma MSC, de divergências quanto diferenciação e das propriedades funcionais entre células de diferentes nichos, Yu et al. (2007) e Zanini et al. (2011) descreveram que pode haver predileção das MSCs em diferenciar-se em células do seu tecido de origem, indicando haver progenitores já comprometidos com determinada linhagem.

Dessa forma, células de diferentes nichos apresentam vantagens e desvantagens. Células obtidas da medula óssea apresentam excelente capacidade de diferenciação para a linhagem óssea (BERNARDO et al., 2007; REBELATTO et al., 2008; HAYASHI et al., 2008; DANISOVIC et al., 2009), contudo, possuem baixa taxa de auto-renovação,

apresentando menores índices de proliferação quando comparadas a outras fontes, além de senescência precoce (BARLOW et al., 2008; YANG et al., 2012).

Aquelas obtidas do tecido adiposo apresentam uma melhor atividade imunomodulatória e melhor diferenciação em cardiomiócitos, além de melhores índices de proliferação quando comparada as de medula óssea (BARLOW et al., 2008; YANG et al., 2012).

Já as células obtidas dos compartimentos do cordão umbilical apresentam dificuldades para diferenciação (CHANG et al., 2006; KERN et al., 2006), porém, não apresentam as características indesejáveis relacionadas a idade do doador, como observado naquelas obtidas a partir da medula óssea e do tecido adiposo, apresentando excelentes taxa de auto-renovação (MUELLER & GLOWACKI, 2001; BAKSH, YAO & TUAN, 2007).

Além das vantagens supracitadas, o cordão umbilical ainda é considerado descarte médico e não apresenta problemas quanto a questões éticas e co-morbidades associadas a coleta (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014).

O cordão umbilical pode ser dividido em quatro compartimentos para obtenção de MSCs (1) o cordão como um todo (FRIEDMAN et al., 2007; MAJORE et al., 2011; BOSCH et al., 2012), (2) a geleia de Wharton juntamente com as artérias e veias (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014), (3) as lining cells dos vasos sanguíneos do cordão (KITA et al., 2010; DEUSE et al., 2011) e (4) o tecido perivascular (SARUGASER et al., 2005; BAKSH, YAO & TUAN, 2007; ZEBARDAST, LICKORISH & DAVIES, 2010).

O método de explante, um dos dois métodos descritos para obtenção de MSCs a partir do cordão umbilical, consiste na colocação de um fragmento do cordão umbilical, geralmente de 1 a 2 mm³ em uma placa de cultivo celular contendo meio. Após a adesão do fragmento ao fundo da placa, o meio é trocado a cada três a sete dias, por duas a quatro semanas, até a obtenção de células aderentes em formato fibroblastoide (MAJORE et al., 2011; MARMOTTI et al., 2012; HE et al., 2014). Esse método apresenta baixa obtenção de células, muitas vezes relacionadas a movimentação do fragmento utilizado (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014).

Já o outro método, a digestão enzimática, consiste na obtenção das células após a colocação de todo o cordão ou parte deles em soluções enzimáticas, geralmente contendo apenas colagenase ou sua associação a hialuronidase (KIKUCHI-TAURA et al., 2012; HE et al., 2014). Esse método é mais rápido do que o descrito anteriormente e a obtenção de células é mais fácil e homogênea (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014).

As características proliferativas, como já citado anteriormente, são superiores às apresentadas por células obtidas da medula óssea (BASKH et al., 2007; MAJORE et al., 2011), sendo que não apresentam diferenças significativas entre os compartimentos do cordão umbilical (ISHIGE et al., 2009; MENNAN et al., 2013).

O perfil imunológico das MSCs obtidas do cordão umbilical segue o recomendado pela Internacional Society for Cellular Therapy (DOMINICI et al., 2006) apresentando marcadores de adesão como CD29 e CD44 e marcadores mesenquimais como CD90, CD73 e CD105 e ausência de marcadores endoteliais, como CD31, e hematopoiéticos, como CD34, CD45 e CD117 (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014), não apresentando diferença quanto ao perfil imunológico entre os compartimentos do cordão (SEO et al., 2009).

É importante ressaltar ainda que as MSCs do cordão umbilical não apresentam antígenos de superfície como HLA-DR, CD80, CD86 e MHC-I, sugerindo que as células obtidas desse compartimento não incitam uma resposta aguda de rejeição tornando-as adequadas para uso alogênico (RASMUSSEN et al., 2005; FRIEDMAN et al., 2007; PRASANNA et al., 2010).

Todas essas características contribuem para o uso cada vez mais crescente desse tipo celular no tratamento de doenças das mais diversas áreas, como rejeição de enxertos não responsivos a esteroides (WU et al., 2011), tratamento de doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (LIANG et al., 2010; SUN et al., 2010), lesões na medula espinhal (DASARI, VEERAVALLI & DINH, 2014), doença de Parkinson (WEISS et al., 2006) e outras.

Em medicina veterinária, a terapia celular também é utilizada desde o trabalho pioneiro de Herthel (2002) no tratamento de desmiste do ligamento suspensório em equinos com MSCs da medula óssea daquela espécie.

Recentemente, trabalhos demonstraram a busca por novas fontes de células tronco buscando novas alternativas para o avanço do potencial terapêutico das MSCs na medicina veterinária, como o isolamento e a caracterização de MSCs da veia do cordão umbilical de cães (ZUCCONI et al., 2010), do tecido adiposo de cães (VIEIRA et al., 2010), do sangue do cordão umbilical de bovinos (RAOUFI et al., 2011) e da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical de equinos (BARBERINI et al., 2014), além da aplicação prática desse tipo celular (PENHA et al., 2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As MSCs são uma importante ferramenta para engenharia de tecidos e medicina regenerativa, sendo a medula óssea a principal fonte desse tipo celular, no entanto, desvantagens associadas a coleta impulsionaram a busca por novas fontes de MSCs, dentre elas o cordão umbilical, sendo o tecido perivascular um dos compartimentos utilizados.

A obtenção de MSCs pode ser possível para espécie canina suprimindo a medicina veterinária com mais uma fonte de MSCs de fácil obtenção e coleta. O cultivo dessas células pode apresentar consonância com o que é descrito para outros tipos celulares, com a possibilidade de demonstração, nesse trabalho, de seu potencial de crescimento e diferenciação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005.

ALSALAMEH, S.; AMIN, R.; GEMBA, T.; LOTZ, M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. **Arthritis and Rheumatism**, v.50, p.1522-1532, 2004.

AUGELLO, A.; TASSO, R.; NEGRINI, S.M.; AMATEIS, A.; INDIVERI, F.; CANCEDDA, R.; PENNESI, G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. **European Journal of Immunology**, v.35, p.1482-1490, 2005.

BAE, J.S.; HAN, H.S.; YOUN, D.H.; CARTER, J.E.; MODO, M.; SCHUCHMAN, E.H.; JIN, H.K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. **Stem Cells**, v.25, p.1307-1316, 2007.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem Cells**, v.25, p.1384-1392, 2007.

BALL S.G.; SHUTTLEWORTH, C.A.; KIELTY, C.M. Vascular endothelial growth factor can signal through platelet-derived growth factor receptors. **The Journal of Cell Biology**, v.177, p.489-500, 2007.

BARBERINE, D.J.; FREITAS, N.P.P.; MAGNONI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUDANO, M.J.; GOLIM, M.J.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research & Therapy**, v.4, p.1-11, 2014.

BARLOW, S.; BROOKE, G.; CHATTERJEE, K.; PRICE, G.; PELEKANOS, R.; ROSSETTI, T.; DOODY, M.; VENTER, D.; PAIN, S.; GILSHENAN, K.; ATKINSON,

K. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v.17, p.1095-1107, 2008.

BERNARDO, M.E.; EMONS, J.A.; KARPERIEN, M.; NAUTA, A.J.; WILLEMZE, R.; ROELOFS, H.; ROMEO, S.; MARCHINI, A.; RAPPOLD, G.A.; VUKICEVIC, S.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. **Connective Tissue Research**, v.48, p.132-140, 2007.

BEYTH, S.; BOROVSKY, Z.; MEVORACH, D.; LIEBERGALL, M.; GAZIT, Z.; ASLAN, H.; GALUN, E.; RACHMILEWITZ, J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. **Blood**, v.105, p.2214-2219, 2005.

BOSCH, J.; HOUBEN, A.P.; RADKE, T.F.; STAPELKAMP, D.; BÜNEMANN, E.; BALAN, P.; BUCHHEISER, A.; LIEDTKE, S.; KÖGLER, G. Distinct differentiation potential of “MSC” derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells?. **Stem Cells and Development**, v.21, p.1977-1988, 2012.

CAPLAN, A.I. The mesengenic process. **Clinical Plastic Surgery**, v.21, p.429-435, 1994.

CHANG, Y.J.; SHIH, D.T.B.; TSENG, C.P.; HSIEH, T.B.; LEE, D.C.; HWANG, S.M. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. **Stem Cells**, v.24, p.679-685, 2006.

COGLE, C.R.; YACHNIS, A.T.; LAYWELL, E.D.; ZANDER, D.S.; WINGARD, J.R.; STEINDLER, D.A.; SCOTT, E.W. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. **Lancet**, v.363, p.1432-1437, 2004.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, G.L.; PISTOIA, V.; UCCELI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v.107, p.367-372, 2006.

COVAS, D.T.; PANEPUCCI, R.A.; FONTES, A.M.; SILVA JR, W.A.; ORELLANA, M.D.; FREITAS, M.C.; NEDER, L.; SANTOS, A.R.; PERES, L.C.; JAMUR, M.C.; ZAGO, M.A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, v.36, p.642-654, 2008.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C-W.; CORSELLI, M.; PARK, T.S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P.N.; TRASS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B.M.; BADYLAK, S.; BUHRING, H.J.; GIACOBINO, J.P.; LAZZARI, L.; HUARD, J.; PÉAULT, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, v.3, p.301-13, 2008.

DAI, W.; HALE, S.L.; MARTIN, B.J.; KUANG, J.Q.; DOW, J.S.; WOLD L.E.; KLONER, R.A. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. **Circulation**, v.112, p.214-223, 2005.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLAK, S.; ULICNA, M.; HLAVACKOVA, L.; BOHMER, D.; VOJTASSÁK, J. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **General Physiology and Biophysics**, v.28, p.56-62, 2009.

DASARI, V.R.; VEERAVALLI, K.K.; DINH, D.H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. **World Journal of Stem Cells**, v.6, p.120-133, 2014.

DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. **Journal of Cellular Physiology**, v.167, p.523-528, 1996.

DENNIS, J.E.; MERRIAM, A.; AWADALLAH, A.; YOO, J.U.; JOHNSTONE, B.; CAPLAN, A.I. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.14, p.700-709, 1999.

DEUSE, T.; STUBBENDORFF, M.; TANG-QUAN, K.; PHILLIPS, N.; KAY, M.A.; EIERMANN, T.; PHAN, T.T.; VOLK, H.D.; REICHENSPURNER, H.; ROBBINS, R.C.; SCHREPFER, S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. **Cell Transplantation**, v.20, p.655-667, 2011.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LOGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v.99, p.3838-3843, 2002.

DISCHER, D.E.; MOONEY, D.J.; ZANDSTRA, P.W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v.324, p.1673-1677, 2009.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315–317, 2006.

DOWTHWAITE, G.P.; BISHOP, J.C.; REDMAN, S.N.; KHAN, I.M.; ROONEY, P.; EVANS, D.J.R.; HAUGHTON, L.; BAYRAM, Z.; BOYER, S.; THOMSON, B.; WOLFE, M.S.; ARCHER, C.W. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. **Journal of Cell Science**, v.117, p.889-897, 2004.

ENGLISH, K.; RYAN, J.M.; TOBIN, L.; MURPHY, M.J.; BARRY, F.P.; MAHON, B.P. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. **Clinical Experimental Immunology**, v.156, p.149-160, 2009.

FENG, J.; MANTESSO, A.; DE BARI, C.; NISHIYAMA, A.; SHARPE, P.T. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v.108, p.6503-6508, 2011.

FIEDLER, J.; RODERER, G.; GUNTHER, K.P.; BRENNER, R.E. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.87, p.305-312, 2002.

FORTE, G.; MINIERI, M.; COSSA, P.; ANTENUCCI, D.; SALA, M.; GNOCCHI, V.; FIACCAVENTO, R.; CAROTENUTO, F.; DE VITO, P.; BALDINI, P.M.; PART, M.; DI NARDO, P. Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: proliferation, migration, and differentiation. **Stem Cells**, v.24, p.23-33, 2006.

FRIEDMAN, R.; BETANCUR, M.; BOISSEL, L.; TUNCER, H.; CETRULO, C.; KLINGEMANN, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.13, p.1477-1486, 2007.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v.116, p.769-778, 2004.

GLENNIE, S.; SOEIRO, I.; DYSON, P.J.; LAM, E.W.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v.105, p.2821-2827, 2005.

GNECCHI, M.; MELO, L.G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. **Methods in Molecular Biology**, v.482, p.281-294, 2009.

GONZÁLEZ, M.A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis Rheumatology**, v.60, p.1006-1019, 2009.

GROH, M.E.; MAITRA, B.; SZEKELY, E.; KOC, O.N. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. **Experimental Hematology**, v.33, p.928-934, 2005.

GRUBER, H.E.; DEEPE, R.; HOELSCHER, G.L.; INGRAM, J.A.; NORTON, H.J.; SCANNELL, B.; LOEFFLER, B.J.; ZINCHENKO, N.; HANLEY, E.N.; TAPP, H.

Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells. **Tissue Engineering Part A**, v.16, p.2843-2860, 2010.

HAYASHI, O.; KATSUBE, Y.; HIROSE, M.; OHGUSHI, H.; ITO, H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. **Calcified Tissue International**, v.82, p.238-247, 2008.

HAYNESWORTH, S.E.; GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V.M.; CAPLAN, A.I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. **Bone**, v.13, p.81, 1992.

HE, H.; NAGAMURA-INOUE, T.; TSUNODA, H.; YUZAWA, M.; YAMAMOTO, Y.; YOROZU, P.; AGATA, H.; TOJO, A. Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. **Tissue Engineering Part A**, v.20, p.1314-1324, 2014.

HERTHEL, D.J. Suspensory desmitis therapies. **Proceeding of 12th ACVS Symposium**, San Diego, p.165-167, 2002.

IN 'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E.; KANHAI, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v.22, p.1338-1345, 2004.

ISHIGE, I.; NAGAMURA-INOUE, T.; HONDA, M.J.; HARNPRASOPWAT, R.; KIDO, M.; SUGIMOTO, M.; NAKAUCHI, H.; TOJO, A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. **International Journal Hematology**, v.90, p.261-269, 2009.

JIANG, X.X.; ZHANG, Y.; LIU, B.; ZHANG, S.X.; WU, Y.; YU, X.D.; MAO, N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.105, p.4120-4126, 2005.

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

JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; GOLDBERG, V.M.; YOO, J.U.; CAPLAN, A.I. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. **Experimental Cell Research**, v.1, p.265-272, 1998.

JOO, S.Y.; CHO, K.A.; JUNG, Y.J.; KIM, H.S.; PARK, S.Y.; CHOI, Y.B.; HONG, K.M.; WOO, S.Y.; SEOH, J.Y.; CHO, S.J.; RYU, K.H. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. **Cytotherapy**, v.12, p.361-370, 2010.

KARP, J.M.; LENG TEO, G.S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v.4, p.206-216, 2009.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, p.1294-1301, 2006.

KIKUCHI-TAURA, A.; TAGUCHI, A.; KANDA, T.; INOUE, T.; KASAHARA, Y.; HIROSE, H.; SATO, I.; MATSUYAMA, T.; NAKAGOMI, T.; YAMAHARA, K.; STERN, D.; OGAWA, H.; SOMA, T. Human umbilical cord provides a significant source of unexpanded mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v.14, p.441-450, 2012.

KIM, N.; CHO, S-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Korean Journal of Internal Medicine**, v.28, p.387-402, 2013.

KITA, K.; GAUGLITZ, G.G.; PHAN, T.T.; HERNDON, D.N.; JESCHKE, M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. **Stem Cells and Development**, v.19, p.491-502, 2010.

KNOBLICH, J.A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. **Cell**, v.132, p.583-597, 2008.

LENNON, D.P.; HAYNESWORTH, S.E.; BRUDER, S.P.; JAISWALL, N.; CAPLAN, A.I. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: Identification of serum for optimal selection and proliferation. **In Vitro Cell Development Biology**, v.32, p.602-611, 1996.

LIANG, J.; ZHANG, H.; HUA, B.; WANG, H.; LU, L.; SHI, S.; HOU, Y.; ZENG, X.; GILKESON, G.S.; SUN, L. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. **Annals of the Rheumatic Disease**, v.69, p.1423-1429, 2010.

MACCARIO, R.; PODESTA, M.; MORETTA, A.; COMETA, A.; COMOLI, P.; MONTAGNA, D.; DAUDT, L.; IBATICI, A.; PIAGGIO, G.; POZZI, S.; FRASSONI, F.; LOCATELLI, F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. **Haematologica**, v.90, p.516-525, 2005.

MADEC, A.M.; MALLONE, R.; AFONSO, G.; ABOU MRAD, E.; MESNIER, A.; ELJAAFARI, A.; THIVOLET, C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia**, v.52, p.1391-1399, 2009.

MAJORE, I.; MORETTI, P.; STAHL, F.; HASS, R.; KASPER, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. **Stem Cell Reviews**, v.7, p.17-31, 2011.

MARMOTTI, A.; MATTIA, S.; BRUZZONE, M.; BUTTIGLIERI, S.; RISSO, A.; BONASIA, D.E.; BLONNA, D.; CASTOLDI, F.; ROSSI, R.; ZANINI, C.; ERCOLE, E.; DEFABIANI, E.; TARELLA, C.; PERETTI, G.M. Minced umbilical cord fragments as a source of cells for orthopaedic tissue engineering: an in vitro study. **Stem Cells International**, v.2012, p.1-13, 2012.

McELREAVEY, K.D.; IRVINE, A.I.; ENNIS, K.T.; MCLEAN, W.H. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p.29, 1991.

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

MENNAN, C.; WRIGHT, K.; BHATTACHARJEE, A.; BALAIN, B.; RICHARDSON, J.; ROBERTS, S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. **Biomed Research International**, v.2013, p.1-8, 2013.

MUELLER, S.M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.82, p.583-590, 2001.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World Journal of Stem Cells**, v.6, p.195-202, 2014.

NAKAMIZO, A.; MARINI, F.; AMANO, T.; KHAN, A.; STUDENY, M.; GUMIN, J.; CHEN, J.; HENTSCHEL, S.; VECIL, G.; DEMBINSKI, J.; ANDREEFF, M.; LANG, F.F. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. **Cancer Research**, v.65, p.3307-3318, 2005.

NAUTA, A.J.; KRUISSELBRINK, A.B.; LURVINK, E.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.177, p.2080-2087, 2006.

NEMETH, K.; KEANE-MYERS, A.; BROWN, J.M.; METCALFE, D.D.; GORHAM, J.D.; BUNDOC, V.G.; HODGES, M.G.; JELINEK, I.; MADALA, S.; KARPATI, S.; MEZEY, E. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.107, p.5652-5657, 2010.

PATEL, S.A.; MEYER, J.R.; GRECO, S.J.; CORCORAN, K.E.; BRYAN, M.; RAMESHWAR, P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. **Journal of Immunology**, v.184, p.5885-5894, 2010.

PEERANI, R.; ZANDSTRA, P.W. Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. **Journal of Clinical Investigating**, v.120, p.60-70, 2010.

PENHA, E.M.; MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.T.; MENDONÇA, M.V.P.; GRAVELY, F.A.; PINHEIRO, C.M.B.; PINHEIRO, T.M.B.; BARROUNIN-MELO, S.M.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. **Stem Cell International**, v.2014, p.1-8, 2014.

PEREIRA, R.F.; HALFORD, K.W.; O'HARA, M.D.; LEEPER, D.B.; SOKOLOV, B.P.; POLLARD, M.D.; BAGASRA, O.; PROCKOP, D.J. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proceeding of National Academy of Science USA**, v.92, p.4857-4861, 1995.

PETERSEN, B.E.; BOWEN, W.C.; PATRENE, K.D.; MARS, W.D.; SULLIVAN, A.K.; MURASE, N.; BOGGS, S.S.; GREENBERGER, J.S.; GOFF, J.P. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v.284, p.1168-1170, 1999.

PIJNAPPELS, D.A.; SCHALIJ, M.J.; RAMKISOENSING, A.A.; VAN TUYN, J.; DE VRIES, A.A.; VAN DE LAARSE, A.; YPEY, D.L.; ASTMA, D.E. Forced alignment of mesenchymal stem cells undergoing cardiomyogenic differentiation affects functional integration with cardiomyocyte cultures. **Circulation Research**, v.103, p.167-176, 2008.

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

PONNAIYAN, D.; BHAT, K.M.; BHAT, G.S. Comparison of immunophenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.25, p.127-134, 2012.

PRASANNA, S.J.; GOPALAKRISHNAN, D.; SHANKAR, S.R.; VASANDAN, A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*, v.5, p.e9016, 2010.

RAMASAMY, R.; FAZEKASOVA, H.; LAM, E.W.; SOEIRO, I.; LOMBARDI, G.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. **Transplantation**, v. 83, p.71-76, 2007.

RAOUFI, M.F.; TAJIK, P.; DEGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.95-99, 2011.

RASMUSSEN, I.; RINGDÉN, O.; SUNDBERG, B.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. **Experimental Cell Research**, v.305, p.333-341, 2005.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; MORETAO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVERIA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, p.901-913, 2008.

ROSE, R.A.; KEATING, A.; BACKX, P.H. Do mesenchymal stromal cells transdifferentiate into functional cardiomyocytes?. *Circulation Research*, v.103, p.120, 2008.

SARUGASER, R.; LICKORISH, D.; BAKSH, D.; HOSSEINI, M.M.; DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v.23, p.220-229, 2005.

SATAKE, K.; LOU, J.; LENKE, L.G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. **Spine (Phila Pa 1976)**, v.29, p.1971-1979, 2004.

SCHWARTZ, R.E.; REYES, M.; KOODIE, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; JOHNSON, S.; HU, W.S. VERFAILLIE, C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.109, p.1291-1302, 2002.

SEO, K.W.; LEE, S.R.; BHANDARI, D.R.; ROH, K.H.; PARK, S.B.; SO, A.Y.; JUNG, J.W.; SEO, M.S.; KANG, S.K.; LEE, Y.S.; KANG, K.S. OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCBMSCs). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 384, p.120-125, 2009.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.18, p.696-704, 2003.

SINGER, B.D.; KING, L.S.; D'ALESSIO, F.R. Regulatory T cells as immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.1-10, 2014.

SON, B.R.; MARQUEZ-CURTIS, L.A.; KUCIA, M.; WYSOCZYNSKI, M.; TURNER, A.R.; RATAJCZAK, M.Z.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. **Stem Cells**, v.24, p.1254- 1264, 2006.

SPAGGIARI, G.M.; CAPOBIANCO, A.; ABDELRAZIK, H.; BECCHETTI, F.; MINGARI, M.C.; MORETTA, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. **Blood**, v.111, p.1327-1333, 2008.

STAGG, J.; POMMEY, S.; ELIOPOULOS, N.; GALIPEAU, J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. **Blood**, v.107, p.2570-2577, 2006.

SUN, L.; WANG, D.; LIANG, J.; ZHANG, H.; FENG, X.; WANG, H.; HUA, B.; LIU, B.; YE, S.; HU, X.; XU, W.; ZENG, X.; HOU, Y.; GILKESON, G.S.; SILVER, R.M.; LU, L.; SHI, S. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**, v.62, p.2467-2475, 2010.

TOMA, C.; PITTENGER, M.F.; CAHILL, K.S.; BYRNE, B.J.; KESSLER, P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation**, v.105, p.93-98, 2002.

TONDREAU, T.; MEULEMAN, N.; DELFORGE, A.; DEJENEFFE, M.; LEROY, R.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem Cells**, v.23, p.1105-1112, 2005.

TREMAIN, N.; KORKKO, J.; IBBERSON, D.; KOPEN, G.C.; DIGIROLAMO, C.; PHINNEY, D.G. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNAs of multiple cell lineages. **Stem Cells**, v.19, p.408- 418, 2001.

TROPEL, P.; PLATET, N.; PLATEL, J.C.; NOËL, D.; ALBRIEUX, M.; BENABID, A-L.; BERGER, F. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, p.2868-2876, 2006.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, p.279-289, 2010.

WEISS, M.L.; MEDICETTY, S.; BLEDSOE, A.R.; RACHAKATLA, R.S.; CHOI, M.; MERCHAV, S.; LUO, Y.; RAO, M.S.; VELAGALETI, G.; TROYER, D. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of

transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. **Stem Cells**, v.24, p.781–792, 2006.

WU K.H.; CHAN, C.K.; TSAI, C.; CHANG, Y.H.; SIEBER, M.; CHIU, T.H.; HO, M.; PENG, C.T.; WU, H.P.; HUANG, J.L. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **Transplantation**, v.91, p.1412-1416, 2011.

YADLAPALLI, S.; YAMASHITA, Y.M. Spindle positioning in the stem cell niche. **WIREs Developmental Biology**, v.1, p.215-230, 2012.

YANG, J.; SONG, T.; WU, P.; CHEN, Y.; FAN, X.; CHEN, H.; ZHANG, J.; HUANG, C. Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells. **Molecular Medicine Reports**, v.5, p.108-113, 2012.

YOO, J.U.; SOLCHAGA, L.A.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.; JONHSTONE, B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.80, p.1745-1757, 1998.

YU, J.; WANG, Y.; DENG, Z.; TANG, L.; LI, Y.; SHI, J.; JIN, Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biology of the Cell**, v.99, p.465-674, 2007.

ZANINI, C.; BRUNO, S.; MANDILI, G.; BACI, D.; CERUTTI, F.; CENACCHI, G.; IZZI, L.; CAMUSSI, G.; FORNI, M. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. **PLoS One**, v.6, p.e28175, 2011.

ZAPPIA, E.; CASAZZA, S.; PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; BONANNI, I.; GERDONI, E.; GIUNTI, D.; CERAVOLO, A.; CAZZANTI, F.; FRASSONI, F.; MANCARDI, G.; UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood**, v.106, p.1755-1761, 2005.

ZEBARDAST, N.; LICKORISH, D.; DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. **Organogenesis**, v.6, p.197-203, 2010.

ZHANG, W.; GE, W.; LI, C.; YOU, S.; LIAO, L.; HAN, Q.; DENG, W.; ZHAO, R.C. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. **Stem Cells and Development**, v.13, p.263-271, 2004.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N.M.; BUENO, D.F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C.E.; PASSOS-BUENO, M.R.; MIGLINO, M.A.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein - a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development**, v.19, p.395-402, 2010.

CAPÍTULO II

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

DO TECIDO PERIVASCULAR DO

CORDÃO UMBILICAL DE CÃES:

OBTENÇÃO, CULTIVO E

CARACTERIZAÇÃO

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO PERIVASCULAR DO
CORDÃO UMBILICAL DE CÃES: OBTENÇÃO, CULTIVO E
CARACTERIZAÇÃO**

**MESENCHYMAL STEM CELLS FROM PERIVASCULAR TISSUE OF
UMBILICAL CORD OF DOGS: HARVESTING, CULTURING AND
CARACTERIZATION**

RESUMO

Inúmeras são as fontes de células-tronco mesenquimais (MSCs), sendo a medula óssea a principal delas. Porém, dor, falta de doadores e co-morbidades associadas a coleta estimulam a busca por novas fontes de MSCs. O objetivo desse trabalho foi obter células a partir da digestão enzimática do cordão umbilical (UC) de cães e caracterizá-las como MSCs. Para isso, os UCs obtidos de cesarianas terapêuticas realizadas no Hospital Veterinária da instituição foram submetidos ao protocolo de digestão enzimática com colagenase e hialuronidase. As células obtidas a partir desse procedimento foram submetidas a três diferentes protocolos de cultivo a fim de estabelecer o melhor meio de cultivo para esse tipo celular. Estabelecido o melhor meio, as células foram submetidas a ensaios de diferenciação para comprovação de sua multipotência. Foram obtidas culturas aderentes e com morfologia fibroblastoide a partir de todos os UCs utilizados, com um número inicial de células em $4,8 \times 10^5$ por UC. A curva de crescimento mostrou uma fase lag de 0 a 24 horas, seguida por uma fase de crescimento de 24 a 168 horas e, então, uma fase de decaimento celular. O tempo de duplicação foi mantido em torno de 15 horas até a sexta passagem, a partir da qual houveram indícios de senescência celular. O ensaio de diferenciação demonstrou a capacidade das células em diferenciar-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos quando submetidos aos meios de indução. Não foi realizado o estudo dos antígenos de superfície para essa linhagem celular. Diante dos resultados, e apesar da ausência da caracterização imunológica das células, acredita-se que as células obtidas a partir do tecido perivascular dos vasos sanguíneos do cordão umbilical de cães, após sua digestão enzimática, sejam células-tronco, necessitando de que sua linhagem mesenquimal seja comprovada.

Palavras-chave: terapia celular, cultivo celular, medicina regenerativa

ABSTRACT

There are numerous of sources of mesenchymal stem cells (MSCs), being bone marrow the main one. However, pain, lack of donors and comorbidities associated with harvesting, stimulate the search for new sources of MSCs. The aim of this work is to obtain cells from the enzymatic digestion of the umbilical cord (UC) of dogs and characterize them as MSCs. For this, the UC was obtained from therapeutic caesarean sections performed at the Veterinary Hospital of the institution and submitted to protocol of enzymatic digestion with collagenase and hyaluronidase. Cells obtained from this procedure were subjected to three different protocols of culture in order to establish the best culture medium for this cell type. Established the best medium, the cells were tested for evidence of differentiation for confirmation of their multipotency. From all the UC used in this study an adherent with fibroblastoid shape cell was obtained, with an initial number of 4.8×10^5 of cells. The growth curves showed a lag phase from 0 to 24 hours, followed by a phase of growth of 24 to 168 hours, and then phase of cell decay. The doubling time was kept around 15 hours until the sixth passage, from which there were signs of cellular senescence. The differentiation assay demonstrated the ability of cells to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes when subjected to the induction mediums. A study of the surface antigens for this cell line was not performed. From the results, despite the lack of immunological characterization of cells, it is believed that cells derived from the perivascular tissue of blood vessels of the umbilical cord of dogs after enzymatic digestion are stem cells, requiring that their mesenchymal lineage to be proven.

Keywords: cellular therapy, cell culture, regenerative medicine

INTRODUÇÃO

Células-tronco mesenquimais (MSCs) são alvo de pesquisas na área de medicina regenerativa e engenharia de tecidos desde sua descoberta na década de 70 do século passado (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN & LALYKINA, 1970). Desde então, inúmeras fontes de MSCs foram descobertas como a medula óssea (GNECCHI & MELO, 2009), sangue periférico (TONDREAU et al., 2005), cordão umbilical (McELREAVEY et al., 1991; ISHIGE et al., 2009), placenta (IN'T ANKER et al., 2004), tecido adiposo (GRUBER et al., 2010) e polpa dentária (PONNAIYAN, BHAT & BHAT, 2012). Porém,

a medula óssea ainda continua como a principal fonte de MSCs para o uso em pesquisas e aplicação clínica (DOMINICI et al., 2006).

Sabe-se hoje que o nicho no qual a MSC está inserida influencia seu comportamento biológico, havendo predileção para diferenciação em células presentes no seu nicho, o que pode influenciar na sua aplicabilidade clínica (YU et al.; 2007; ZANINI et al. 2011).

Dessa forma, MSCs de diferentes origens apresentam características distintas, como a excelente capacidade de diferenciação em células da linhagem óssea por MSCs obtidas da medula óssea (BERNARDO et al., 2007; REBELATTO et al., 2008; HAYASHI et al., 2008; DANISOVIC et al., 2009), a melhor atividade imunomodulatória das obtidas a partir do tecido adiposo (BARLOW et al., 2008; YANG et al., 2012), bem como alta taxa de auto-renovação e ausência de características indesejáveis relacionadas a idade do doador, como senescência precoce, como observado naquelas a partir dos compartimentos do cordão umbilical (MUELLER & GLOWACKI, 2001; BAKSH, YAO & TUAN, 2007).

Além das vantagens supracitadas, o cordão umbilical não apresenta problemas quanto a questões éticas ou associados a coleta, como dor e co-morbidades (ARMITAGE, 1994) já que é considerado descarte médico, além de possuir uma fonte praticamente ilimitada, ocorrendo somente no Brasil, no ano de 2010, aproximadamente, 2,9 milhões de partos com indivíduos nascidos vivos (BRASIL, 2012).

O cordão umbilical pode ser dividido em quatro compartimentos para obtenção de MSCs: (1) o cordão como um todo (FRIEDMAN et al., 2007; MAJORE et al., 2011; BOSCH et al., 2012), (2) a geleia de Wharton juntamente com as artérias e veias (NAGAMURA-INOUE & HE, 2014), (3) as lining cells dos vasos sanguíneos do cordão (KITA et al., 2010; DEUSE et al., 2011) e (4) o tecido perivascular (SARUGASER et al., 2005; BAKSH, YAO & TUAN, 2007; ZEBARDAST, LICKORISH & DAVIES, 2010).

Após o isolamento de tipos celulares da geleia de Wharton do cordão umbilical por McElreavey et al. (1991), a obtenção de precursores mesenquimais após a digestão enzimática dos vasos sanguíneos do cordão umbilical por Romanov, Svintsitskaya & Smirnou (2003) e a caracterização de células obtidas a partir do tecido perivascular em MSCs por Sarugaser et al. (2005), propõe-se a obtenção, cultivo e caracterização das células obtidas a partir da digestão enzimática do tecido perivascular do cordão umbilical de cães, tendo como hipótese, que essas células apresentem características semelhantes as descritas para a espécie humana, sendo classificadas como MSCs. Consequentemente,

obtenha-se uma nova fonte de MSCs que atenda tanto a medicina humana, através dos modelos animais em pesquisa, quanto a medicina veterinária como uma nova opção para terapia celular.

MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dos procedimentos de coleta e processamento dos cordões umbilicais de cão foram baseados nos protocolos desenvolvidos para humanos por Sarugaser et al. (2005), sendo adaptados às características anatômicas daquela espécie. A metodologia desse trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa sob protocolo nº 56/12.

Obtenção dos cordões umbilicais

Dez UCs foram coletados de cesarianas terapêuticas realizadas no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo critérios de inclusão para coleta a viabilidade fetal e a ausência de processos infecciosos relacionados ao parto tais como, leucocitose, neutrofilia, desvio à esquerda, confirmados por hemograma.

Os UCs foram acondicionados, individualmente, em tubos com fundo cônico de 50 mL contendo 80% de meio de cultura celular α -MEM e 20% de antimicrobianos (penicilina, gentamicina e anfotericina B) correspondendo a um volume total de 40 mL de meio.

Um cordão umbilical (UC) foi processado para análise histológica da anatomia a fim de avaliar a ramificação dos vasos sanguíneos e sua disponibilidade nos segmentos no UC. Para isso, ele foi fixado em formol tamponado a 10%, desidratado em soluções crescentes de álcool, diafanizado em xilol, incluído em parafina, seccionado em cortes de 5 μ m de espessura. As lâminas foram então desparafinizadas, rehidratadas e coradas com hematoxilina-eosina. Após nova desidratação, as lâminas foram montadas com lamínula.

Os nove cordões restantes foram medidos, com régua milimetrada estéril, e dissecados em capela de fluxo laminar no Laboratório de Física Biológica do Departamento de Física da UFV para isolamento dos vasos sanguíneos, juntamente com o tecido perivascular, com auxílio de pinça anatômica e tesoura de Metzenbaum, ambas estéreis. Posteriormente, os vasos sanguíneos foram ligados, unindo suas extremidades, com fio cirúrgico de náilon 3-0.

Obtenção das MSCs perivasculares do cordão umbilical

Para obtenção das MSCs perivasculares, os UCs foram submetidos ao protocolo de digestão enzimática. Com esse intuito, os UCs foram imersos em solução de colagenase (100 U/mL) e hialuronidase (0,01 U/mL), sendo incubados a 37°C sob agitação discreta.

O tempo ideal de completa digestão dos vasos sanguíneos, sem atingir seu lúmen, foi determinado com contagens seriadas a cada 15 minutos. Após esse procedimento, os vasos foram descartados e a solução centrifugada a 1500 RPM por dez minutos, descartando-se o sobrenadante.

O precipitado foi resuspendido em 5,0 mL de tampão fosfato-salino estéril (PBS) aquecido a 37°C. Uma alíquota de 0,5 mL foi obtida e o restante da amostra (4,5 mL) foi centrifugado novamente. Em seguida, foi adicionado 4,5 mL de cloreto de amônio à alíquota de 0,5 mL com a finalidade de destruir qualquer hemácia presente na amostra, então, essa solução foi misturada e incubada a 4 °C por 10 minutos.

Após esse procedimento, a amostra foi centrifugada por cinco minutos, parte do sobrenadante foi removido, deixando-se um volume final de 1 mL, o precipitado foi resuspendido e uma amostra de 50 µL foi retirada para contagem das células utilizando azul de tripan 0,4% em câmara de Neubauer, na diluição de 1:1.

Cultivo celular

Do restante da amostra (4,5 mL) que havia sido centrifugado novamente, foi descartado o sobrenadante e, então, foi acrescido o meio de cultivo celular aquecido ao pellet para plaqueamento em garrafas de cultura celular de 25 cm², na densidade de 3.000 células/cm², sendo o meio trocado a cada dois dias. A cada troca de meio a garrafa foi lavada com PBS aquecido e adicionado meio de cultivo, também aquecido.

Uma vez atingida uma confluência de aproximadamente 80 a 90%, foi feita a tripsinização das células, a fim de soltá-las da garrafa de cultivo. Para tal, o meio foi aspirado e a cultura celular foi lavada três vezes com PBS aquecido, então foi adicionado o volume de tripsina-EDTA 0,25%, também aquecida, correspondente ao tipo de garrafa ou poço que estava sendo utilizado para o cultivo (2 mL para garrafas de 25 cm² e poços de 8,96 cm² e 4 mL para garrafas de 75 cm²).

Após cinco minutos, havendo a soltura de todas as células do fundo da garrafa, a reação foi interrompida com uso de meio de cultivo, para, então, ser realizado o procedimento de contagem celular. Caso não houvesse a soltura das células, aguardava-se mais 1 a 2 minutos e, então, era feita nova avaliação da aderência das células.

Em seguida, uma nova contagem foi realizada e as células passavam por um novo plaqueamento, agora na densidade de 1.333 células/cm² em garrafas de cultura celular de 75 cm², sendo esse procedimento considerado como uma passagem. O meio também foi trocado a cada dois dias.

O tempo necessário para se realizar a primeira passagem, assim como as demais passagens, foi anotado.

Curva de crescimento e tempo de duplicação

Para definição do melhor meio de cultivo, o pellet formado após a centrifugação da solução enzimática e contagem na câmara de Neubauer, foi plaqueado (na densidade de 3.000 células/cm²) em três meios de cultivo diferentes: 1) α -MEM simples, constituído de 80% de α -MEM + 10% de soro fetal bovino + 10% de solução antibiótica; 2) α -MEM enriquecido composto por 74,2% de α -MEM + 15% de soro fetal bovino qualificado para células-tronco mesenquimais + 10% de solução antibiótica + 0,4% de aminoácidos essenciais + 0,4% de L-glutamina; 3) meio SIMOM formado por 37,1% de D-MEM alta glicose + 37,1% de D-MEM sem glicose + 15% de soro fetal bovino qualificado para células-tronco mesenquimais + 10% de solução antibiótica + 0,4% de aminoácidos essenciais + 0,4% de L-glutamina.

Para cada um desses meios foram feitos o tempo de duplicação e a curva de crescimento, sendo que aquele que apresentou o melhor resultado nesses testes foi o escolhido para o ensaio de diferenciação.

A curva de crescimento foi obtida após o cultivo de células em segunda passagem (P2) utilizando poços de 8,96 cm², em placas de seis poços, na densidade de 4x10⁴ célula/poço sendo o meio trocado a cada 2 dias e, a cada dia, foi feita a tripsinização do poço e a contagem do número de células. Esse teste foi feito por 10 dias em triplicata, para cada dia, para os três meios de cultivo.

Para obtenção do tempo de duplicação, células em P2 foram cultivadas na densidade inicial de 3x10⁵ células em garrafas de cultivo celular de 75 cm², sendo o meio trocado a cada 2 dias e a tripsinização realizada a cada 4 dias (independente da confluência). A cada tripsinização foi realizada a contagem das células e plaqueamento em novas garrafas, mantendo a densidade inicial. Esse teste foi feito até a décima passagem e em triplicata para cada meio.

Indução em linhagens mesenquimais

Após os resultados dos testes acima, células de quarta passagem (P4) foram utilizadas para a avaliação da multipotência, sendo submetidas a meios de indução osteogênica, condrogênica e adipogênica.

Para cultura osteoblástica, as células foram cultivadas no meio SIMOM em poços de 8,96 cm² até atingirem 65% de confluência. Atingida a confluência, o poço foi lavado três vezes com PBS aquecido, para remoção do meio de cultivo, e o meio indutor (também aquecido) foi fornecido à cultura celular.

O meio osteogênico utilizado foi preparado na seguinte proporção: 88% do melhor meio basal testado, 5% de soro fetal bovino qualificado para células-tronco mesenquimais (SFB-MSC), 7% de solução de antibióticos (ATB) e 1% de dexametasona. O meio foi trocado a cada dois dias, sendo que a partir da segunda troca de meio passou-se a adicionar 10 µL/mL de ácido ascórbico e, a partir do quarto dia, 10 µL/mL β-glicerofosfato.

Após 14 dias, o meio de indução foi removido, as culturas foram lavadas com PBS aquecido, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas três vezes com água deionizada, coradas com Vermelho de Alizarina por cinco minutos e avaliadas em lupa estereoscópica. Após esse procedimento, a coloração foi removida com álcool 70% e coradas com von Kossa seguindo as recomendações de Bonewald et al. (2003) e, então, avaliadas sob microscopia de luz invertida.

Para indução condrogênica, as células foram cultivadas em pellet, na densidade de 4x10⁵ células em tubos de fundo cônico de 15 mL. O meio indutor foi composto por 45% de D-MEM sem glicose, 45% de D-MEM alta glicose e 50 µL/mL de fator transformador do crescimento β (TGF-β). O meio foi trocado a cada dois dias, não sendo realizada a lavagem com PBS aquecido.

Após 21 dias de cultivo, os pellets foram fixados com paraformaldeído a 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, lavados três vezes com PBS e corados com Alcian Blue por duas horas, então foram processados para avaliação histológica convencional.

Para cultura de adipócitos, as células foram cultivadas em poços de 8,96 cm² contendo meio SIMOM até atingirem 70% de confluência, então, os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37°C. Em seguida, foi fornecido o meio indutor adipogênico (também aquecido), constituído de 88% do melhor meio basal testado, 5% de SFB-MSC e 7% de solução de ATB, e, suplementado com 0,5 µL/mL de biotina, 1,7x10⁻³ µL/mL de ácido pantotéico, 0,1 µL/mL de rosiglitazona, 0,1 µL/mL de insulina bovina, 1 µL/mL de isobutil-metilxantina e 1 µL/mL de dexametasona. A cada dois dias era feita a troca do meio.

Após 21 dias de cultivo, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por uma hora, lavadas com água deionizada, coradas com Oil Red O por cinco minutos e, posteriormente, analisadas sob microscopia de luz invertida.

A cada troca de meio, nas culturas osteoblásticas e de adipócitos, era feita a lavagem da cultura com PBS aquecido a 37°C apenas uma vez.

Análise dos dados

Os dados obtidos para proliferação celular, duplicação e tempo de digestão foram avaliados por ANOVA para um ou dois fatores, conforme o caso. Quando não foram cumpridas as premissas da ANOVA, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O teste de Tukey foi utilizado como pos-hoc para todas análises. Todos os testes foram realizados no SigmaPlot 11.0, considerando 5% de nível de significância. Os resultados dos testes de diferenciação foram analisados qualitativamente.

RESULTADOS

O UC de cães apresentou, macroscopicamente, dois grandes vasos sanguíneos com ramificações, sendo originados da placenta e inseridos no umbigo do feto (Figura 1 A).

A análise histológica do UC revelou um tecido bem vascularizado com numerosas artérias e veias, sendo duas artérias de maior calibre mais evidentes nas lâminas obtidas (Figura 1 B e C). Os vasos são separados por matriz extracelular pouco corada, amorfa, que constitui o tecido conjuntivo mucoso, denominado geleia de Wharton. Todo o tecido é revestido por um epitélio simples – o epitélio amniótico.

O tempo médio para digestão dos vasos utilizados (n=9) sem que ocorresse a ruptura dos mesmos foi de 328,7 minutos ($\pm 41,8$) e a quantidade média de células obtidas nesse procedimento foi $4,8 \times 10^5$ por UC digerido ($\pm 1,4$), sendo o tamanho médio dos UCs de 5,3 centímetros ($\pm 1,3$). Portanto, obteve-se em média $9,98 \times 10^4$ células a cada centímetro de UC. Todos os UCs utilizados geraram culturas homogêneas com células aderentes e em formato fibroblastoide (Figura 2 A), 24 horas após o plaqueamento.

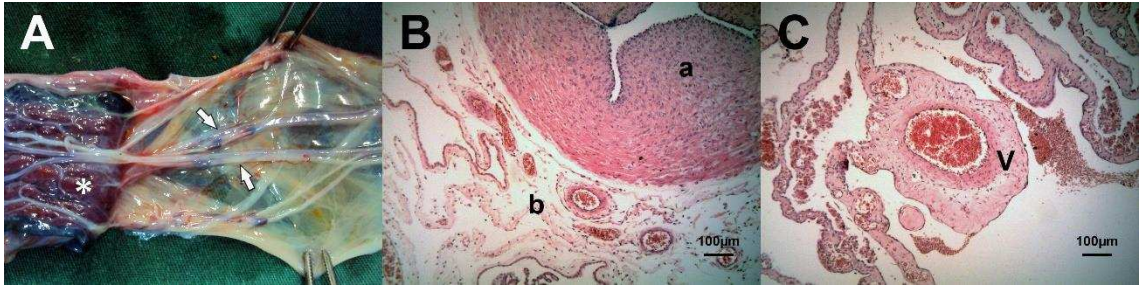


Figura 1: Aspectos macro e microscópico do cordão umbilical de cão. A – Fotografia do cordão umbilical de cão obtido após cesariana terapêutica com feto vivo. Presença de dois grandes vasos principais (seta branca) e placenta (*). B – Fotomicrografia do cordão umbilical de cão evidenciando uma artéria principal (a) circundada por um complexo arteriovenoso menor (b) (H&E). C – Fotomicrografia do cordão umbilical de cão evidenciando uma veia principal (v) (H&E).

O tempo médio necessário para atingir a confluência de 80 a 90% e realizar a primeira passagem foi de 6 dias ($\pm 1,3$), não havendo diferença estatística entre os três meios utilizados ($p=0,449$). O tempo necessário para as demais passagens foi de 7 dias (da segunda até a décima passagem) para os meios α -MEM simples e α -MEM enriquecido, 4 dias para o meio SIMOM, até quarta passagem, a partir do qual foram necessários 5 dias para atingir a confluência de 80 a 90%, tempo que se manteve até a sexta passagem, subindo para 7 dias na sétima passagem (P7) e mantendo-se assim até a décima passagem.

A partir de P7, em todos os meios, as células apresentaram mudança em seu formato convencional, tornando-se poligonais, apresentando alto conteúdo citoplasmático, algumas com presença de vacúolos e queda no número de células obtidas (Figura 2 B), sendo que até a décima passagem houve uma queda brusca no número de células e a partir desse momento foi feito o descarte das mesmas.

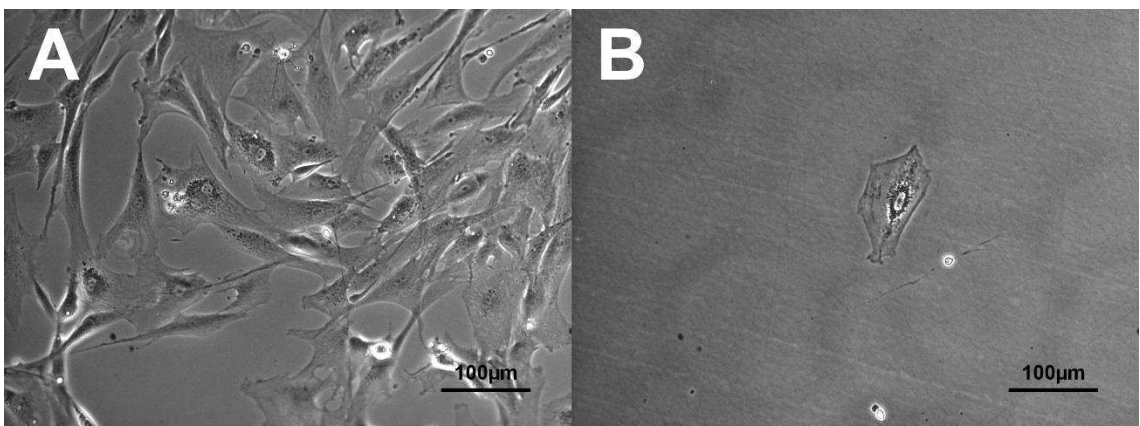


Figura 2: Fotomicrografias das células obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical de cão. A – Linhagem celular aderente, em formato fibroblastoide, em quarta passagem com confluência de aproximadamente 60% cultivadas em meio SIMOM. B – Célula aderente, em formato poligonal, com alto conteúdo citoplasmático, em nona passagem, cultivada em meio SIMOM.

Nos três meios testados a fase estacionária (lag) foi de 0 a 24 horas. No meio α -MEM simples, essa fase foi seguida por uma fase de crescimento que durou de 24 a 72 horas, seguida por mais 24 horas de uma fase estacionária para, então, entrar em uma fase de crescimento que durou 48 horas e, posteriormente, em uma fase de decadência (Figura 3 A). Para o meio α -MEM enriquecido, a fase lag foi seguida por uma fase de crescimento de 24 a 96 horas, uma fase estacionária de 24 horas, seguida, também, por fase de crescimento que, assim como o meio anterior, durou cerca de 48 horas para, então, entrar na fase de decadência (Figura 3 B). Para o meio SIMOM, não houve uma fase nova estacionária após a fase lag inicial, e sim, uma fase de crescimento que durou de 24 a 168 horas, seguida então por uma brusca fase de decadência (Figura 3 C).

Houve diferença entre os meios para a curva de crescimento nos testes ANOVA para dois fatores (meio x tempo) e teste de Tukey, sendo o SIMOM superior aos outros dois meios para menor tempo em fase lag ($p < 0,001$) e maior tempo em fase de crescimento ($p < 0,001$). Também houve diferença estatística entre os meios α -MEM enriquecido e ao α -MEM simples nos mesmos critérios ($p < 0,001$), sendo o primeiro superior ao segundo.

Para todos os meios, a partir do sétimo dia, houve diferença estatística quando comparado aos outros dias anteriores ($p < 0,001$). Ainda houve diferença quando as duas variáveis foram analisadas em conjunto, ou seja, há interação entre as variáveis meio e tempo na proliferação celular, sendo o meio SIMOM superior aos outros meios a partir do quinto dia ($p < 0,001$).

Os resultados para o teste de duplicação estão expostos na figura 3. Para o meio α -MEM simples até a terceira passagem o tempo para se atingir a duplicação do número celular foi de 130 horas, aproximadamente, caindo para 80 horas na quarta passagem, 45 horas na quinta e sexta passagem e depois com tempos crescentes até a décima passagem (91, 105, 140 e 194 horas, respectivamente, para a sétima, oitava, nova e décima passagens). Para o meio α -MEM enriquecido o tempo de duplicação manteve-se em aproximadamente 20 horas até a sexta passagem, a partir do qual apresentou valores crescentes. O meio SIMOM apresentou resultados semelhantes aos demais, no entanto, com tempos reduzidos para se atingir a duplicação, mantendo-se entre 15 horas até a sexta passagem e, posteriormente, valores crescentes até a décima passagem (39, 41, 51 e 56 horas, respectivamente, para a sétima, oitava, nova e décima passagens). O teste ANOVA indicou diferença entre os grupos ($p < 0,001$), contudo, o teste de Tukey não indicou entre quais observações havia a diferença.

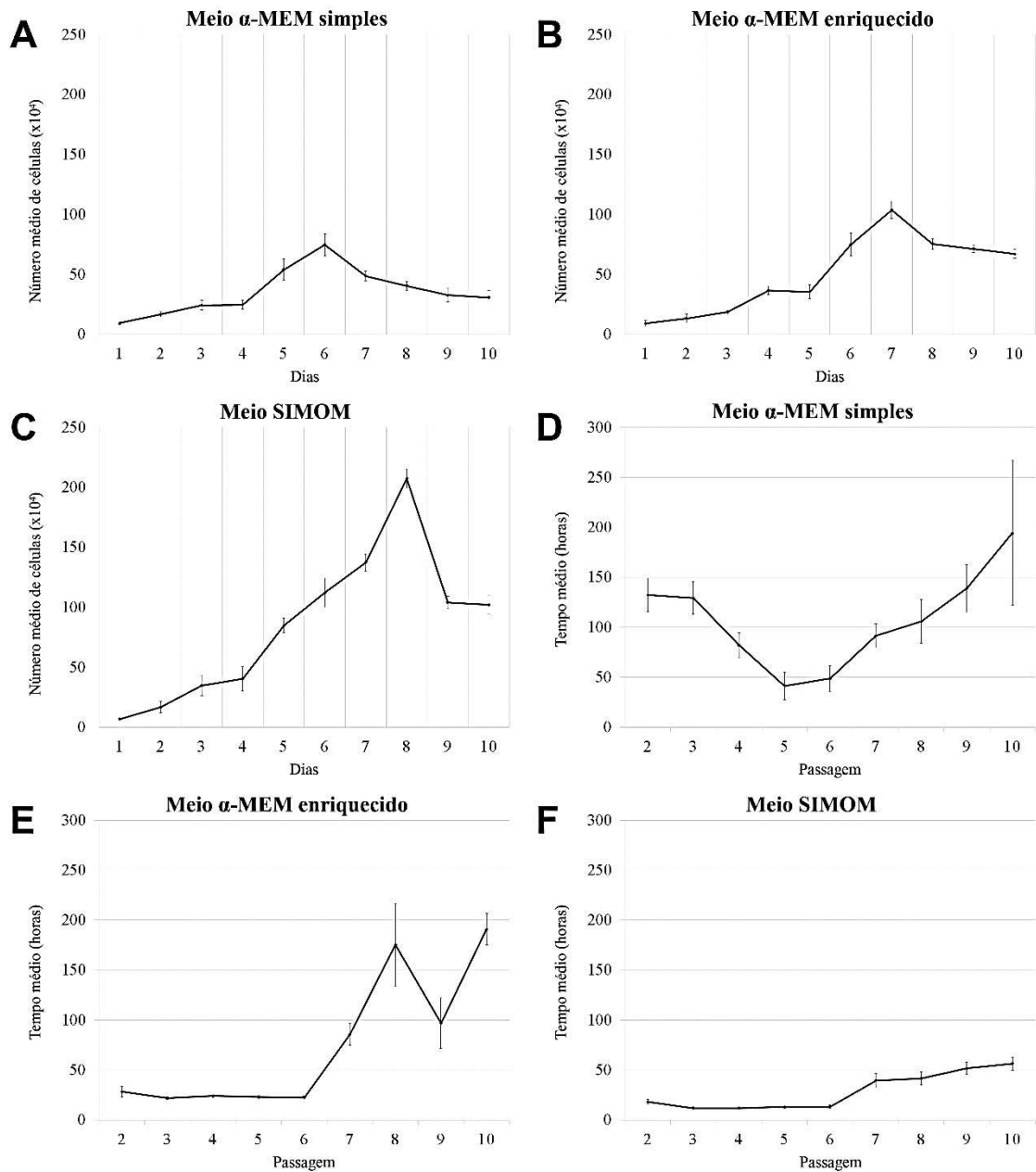


Figura 3: Curvas de crescimento e do tempo de duplicação de células obtidas do tecido perivascular de cães. A – Curva de crescimento, com número médio de células ($\times 10^4$) e desvio-padrão, obtida após cultivo no meio α -MEM simples. B – Curva de crescimento, com número médio de células ($\times 10^4$) e desvio-padrão, obtida após cultivo no meio α -MEM enriquecido. C – Curva de crescimento, com número médio de células ($\times 10^4$) e desvio-padrão, obtida após cultivo no meio SIMOM; D – Tempo médio de duplicação e desvio-padrão em horas obtido após cultivo no meio α -MEM simples. E – Tempo médio de duplicação e desvio-padrão em horas obtido após cultivo no meio α -MEM enriquecido. F – Tempo médio de duplicação e desvio-padrão em horas obtido após cultivo no meio SIMOM.

Diante dos resultados expostos, o meio SIMOM foi escolhido como meio a ser utilizado para os testes de diferenciação. Os resultados do teste de diferenciação estão expostos na figura 4.

As células utilizadas para a diferenciação osteoblástica formaram um tapete celular espesso atingindo confluência de 100% do poço em 7 dias. A partir desse

momento, não foi observado crescimento celular, mas uma mudança no formato das células que passaram de um formato estrelado para um mais alongado, formando feixes em diversas direções, cujas as bordas desprendiam-se do fundo do poço. A partir desse momento também foi possível perceber regiões com acúmulo de material celular em formato oval que apresentava-se espesso à microscopia de luz invertida (Figura 4 A). Aos 14 dias, em todos os poços cultivados (n=6) com meio osteogênico, a matriz extracelular foi corada com vermelho de Alizarina e, posteriormente, os nódulos corados com von Kossa (Figura 4, B e C, respectivamente). Também foi possível observar, à microscopia de luz invertida, a presença de nódulos em todas as culturas osteogênicas (Figura 4 D).

Na cultura de condrócitos os pellets (n=6) utilizados mantiveram-se íntegros até o final do cultivo adquirindo um formato esférico a partir do segundo dia de cultivo, mantendo-se assim até os 21 dias (Figura 4 E). Todos os pellets utilizados foram corados com Alcian Blue (Figura 4 F).

Assim como as células utilizadas para a linhagem osteoblástica, as da cultura de adipócitos formaram um tapete celular com 100% de confluência a partir do sétimo dia com a mudança do formato das células, porém, o conteúdo citoplasmático dessa cultura mostrou-se discretamente maior quando comparado à osteogênica (Figura 4 G). Aos 14 dias foi possível observar, à microscopia de luz invertida, em todas as culturas (n=6) presença de células com vacúolos citoplasmáticos abundantes e birrefringentes, além de perda do formato alongado, adquirindo uma morfologia poligonal (Figura 4 H). Todas as culturas coraram-se com Oil Red O (Figura 4 I).

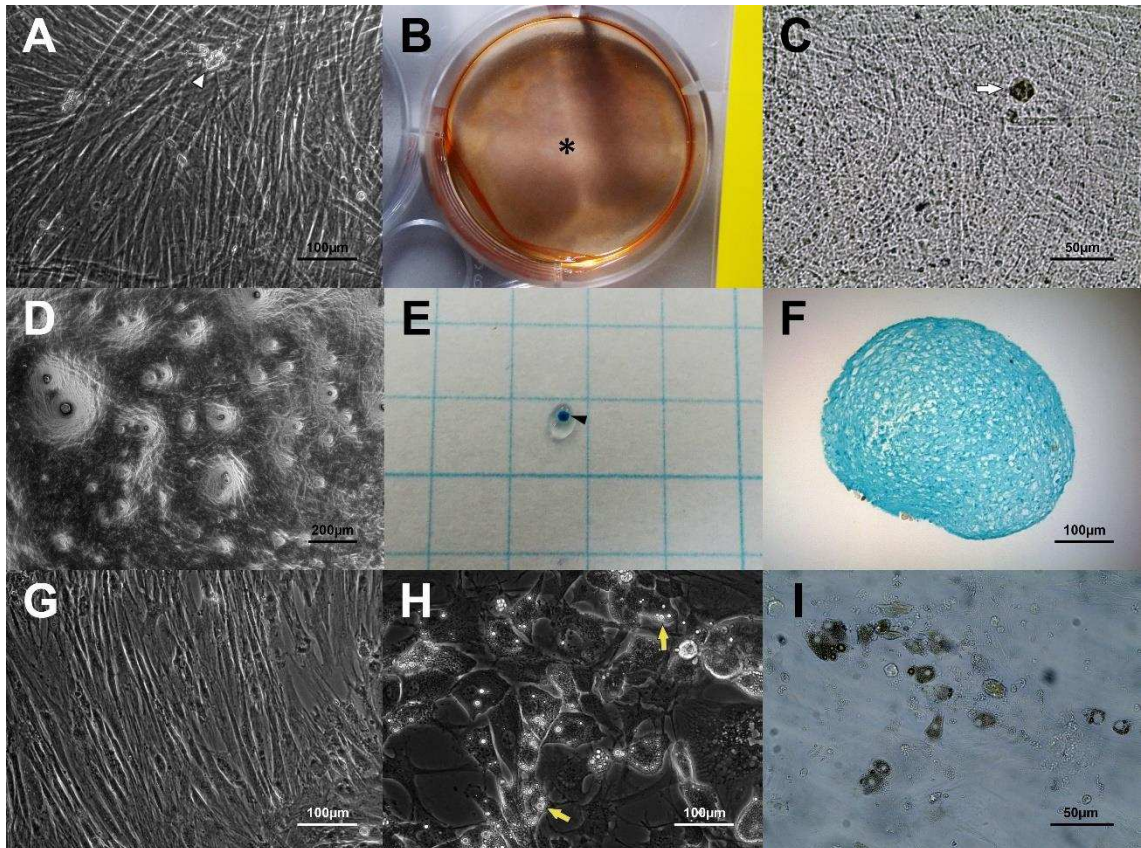


Figura 4: Resultados dos ensaios de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica para células obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical de cães. A – Morfologia das células submetidas a indução osteoblástica após 7 dias de cultivo apresentando confluência de 100% e formato alongado. Presença de estrutura em formato oval (ponta de seta branca). B – Cultura celular após 14 dias de indução osteogênica corada por vermelho de Alizarina demonstrando produção de cálcio pelas células (*). C – Cultura celular após 14 dias de indução osteogênica corada por von Kossa evidenciando um nódulo corado (seta branca) e produção de cálcio pelas células. D – Múltiplos nódulos microscópicos formados após 14 dias de indução osteogênica. E – Aspecto macroscópico do pellet submetido a indução condrogênica (ponta de seta preta) corado por Alcian Blue. F – Aspecto microscópico do pellet submetido a indução condrogênica, após processamento histológico, corado por Alcian Blue evidenciando a produção de proteoglicanos pelas células. G – Morfologia das células submetidas a 7 dias indução adipogênica apresentando um formato alongado. H – Morfologia das células submetidas a 21 dias de indução adipogênica apresentando formato poligonal, birrefringência e grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos (seta amarela). I – Cultura celular após 21 dias de indução adipogênica coradas por Oil Red O evidenciando vacúolos de gordura.

DISCUSSÃO

Devido a necessidade de conhecer e confirmar os aspectos morfológicos do cordão umbilical de cães, foram feitas as análises macro e microscópicas, sendo que os achados estão de acordo com o relatado como normal para essa espécie, apresentando duas artérias principais de maior calibre, uma veia principal e um complexo arteriovenoso menor. Todas essas estruturas possuem origem na placenta e dirigem-se ao umbigo do feto (MIGLINO et al., 2006; PRETZER, 2008).

Miglino et al. (2006) em um estudo morfológico sobre a gestação de carnívoros domésticos relataram que esses vasos são importantes para a nutrição embrionária e que

nesses vasos existem progenitores vasculares que, com o avançar da gestação, estimulam o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a fim de suportar a demanda nutricional do embrião. Os autores também comentaram que esses progenitores são um tipo de célula-tronco, portanto, os vasos sanguíneos que compõem o cordão umbilical de cães e gatos podem ser uma fonte de células-tronco.

O tempo necessário para a digestão enzimática do tecido perivascular do cordão umbilical de cães mostrou ser relativamente rápido quando comparado ao procedimento descrito por Sarugaser et al. (2005) para os vasos da espécie humana, onde o tempo médio foi de 18 a 24 horas. Diferente do protocolo usado por Sarugaser et al., (2005), que contou apenas com colagenase, o coquetel enzimático usado nesse trabalho teve a adição de hialuronidase, ato que pode ter contribuído para a queda no tempo necessário para a digestão do tecido perivascular sem que ocorresse a ruptura dos vasos sanguíneos, já que essa enzima é capaz de digerir o ácido hialurônico (SUGIMOTO et al., 2004; TSILEMOU et al., 2004; DEEPA et al., 2007; JUNE & FYRIE, 2009).

O ácido hialurônico é componente da matriz extracelular de tecidos conectivos, nervosos e epiteliais, assim como dos vasos sanguíneos como demonstrado por West et al. (1985), dessa forma sua adição ao coquetel de digestão é extremamente benéfica.

O tempo para obtenção de uma cultura homogênea foi mais rápido do que os descritos para obtenção de MSCs da medula óssea canina, em que o tempo médio para se obter uma cultura de células aderentes e em formato fibroblastoide variou de 24 horas (CHEN et al., 2014) a 2-3 dias (TAKEMITSU et al., 2012; ZHU et al., 2013). Contudo, o tempo de obtenção foi maior do que aqueles que utilizaram um gradiente de separação como método de obtenção das MSCs da medula óssea, em que o tempo médio foi de 30 minutos (CHEN et al., 2014; PENHA et al., 2014).

Quando comparados ao tempo de obtenção de MSCs do tecido adiposo de cães, os resultados são diversos. Vieira et al. (2010), utilizando o tecido adiposo da região lombossacra de cães, conseguiram uma cultura homogênea após 15 minutos de digestão enzimática com colagenase, enquanto Neupane et al. (2008) relataram que o tempo ideal para a digestão enzimática da gordura subcutânea, inguinal e omental era de aproximadamente 7 horas.

De uma maneira geral, mesmo com diferentes métodos de obtenção, o tipo celular descrito nesse trabalho, apresentou rapidez de obtenção de uma cultura primária com características iniciais de MSCs (DOMINICI et al., 2006), característica importante quando se pensa em sua utilização na terapia celular, principalmente no planejamento terapêutico para cada caso e na criação de um banco de células.

Todavia, culturas primárias raramente são utilizadas em procedimentos experimentais utilizando células-tronco, devido à heterogeneidade que essa cultura apresenta, além do período de adaptação das células às condições de cultivo e expansão *in vitro*. Dessa forma, o tempo de duplicação e a obtenção de células em passagens avançadas, como a quarta ou quinta, sejam resultados mais interessantes, quando se pensa na aplicação prática das células numa rotina clínica.

A quantidade de células obtidas a partir da digestão enzimática do tecido perivascular dos vasos sanguíneos foi menor do que a obtida por Sarugaser et al. (2005) utilizando os vasos sanguíneos da espécie humana. Nesse estudo, os autores obtiveram entre 2 a 5×10^6 células por cordão, contudo, o tamanho dos cordões utilizados variou de 10 a 30 cm, enquanto que o da espécie canina variou entre 3 a 7 cm. Acredita-se que como o tecido perivascular está presente nos vasos sanguíneos em uma configuração tridimensional, o diâmetro dos vasos pode ter influência na quantidade de células obtidas por digestão, no entanto, essa mensuração não foi realizada.

O tempo médio necessário para o crescimento celular até uma confluência entre 80 e 90% mostrou-se dentro do descrito por outros autores utilizando outras metodologias de obtenção e diferentes fontes de MSCs (KERN et al., 2006; ZUCCONI et al., 2010; IFTIMIA-MANDER et al., 2013; BARBERINE et al., 2014).

A mudança na morfologia celular e queda no número de células obtidas a partir de P7 sugerem que, após esse período, as células começam a entrar em senescência. Bonab et al. (2006) descreveram as características de MSCs em senescência *in vitro* que, dentre outras, destaca-se a perda acentuada no potencial de proliferação e redução das funções biológicas.

Vários fatores podem contribuir para a senescência de células, como contaminação cruzada e/ou microbiana, estresse oxidativo, exposição a luz ultravioleta, baixa disponibilidade de nutrientes e o encurtamento dos telômeros, sendo o último uma característica do fenômeno típico de Hayflick (PARK, MORRISON & CLARKE, 2004; WANG et al., 2006; RUBIO et al., 2010). Esse estudo pioneiro no envelhecimento celular indica que a cada divisão, os telômeros do DNA, responsáveis por essa divisão, ficam ligeiramente mais curtos, o que eventualmente irá cursar com um comprimento crítico, a partir do qual, a senescência irá ocorrer (HAYFLICK & MOORHEAD, 1961). Rubio et al. (2010) ainda comentaram que a senescência está relacionada a morte celular onde, após o fenômeno de queda do potencial de crescimento, as células passam por uma transformação que cursará com apoptose. Hayflick & Moorhead (1961) afirmaram que o encurtamento dos telômeros ocorre após cerca de 50 divisões celulares. Bonab et al

(2006) utilizando MSCs descreveram que o período de vida dessas células, quando mantidas em constante expansão *in vitro*, é de 120 dias, entretanto, não afirmaram com clareza se a senescência inicia-se antes ou após esse período.

Dessa maneira, diante da observação da perda do potencial de crescimento das células após P7, cerca de 40 dias de cultivo, pode-se pensar que as células obtidas do tecido perivascular dos vasos sanguíneos do cordão umbilical de cães apresentam uma vida curta quando mantidas em expansão *in vitro*, porém, frente ao que foi exposto por Rubio et al. (2010), é possível pensar que o fenômeno de senescência inicia-se a partir desse momento, mas que a morte celular propriamente dita deva ocorrer em um período posterior, como os 120 dias relatados por Bonab et al. (2006). Contudo, mesmo que não ocorra morte celular a partir de P7, a queda do potencial de proliferação e, principalmente, a possibilidade de perda das funções biológicas das células contraindicam o seu uso para cultivo e, possivelmente, para terapia celular, a partir dessa passagem.

Os resultados da curva de crescimento demonstraram normalidade para todos os meios testados, sendo as três principais fases, lag, crescimento e decaimento/morte celular, evidentes em todos os meios testados, contudo, o meio SIMOM apresentou melhores resultados quando comparado aos outros meios testados. O mesmo foi observado no tempo de duplicação, onde o meio SIMOM apresentou um tempo visivelmente menor para que houvesse a duplicação, apesar da falha estatística em apontar essa diferença.

Diante da formulação de cada meio, observa-se que a principal diferença entre o meio SIMOM e os outros dois é a concentração de glicose na solução final, cerca de 5 vezes maior. Heiden et al. (2001) relataram a influência que diferentes fatores de crescimento têm sobre o comportamento celular e como estes podem ser influenciados e influenciar o metabolismo e requerimento de glicose por parte das células. Os autores descreveram que diferentes concentrações de glicose influenciam a quantidade de fatores de crescimento que serão produzidos pelas células, que por sua vez, irão influenciar o crescimento e proliferação da própria célula, assim como aquelas ao seu redor. Outro fator importante é que quanto mais glicose disponível, mais ciclos serão formados, mais fatores de crescimento serão produzidos e, conseqüentemente, maior será o metabolismo celular e, com isso, maior será o crescimento celular e sua taxa de proliferação.

Entretanto, os mesmos autores discutem que esse ciclo de alto metabolismo celular, promovido pelo meio rico em fatores de crescimento e glicose, torna as células “viciadas” a essa condição, sendo que pequenas alterações no ciclo (como a queda da

oferta de glicose, por exemplo) podem desencadear mecanismos de apoptose, culminando com a morte celular.

Diante disso, apesar do meio SIMOM ser de fato vantajoso quanto ao crescimento e proliferação celular, existe a chance de que as células fiquem extremamente adaptadas a esse meio, e que qualquer alteração, possa culminar com a morte das células de forma precoce. No entanto, durante todo o período de trabalho não foi observada nenhuma mudança evidente no comportamento das células, até P7, com uma frequência de troca de meio de 48 horas e um volume de 8 mL a cada troca.

Assim sendo, recomenda-se o uso do meio SIMOM para o cultivo a fim de obter-se grande quantidade de células, em um tempo curto, quando se cogita a aplicação clínica das mesmas. Porém, recomenda-se que o volume e a frequência de troca de meio sejam os descritos nesse trabalho.

O ensaio de diferenciação para a linhagem osteoblástica apresentou resultados semelhantes aqueles relatados por outros autores (SARUGASER et al., 2005; HSIEH et al., 2010; MENNAN et al., 2013; CHEN et al., 2014) com a formação de nódulos e produção de cálcio, confirmado pela coloração vermelho de Alizarina e von Kossa, como recomendação da International Society for Cellular Therapy (ISCT) relatado por Dominici et al. (2006). No entanto, não foram observados nódulos macroscópicos na cultura como relatado por Sarugaser et al. (2005) e Birmingham et al. (2012). Esse fato pode ter ocorrido como uma característica do tipo celular, além de características de proliferação e cultivo, estando relacionado tanto a espécie, quanto ao menor tempo de indução osteoblástica, quando comparada ao 21 dias descrito pelos autores, além do local de obtenção das células.

Hsieh et al. (2010) demonstraram que as MSCs do cordão umbilical apresentam um perfil genético semelhante a células-tronco embrionárias quanto ao fenótipo osteoblástico. Entretanto, afirmaram que estas apresentam uma capacidade diminuída de diferenciação *in vitro* em osteócitos, quando comparadas a MSCs obtidas da medula óssea, que facilmente diferenciam neste tipo celular. Isso demonstra que, talvez, as células obtidas a partir de aspirados da medula óssea já apresentem um certo comprometimento com a linhagem óssea. Esse fato pode ter influenciado no tamanho dos nódulos encontrados neste trabalho na diferenciação osteoblástica. Contudo, essa característica pode ser uma vantagem, sendo que as MSCs perivascularres apresentam uma gama maior de possibilidades de diferenciação quando comparadas as MSCs da medula óssea (por não apresentar comprometimento com nenhuma linhagem específica) e, dessa forma, apresentariam um potencial de uso maior *in vivo*, seguindo a demanda do nicho ao qual

estão inseridas, por exemplo, diferenciando-se mais facilmente em condrócitos em uma articulação degenerada. Porém, tais comparações não foram feitas no presente estudo.

Os resultados obtidos para a diferenciação em adipócitos e condrócitos também foram semelhantes aqueles encontrados por outros autores (KERN et al., 2006; SARUGASER et al., 2005; FONG et al., 2012; MENNAN et al., 2013) e também seguiram as recomendações da ISCT (DOMINICI et al., 2006) com a formação de vacúolos corados por Oil Red O nos adipócitos e a produção de proteoglicanos, confirmado pela coloração de Alcian Blue, nos condrócitos.

Fong et al. (2012) e Mennan et al. (2013) afirmaram que, quando comparadas às células obtidas a partir da medula óssea, as MSCs do cordão umbilical apresentam uma manutenção maior da multipotência e maior facilidade de diferenciação para a linhagem de condrócitos, respectivamente. Tal fato é claramente uma vantagem quando se pensa no potencial de uso dessas células, no entanto, como nesse estudo não foi feita a comparação entre linhagens de diferentes fontes, não é possível afirmar, com certeza, que a linhagem celular obtida do tecido perivascular de cães apresente essas qualidades, apesar do sucesso em obter-se adipócitos e condrócitos.

Os resultados do ensaio de diferenciação evidenciam o potencial de uso desse tipo celular. Apesar de acreditar que os efeitos benéficos das MSCs quando implantadas *in vivo* deva-se a fatores solúveis que agem, de forma parácrina, em células presentes no local de interesse (ZAPPIA et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2009; MADEC et al., 2009; JOO et al., 2010; NEMETH et al., 2010; PATEL et al., 2010), ainda não existe comprovação de que não haja a diferenciação dessas células *in vivo* e nem de que, uma vez controlado o processo inflamatório do tecido alvo (por exemplo, na doença periodontal), a diferenciação não ocorra quando uma segunda dose de MSCs é aplicada. Deste modo, o potencial de diferenciação descrito para as células obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical de cães é uma importante qualidade quando se cogita a aplicação clínica dessas células.

Como caracterização das células em estudo em MSCs, a obtenção de três linhagens mesenquimais, somadas as características de aderência e morfologia das células, não cumprem totalmente os requisitos mínimos necessários para a classificação desse tipo celular em MSC como recomendado pela ISCT citados por Dominici et al. (2006) e Kim & Seok-Goo, (2013) para a espécie humana. Esses autores comentam que frente ao grande interesse no estudo de MSCs com novas metodologias de obtenção, novas fontes e um número constante de comparações, foram sugeridos os critérios mínimos para classificação em MSCs a fim de padronizar as características mínimas

necessárias para a definição como MSCs e, dessa forma, evitar comparações errôneas o que poderia comprometer o avanço tecnológico no campo do cultivo e terapia celular.

A caracterização dos antígenos de superfície é extremamente importante para qualificar um tipo celular em MSC para a espécie humana. Além da linhagem mesenquimal e da linhagem hematopoiética, o estudo dos antígenos de superfície ainda avalia a pureza da cultura, ou seja, do total de células cultivadas, quantas são MSCs. Dessa forma, é recomendação da ISCT que, no mínimo, 95% das células encontradas devam ser positivas para CD73, CD90 e CD105 e, no máximo 2%, devam ser positivas para CD34, CD45, CD11b, CD14, CD19, CD79a e HLA-DR. No entanto, como recomendação da própria ISCT, a busca por marcadores de superfície deve ser realizada, obrigatoriamente, apenas para as metodologias que envolvam o uso de células obtidas a partir da espécie humana, sendo opcional, mas recomendado para outras espécies, desde de que bem caracterizado o valor do teste para a espécie animal em questão.

Estudos com MSCs da medula óssea e tecido adiposo de cães (TAKEMITSU et al., 2012) e dos vasos sanguíneos do cordão umbilical de cães (ZUCCONI et al., 2010) foram capazes de analisar, parcialmente, os marcadores de superfície desses tipos celulares, porém, não cumpriram todos os requisitos demandados pela ISCT. Contudo, associando-se as características celulares aos ensaios de diferenciação e de marcadores de superfície, os autores obtiveram sucesso na comprovação da linhagem mesenquimal e multipotência das células em questão.

Portanto, diante do exposto, acredita-se que as células obtidas a partir do tecido perivascular dos vasos sanguíneos do cordão umbilical de cães após sua digestão enzimática sejam células-tronco, sendo sua linhagem mesenquimal ainda a ser comprovada após estudo dos antígenos de superfície.

CONCLUSÃO

Com os resultados desse trabalho foi possível obter células aderentes com formato fibroblastoide, em uma cultura homogênea, após a digestão enzimática do tecido perivascular do cordão umbilical de cães em 100% das tentativas. Foi possível obter células que apresentaram características de crescimento e duplicação extremamente rápidas, demonstrando um grande potencial proliferativo. Ainda conseguiu-se com esse trabalho comprovar a multipotência das células obtidas, diferenciando-as em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, o que sugere que essas células sejam células-

tronco, porém, sua linhagem mesenquimal ainda deve ser comprovada em trabalhos futuros.

PERSPECTIVAS

Diante dos resultados apresentados nesse trabalho, têm-se como perspectivas a aplicação in vivo das MSCs obtidas do tecido perivascular do cordão umbilical do cão, utilizando-as em modelos animais para afecções de interesse, tanto na espécie humana quanto animal, como, por exemplo, doença periodontal, doença articular degenerativa e lesões ósseas críticas.

Espera-se ainda, em trabalhos futuros, realizar o estudo dos antígenos de superfície destas células, bem como a expressão gênica de diferenciação e o estudo da capacidade imunomodulatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMITAGE, J.O. Bone marrow transplantation. **New England Journal of Medicine**, v.330, p.827–838, 1994.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem Cells**, v.25, p.1384-1392, 2007.

BARBERINE, D.J.; FREITAS, N.P.P.; MAGNONI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUDANO, M.J.; GOLIM, M.J.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research & Therapy**, v.4, p.1-11, 2014.

BARLOW, S.; BROOKE, G.; CHATTERJEE, K.; PRICE, G.; PELEKANOS, R.; ROSSETTI, T.; DOODY, M.; VENTER, D.; PAIN, S.; GILSHENAN, K.; ATKINSON, K. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v.17, p.1095-1107, 2008.

BERNARDO, M.E.; EMONS, J.A.; KARPERIEN, M.; NAUTA, A.J.; WILLEMZE, R.; ROELOFS, H.; ROMEO, S.; MARCHINI, A.; RAPPOLD, G.A.; VUKICEVIC, S.; LOCATELLI, F.; FIBBE, W.E. Human mesenchymal stem cells derived from bone marrow display a better chondrogenic differentiation compared with other sources. **Connective Tissue Research**, v.48, p.132-140, 2007.

BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G.L.; MCHUGH, P.E.; SHAW, G.; BARRY, F.P.; MCNAMARA, L.M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. **European Cells and Materials**, v.23, p.13-27, 2012.

BONAB, M.M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S.H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology**, v.7, p.1-7, 2006.

BONEWALD, L.F.; HARRIS, S.E.; ROSSER, J.; DALLAS, M.R.; DALLAS, S.L.; CAMACHO, N.P.; BOYAN, B.; BOSKEY, A. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. **Calcified Tissue International**, v.73, p.537-547, 2003.

BOSCH, J.; HOUBEN, A.P.; RADKE, T.F.; STAPELKAMP, D.; BÜNEMANN, E.; BALAN, P.; BUCHHEISER, A.; LIEDTKE, S.; KÖGLER, G. Distinct differentiation potential of “MSC” derived from cord blood and umbilical cord: are cord-derived cells true mesenchymal stromal cells?. **Stem Cells and Development**, v.21, p.1977-1988, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atenção à saúde do recém-nascido: guia para profissionais de saúde**. 2 ed. Brasília, Ministério da Saúde, p.1-192, 2012.

CHEN, T.; WANG, Y.; BU, L.; LI, N. Construction of functional tissue-engineered bone using cell sheet technology in a canine model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.7, p.958-962, 2014.

DANISOVIC, L.; VARGA, I.; POLAK, S.; ULICNA, M.; HLAVACKOVA, L.; BOHMER, D.; VOJTASSÁK, J. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human

mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **General Physiology and Biophys**, v.28, p.56-62, 2009.

DEEPA, S.S.; YAMADA, S.; FUKUI, S.; SUGAHARA, K. Structural determination of novel sulfated octasaccharides isolated from chondroitin sulfate of shark cartilage and their application for characterizing monoclonal antibody epitopes. **Glycobiology**, v.17, p.631-645, 2007.

DEUSE, T.; STUBBENDORFF, M.; TANG-QUAN, K.; PHILLIPS, N.; KAY, M.A.; EIERMANN, T.; PHAN, T.T.; VOLK, H.D.; REICHENSPURNER, H.; ROBBINS, R.C.; SCHREPFER, S. Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. **Cell Transplantation**, v.20, p.655-667, 2011.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p.315–317, 2006.

FONG, C.Y.; GAUTHAMAN, K.; CHEYYATRAIVENDRAN, S.; LIN, H.D.; BISWAS, A.; BONGSO, A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.113, p.658-668, 2012.

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

FRIEDMAN, R.; BETANCUR, M.; BOISSEL, L.; TUNCER, H.; CETRULO, C.; KLINGEMANN, H. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.13, p.1477-1486, 2007.

GNECCHI, M.; MELO, L.G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. **Methods in Molecular Biology**, v.482, p.281-294, 2009.

GONZÁLEZ, M.A.; GONZALEZ-REY, E.; RICO, L.; BUSCHER, D.; DELGADO, M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Arthritis Rheumatology**, v.60, p.1006-1019, 2009.

GRUBER, H.E.; DEEPE, R.; HOELSCHER, G.L.; INGRAM, J.A.; NORTON, H.J.; SCANNELL, B.; LOEFFLER, B.J.; ZINCHENKO, N.; HANLEY, E.N.; TAPP, H. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells. **Tissue Engineering Part A**, v.16, p.2843-2860, 2010.

HAYASHI, O.; KATSUBE, Y.; HIROSE, M.; OHGUSHI, H.; ITO, H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. **Calcified Tissue International**, v.82, p.238-247, 2008.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. The serial cultivation of human diploid cell. **Experimental Cell Research**, v. 25, p.585-621, 1961.

HEIDEN, M.G.V.; PLAS, D.R.; RATHMELL, J.C.; FOX, C.J.; HARRIS, M.H.; THOMPSON, C.B. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, p.5899-5912, 2001.

HSIEH, J.Y.; FU, Y.S.; CHANG, S.J.; TSUANG, Y.H.; WANG, H.W. Functional module analysis reveals differential osteogenic and stemness potentials in human mesenchymal stem cells from bone marrow and Wharton's jelly of umbilical cord. **Stem Cells and Development**, v.19, p.1895-1910, 2010.

IFTIMIA-MANDER, A.; HOURD, P.; DAINITY, R.; THOMAS, R.J. Mesenchymal stem cell isolation from human umbilical cord tissue: understanding and minimizing variability in cell yield for process optimization. **Biopreservation and Biobanking**, v.11, p.291-298, 2013.

IN 'T ANKER, P.S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G.M.; CLAAS, F.H.; FIBBE, W.E.; KANHAI, H.H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v.22, p.1338-1345, 2004.

ISHIGE, I.; NAGAMURA-INOUE, T.; HONDA, M.J.; HARNPRASOPWAT, R.; KIDO, M.; SUGIMOTO, M.; NAKAUCHI, H.; TOJO, A. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. **International Journal of Hematology**, v.90, p.261-269, 2009.

JOO, S.Y.; CHO, K.A.; JUNG, Y.J.; KIM, H.S.; PARK, S.Y.; CHOI, Y.B.; HONG, K.M.; WOO, S.Y.; SEOH, J.Y.; CHO, S.J.; RYU, K.H. Mesenchymal stromal cells inhibit graft-versus-host disease of mice in a dose-dependent manner. **Cytotherapy**, v.12, p.361-370, 2010.

JUNE, R.K.; FHYHRIE, D.P. Enzymatic digestion of articular cartilage results in viscoelasticity changes that are consistent with polymer dynamics mechanisms. **Biomedical Engineering Online**, v.8, p.1-10, 2009.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, p.1294-1301, 2006.

KIM, N.; CHO, S-G. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Korean Journal of Internal Medicine**, v.28, p.387-402, 2013.

KITA, K.; GAUGLITZ, G.G.; PHAN, T.T.; HERNDON, D.N.; JESCHKE, M.G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. **Stem Cells and Development**, v.19, p.491-502, 2010.

MADEC, A.M.; MALLONE, R.; AFONSO, G.; ABOU MRAD, E.; MESNIER, A.; ELJAAFARI, A.; THIVOLET, C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. **Diabetologia**, v.52, p.1391-1399, 2009.

MAJORE, I.; MORETTI, P.; STAHL, F.; HASS, R.; KASPER, C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. **Stem Cell Reviews**, v.7, p.17-31, 2011.

McELREAVEY, K.D.; IRVINE, A.I.; ENNIS, K.T.; MCLEAN, W.H. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. **Biochemical Society Transactions**, v.19, p.29, 1991.

MENNAN, C.; WRIGHT, K.; BHATTACHARJEE, A.; BALAIN, B.; RICHARDSON, J.; ROBERTS, S. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. **Biomed Research International**, v.2013, p.1-8, 2013.

MIGLINO, M.A.; AMBRÓSIO, 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.

MUELLER, S.M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.82, p.583-590, 2001.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World Journal of Stem Cells**, v.6; p.195-202, 2014.

NEMETH, K.; KEANE-MYERS, A.; BROWN, J.M.; METCALFE, D.D.; GORHAM, J.D.; BUNDOC, V.G.; HODGES, M.G.; JELINEK, I.; MADALA, S.; KARPATI, S.; MEZEY, E. Bone marrow stromal cells use TGF-beta to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.107, p.5652-5657, 2010.

NEUPANE, M.; CHANG, C.C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, p.1007-1015, 2008.

PARK, I.K.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v.113, p.175-179, 2004.

PATEL, S.A.; MEYER, J.R.; GRECO, S.J.; CORCORAN, K.E.; BRYAN, M.; RAMESHWAR, P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. **Journal of Immunology**, v.184, p.5885-5894, 2010.

PENHA, E.M.; MEIRA, C.S.; GUIMARÃES, E.T.; MENDONÇA, M.V.P.; GRAVELY, F.A.; PINHEIRO, C.M.B.; PINHEIRO, T.M.B.; BARROUNIN-MELO, S.M.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Use of autologous mesenchymal stem cells derived from bone marrow for the treatment of naturally injured spinal cord in dogs. **Stem Cell International**, v.2014, p.1-8, 2014.

PONNAIYAN, D.; BHAT, K.M.; BHAT, G.S. Comparison of immunophenotypes of stem cells from human dental pulp and periodontal ligament. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.25, p.127-134, 2012.

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

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; MORETÃO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVERIA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, p.901-913, 2008.

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem Cells**, v.21, p.105-110, 2003.

RUBIO, D.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTÍN, M.C.; DE LA FUENTE, R.; CIGUDOSA, J.C.; LLOYD, A.C.; BERNAD, A. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer Research**, v.70, p.6682, 2010.

SARUGASER, R.; LICKORISH, D.; BAKSH, D.; HOSSEINI, M.M.; DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v.23, p.220-229, 2005.

SUGIMOTO, K.; IIZAMA, T.; HARADA, H.; YAMADA, K.; KATSUMATA, M.; TAKAHASHI, M. Cartilage degradation independent of MMP/aggrecanases. **Osteoarthritis and Cartilage**, v.12, p.1006-1014, 2004.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v.8, p.1-9, 2012.

TONDREAU, T.; MEULEMAN, N.; DELFORGE, A.; DEJENEFFE, M.; LEROY, R.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D.; LAGNEAUX, L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem Cells**, v.23, p.1105-1112, 2005.

TSILEMOU, A.; ASSOUTI, M.; PAPAGEORGAKOPOULOU, N.; KARAMANOS, N.K.; TSIGANOS, C.P.; VYNIOS, D.H. The presence of a novel extracellular hyaluronidase in squid cranial cartilage. **Biochimie**, v.84, p.579-586, 2004.

VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, p.279-289, 2010.

WANG, Y.; SCHULTE, B.A.; LARUE, A.C.; OGAWA, M.; ZHOU, D. Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. **Stem Cells in Hematology**, v.107, p.358-366, 2006.

WEST, D.C.; HAMPSON, I.N.; ARNOLD, F.; KUMAR, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. **Science**, v.228, p.1324-1326, 1985.

YANG, J.; SONG, T.; WU, P.; CHEN, Y.; FAN, X.; CHEN, H.; ZHANG, J.; HUANG, C. Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells. **Molecular Medicine Reports**, v.5, p.108-113, 2012.

YU, J.; WANG, Y.; DENG, Z.; TANG, L.; LI, Y.; SHI, J.; JIN, Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. **Biology of the Cell**, v.99, p.465-674, 2007.

ZANINI, C.; BRUNO, S.; MANDILI, G.; BACI, D.; CERUTTI, F.; CENACCHI, G.; IZZI, L.; CAMUSSI, G.; FORNI, M. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. **PLoS One**, v.6, p.e28175, 2011.

ZAPPIA, E.; CASAZZA, S.; PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; BONANNI, I.; GERDONI, E.; GIUNTI, D.; CERAVOLO, A.; CAZZANTI, F.; FRASSONI, F.; MANCARDI, G.; UCCELLI, A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. **Blood**, v.106, p.1755-1761, 2005.

ZEBARDAST, N.; LICKORISH, D.; DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular cells (HUCPVC): A mesenchymal cell source for dermal wound healing. **Organogenesis**, v.6, p.197-203, 2010.

ZHU, X.; YUAN, F.; LI, H.; ZHENG, Y.; XIAO, Y.; YAN, F. Evaluation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. **Zoological Science**, v.30, p.1032-1037, 2013.

ZUCCONI, E.; VIEIRA, N.M.; BUENO, D.F.; SECCO, M.; JAZEDJE, T.; AMBROSIO, C.E.; PASSOS-BUENO, M.R.; MIGLINO, M.A.; ZATZ, M. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein - a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development**, v.19, p.395-402, 2010.