



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

HIGOR DA SILVA FERREIRA

**Isolamento e identificação de populações de células-tronco mesenquimais
derivadas do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos *post-mortem***

SÃO LUÍS - MA
2018

HIGOR DA SILVA FERREIRA

Isolamento e identificação de populações de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos *post-mortem*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Profa. Ana Lucia Abreu Silva

Co-orientador: Felipe de Jesus Moraes Junior

SÃO LUÍS - MA

2018

Ferreira, Higor da Silva.

Isolamento e identificação da população de células-tronco mesenquimais derivadas do córdão umbilical e medula óssea de bubalinos *post-mortem* / Higor da Silva Ferreira, Felipe de Jesus Moraes Junior. – São Luís, 2018.

? f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva.

1. Células-tronco. 2. Mesenquimais. 3. Médula óssea. 4. Cordão

HIGOR DA SILVA FERREIRA

Isolamento e identificação de populações de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos *post-mortem*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão - Orientadora

Prof. Dr. Auricélio Alves de Macedo
Universidade Estadual do Maranhão - 1º membro

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Universidade Federal do Maranhão - 2º membro

*“As coisas nunca acontecem da
mesma maneira duas vezes ”*

C. S. Lewis

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por essa vitória em minha vida, por ter estado ao meu lado em todos os momentos desta jornada. Agradeço ao Senhor por não ter permitido que eu desistisse. E por não ter desistido de mim.

À minha mãe, Francilyz Ferreira, e ao meu pai, Francisco Alves, por terem me ensinado o valor do trabalho, da dedicação e da determinação, e por toda paciência e incentivo durante minha formação.

Ao meu irmão, Matheus Ferreira, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me ajudando em tudo que eu preciso.

À Profa. Ana Lucia Abreu Silva, por me orientar e por todas as oportunidades e pela confiança em mim depositada. Só tenho a agradecer todos esses anos que eu pude estar ao seu lado, acompanhando seu trabalho e todo dia descobrindo coisas novas.

Ao Prof. Felipe de Jesus Moraes Junior, pela orientação e por confiar a mim a realização deste trabalho, por acreditar que daria certo e por todo conhecimento compartilhado.

Aos professores, Angelica Miglino, Ricardo Macedo, Maria Claudia Sucupira, Solange de Araújo e Fábio Henrique pelos incentivos na execução deste projeto, e por ceder o espaço físico para a elaboração do experimento.

A todos do Laboratório de Anatomia Veterinária, da Universidade de São Paulo; pela acolhida, pela ajuda nos experimentos e agradável companhia em todos os momentos. Agradeço à Franceliusa Dellys (Natal), Jessica Borghesi, Lara Carolina, César Prado, Phelipe Favaron, Paulo Ramos, Marcella Kato, Isadora Adamo, e a minha querida amiga conterrânea Adriana Raquel. Obrigado por tudo. Vocês são especiais!

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal, pela ajuda e colaboração durante esses dois de pesquisa: Luciana, Felipe, Sérgio, Hallef e Brenda. Em especial à Victoria Torquato e ao Luís Roberto por terem aceitado o desafio de executarem esse projeto junto a mim.

Aos amigos do Laboratório de Anatomopatologia, por todos esses anos de convivência. Agradeço a todos vocês pela amizade e por me ensinarem o real valor e a força do trabalho em equipe: Anderson, Aarão, Isabel, Luís Gustavo, Ana Eliza, Carol, Raquel, Scarleth, Eslen, Orestes, Ailésio, Kelvin, Iara, Gabriel, Fernando, Tatiane, Nathálya, Weline.

Agradeço de modo especial à Mylena Torres, pela alegria contagiante e por ter sempre uma palavra amiga em todos os momentos. Que nós possamos ser mais como você. À Joicy Cortez de Sá, por tudo que aprendi com você, e minha gratidão não pode ser expressa em poucas linhas.

À Alessandra Lima pelas oportunidades, pela alegria e pelos momentos únicos que tive a oportunidade de passar com você.

Ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD-NF) por possibilitar a realização do mestrado interinstitucional (UEMA/USP).

À Fundação de Amparo à Pesquisa e ao desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciência Animal e ao seu corpo docente, pelos ensinamentos e por contribuírem em mais uma etapa da minha formação profissional.

À turma 2016-2018, de modo especial à Ione, Dennis, Karol, Silvia, Jayanna, Dglan, Nayara, Fabiana, Lyssandra, Cristian, Ester e Samira, nosso “Mestrado MLK”. Obrigado por todas as sociais e por tornarem esses dois anos de mestrado mais prazerosos e divertidos, mesmo nos momentos mais difíceis.

À grande amiga e parceira desse mestrado, Allana Barros. Fica aqui a certeza de duas coisas: de que tudo teria sido diferente se não tivesse passado por esta experiência contigo, que só fez com que te admirasse ainda mais, e por todos sorrisos, abraços e conversas que me animaram em todos os momentos.

Agradeço ao João Victor Aguiar, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo ombro amigo quando eu não conseguia segurar as lágrimas, por ter se tornando um dos meus melhores amigos.

Ao Breno Glaessner, por em todos esses anos ter sido meu amigo, por ter me ajudado inúmeras vezes e por ter se tornado um irmão para mim.

À Renata Mondego pela companhia constante, pelas conversas, pelos cafés, pela cumplicidade e pelo profissionalismo sem medida.

Obrigado!

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células indiferenciadas com alta capacidade de proliferação e potencial de se diferenciar em células especializadas. Elas são encontradas em tecidos como medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, ligamento periodontal e tecido adiposo. As CTM representam uma ferramenta ideal para o estudo da embriogênese *in vitro*, favorecendo o desenvolvimento de métodos eficazes para clonagem de células somáticas, transgênese e regulação de genes, o que resultaria em espécies mais resistentes e com um potencial reprodutivo mais aprimorado. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica de pluripotência e marcadores fenotípicos de células-tronco em células isoladas do cordão umbilical e medula óssea de búfalos (*Bubalus bubalis*). Após 24 horas foram observadas as primeiras adesões celulares nas placas de cultivo. Ambas as células apresentaram alta capacidade de expansão *in vitro*, confirmado pela curva de crescimento, apresentando uma confluência média de 85% no décimo quinto dia de cultura. A imunofenotipagem revelou populações de células da medula óssea positivas para o marcador de citoesqueleto Vimentina (72,7%), enquanto que não houve expressão para os marcadores de células mesenquimais e para os marcadores de pluripotência. Na análise da expressão genica por qRT-PCR em células da medula não houve expressão de nenhum dos genes analisados, enquanto que nas células do cordão umbilical foi expresso transcritos de mRNA dos genes CD29, CD44, SOX-2 e NANOG. Podemos concluir que as células mesenquimais podem ser isoladas *post-mortem* do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos (*Bubalus bubalis*), e que as características apresentadas pelas células do cordão umbilical, sugerem que estas são células-tronco mesenquimais, embora haja necessidade da realização de mais testes de caracterização.

Palavras-chaves: Búfalos, Células-tronco Mesenquimais, Medula óssea , Cordão umbilical.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated cells with a high capacity of proliferation and transformation into several specialized cells. They are found in tissues such as bone marrow, umbilical cord, dental pulp, periodontal ligament and adipose tissue. Although MSCs isolation has been already well established, in buffaloes it is still a challenge. In buffaloes, stem cells represent an ideal tool for embryogenesis study in vitro, favoring the development of effective methods for somatic cells cloning, transgenesis and gene regulation. The aim of this study was to evaluate the gene expression of pluripotency and stem cells markers in cells isolated from the bone marrow of buffaloes (*Bubalus bubalis*) *post mortem*. After isolation and cultivation, samples were frozen until the assays. Morphological analyses were made through optical and electronic microscopy. The growth curve and immunophenotyping were made by flow cytometry. After 24 hours was observed cell adhesion into culture plates. The cells showed high expansion capacity in vitro, presenting an average of 85% confluence on the fifth day of culture. Flow cytometry showed a small cell population with little granularity. The populations of bone marrow cells were positive for the marker of mesenchymal cells Vimentina (72.7%). In the analysis of the genetic expression by qRT-PCR in cells of the marrow there was no expression of any of the genes analyzed, whereas in umbilical cord cells mRNA transcripts of the genes CD29, CD44, SOX-2 and NANOG were expressed. We can conclude that as mesenchymal stem cells can be isolated post-mortem of adipose tissue and bone marrow of buffaloes (*Bubalus bubalis*), and that as characteristics presented by umbilical cord cells, confirm that these are mesenchymal stem cells.

Key words: Buffalos, Mesenchymal stem cells, Bone marrow, umbilical cord.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Fotomicrografia de células de búfalos. A. Cultura de células da medula óssea de búfalos 10x. B. Cultura de células do cordão umbilical de búfalos 10x.	34
Figura 2 - Fotomicrografia de células isoladas do cordão umbilical de búfalos. A. Células com 72 horas de cultivo observa-se uma população heterogênea, com algumas células apresentando formato fusiforme e outras, formato esférico. 20x. B. Confluência celular de 80%. Notar morfologia fibroblastóide das células e sua aderência. 40x.	35
Figura 3 - Análise morfológica de células isoladas da medula óssea de búfalos por citometria de fluxo. Notar os círculos demonstrando a identificação de duas populações de células, de tamanhos semelhantes e granulosidades diferentes.	37
Figura 4 - Gráfico da curva de crescimento de cultivo celular de medula óssea isolada de búfalos	38
Figura 5 - Gates de imunofenotipagem de células isoladas de medula óssea de búfalos em P4 por citometria de fluxo. Notar marcação positiva para o marcador de citoesqueleto (Vimentina) e as expressões quase nulas para os marcadores CK18 e Beta- tubulina.	40
Figura 6 - Gates de imunofenotipagem de células isoladas da medula óssea de búfalos em P4 por citometria de fluxo. Notar níveis baixos de expressão positiva para marcadores de células mesenquimais (CD-105, CD-90 e STRO-1) e marcação insignificante para CD-73.	42
Figura 7 – Gates de imunofenotipagem das células isoladas de	43

medula óssea de búfalos em P4 por citometria de fluxo. Notar níveis baixos de expressão positiva para marcador de proliferação celular (PCNA) e os marcadores de pluripotência (SOX-2 e NANOG) e marcação insignificante para OCT-4.

Figura 8 – Expressão gênica das células da medula óssea de búfalos por RT-PCR. Notar a expressão negativa tanto para os genes de células mesenquimais (CD29 e CD44), quanto para os genes de pluripotência (SOX-2 e NANOG). 44

Figura 9 – Expressão gênica das células das células do cordão de búfalos por RT-PCR para marcadores de células mesenquimais. Notar o aumento da expressão dos os genes de células mesenquimais (CD29 e CD44) ao decorrer das passagens 2 e 4. 45

Figura 10 - Expressão gênica das células do cordão umbilical de búfalos por RT-PCR para marcadores de pluripotência. Notar diminuição da expressão dos os genes de pluripotência (SOX -2 e NANOG) ao decorrer das passagens 2 e 4 46

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Lista de genes e primers utilizados na qRT – PCR.

31

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

% - por cento

°C - graus Celsius

CD- cluster of differentiation molecule

CFU-F - fibroblast colony-forming units

cm² - centímetros quadrados

CTMOs – células tronco mesenquimais da medula óssea

CTMs - células tronco mesenquimais

CXCL - the chemokine ligand

DECH - doença do enxerto contra hospedeiro

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

flk-3L - Fms-like tyrosine kinase **3**

g - gravidade

G-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos)

HLA-DR - Human Leukocyte Antigen – antigen D Related

ICAM - Intercellular Adhesion Molecule

IFN-γ - Interferão-gama

IL - Interleucina

ISCT - Sociedade Internacional de Terapia Celular

LFA-3 - Lymphocyte Function-Associated Antigen 3

LIF - Fator Inibidor da Leucemia

MCAM - molécula de adesão celular associada ao melanoma.

M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos)

MHC - major histocompatibility complex

mL - mililitro

Oct-4 - octamer-binding transcription factor 4

PBS - tampão fosfato-salino

PDGF-R - platelet-derived growth factor receptors

PDT - tempo de duplicação da população

pH - potencial Hidrogeniônico

SCB – sangue do cordão umbilical

SCF - Stem Cell Factor

Sox2 - sex determining region Y-box

SP - São Paulo

SSEA-4 – stage-specific embryonic antigen-4

Stro-1 - stromal Cell Surface Marker

TERT - telomerase Reverse Transcriptase

TGF-βR - transforming growth factor beta

Thy-1 - cell Surface Antigen

TNF-R - tumor necrosis factor receptor

α5β3 - alpha5/beta3

βFGF-R - beta fibroblast growth factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)	19
2.2 Células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMO)	20
2.3 Células Tronco do cordão umbilical (CTCU)	22
2.4 Perfil Imunofenotípico das CTM.....	23
2.5 Uso das células-tronco mesenquimais	24
2.6 O Búfalo como modelo para Biotecnologias	26
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral	27
3.2 Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DE CTM EM BÚFALOS	28
4.1.1 Isolamento e Cultura de células das CTMO.....	28
4.1.2 Isolamento e cultura das CTCU.....	29
4.2 Análise morfológica das células.....	29
4.3 Análise da curva de crescimento	29
4.4 Caracterização por Citometria de Fluxo.....	30
4.5 Extração de RNA.....	30
4.6 Confecção de cDNA	31
4.7 Quantificação de mRNA de genes células tronco mesenquimais e de pluripotência por qPCR.....	31
4.8 Eletroforese em gel de agarose.....	32
4.9 Comitê de ética.....	32
4.10 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Isolamento e Expansão	33
5.2 Análise Morfológica	34
5.3 Teste de viabilidade de criopreservação.....	37
5.4 Curva de crescimento.....	38
5.5 Imunofenotipagem.....	39

5.6 Expressão Gênica	45
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco mesenquimais (CTM) são células indiferenciadas com alta capacidade de proliferação e habilidade de diferenciar em vários tipos celulares (GUZZO e O'SULLIVAN, 2016.). São encontradas nos mais diversos tecidos, como medula óssea, cordão umbilical, polpa dentária, ligamento periodontal e tecido adiposo (BARBOZA, 2014). As células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas no reparo morfofuncional de tecidos lesionados. A terapia celular é usada no tratamento experimental de distúrbios neurológicos e discopatias vertebrais (IMAZUMI e OKANO, 2014), esclerose amiotrófica lateral (CHOI et al., 2010), atrofia sistêmica múltipla (SUNWOO et al., 2014), na degeneração dos tecidos ósseo e articulações (SHIM et al., 2016.), e na redução da fibrogênese hepática em cirroses (VOLAREVIC et al., 2014.).

Segundo a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), para que uma população de células seja classificada como “célula tronco mesenquimal” é necessário que elas sejam aderentes ao plástico quando em cultura e tenham expressão positiva para os marcadores moleculares CD105, CD73 e CD90 e negativa para CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR, em mais de 95% da população, e tenham a capacidade de diferenciar em osso, gordura e cartilagem. (HORWITZ et al, 2005; DOMINICI et al., 2006). Embora a ISCT sugira a busca de um grande número de marcadores, ainda não há marcadores definitivos para células tronco mesenquimais, podendo variar com a espécie de animal da qual foram isoladas (BYDLOWSKI et al., 2009).

Em diversos mamíferos, tais como ratos (IANNACCONE et al., 1994), porcos (WHEELER, 1994), bovinos (STRELCHENKO, 1996), equinos (SAITO et al., 2002), ovelhas (NOTARIANNI et al., 1991), coelho (GRAVES e MOREADITH, 1993), e macaco (THOMSON et al, 1995) o isolamento de células tronco mesenquimais já está bem estabelecido, no entanto, ainda há dificuldade do seu isolamento em animais de produção como bovinos e bubalinos (TELUGU et al., 2009).

Apesar dos búfalos serem bem adaptados a regiões tropicais e subtropicais, fornecendo leite, carne, e auxílio na agricultura (DAMASCENO et al., 2010), sua eficiência reprodutiva e seu potencial genético necessitam ser melhorados. Desta forma, as células tronco de búfalos representam uma ferramenta ideal no estudo da embriogênese em condições in vitro e sua disponibilidade poderia facilitar o desenvolvimento de métodos eficientes na clonagem de células somáticas, transgênese e regulação de genes nesta espécie (YADAV et al., 2011). Além disso, o uso de animais abatidos como fonte de células-tronco mesenquimais é uma alternativa viável de coleta das amostras, facilitando a obtenção das amostras quando comparado ao método tradicional, assim como o aproveitamento das células que seriam descartadas na reprodução assistida nesses animais, utilizados como uma ferramenta poderosa nos estudos sobre desenvolvimento embrionário precoce, segmentação gênica, clonagem, formação de quimera e transgênese e até mesmo aplicação clínica (ANAND et al., 2011; YADAV et al., 2011, GHOSH et al. 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

Células-tronco são células indiferenciadas que apresentam como principais características a capacidade de auto renovação e o potencial de diferenciação, tornando-as fundamentais na formação dos tecidos durante a embriogênese (BATRA, 2006; TROUSON, 2006). De acordo com a capacidade de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em: células-tronco totipotentes, aquelas que se diferenciam em todas as células do organismo e células-tronco pluripotentes, que podem se diferenciar em células das três camadas germinativas, porém não são capazes de formar os anexos embrionários. Além disso, as células-tronco multipotentes podem ser adultas ou fetais e possuem uma capacidade limitada de diferenciação (ZHANG et al, 2006; PAROLONI et al; 2009; CHOPRA et al, 2013).

As células tronco mesenquimais (CTM) são um grupo de células-tronco adultas que ocorrem naturalmente no corpo. Estas células são facilmente encontradas em diversos tecidos, e se multiplicam para repor as células mortas regenerando os tecidos danificados (DOMINICI et al., 2006). Sua coleta não implica na morte do doador e seu uso está livre de processos éticos (PRENTICE e TARNE, 2007). As células tronco mesenquimais não são necessariamente células mesenquimatosas, elas também podem ser células tronco multipotentes (DOMINICI et al., 2006), células tronco mesenquimais (HORWITZ et al., 2005), ou mesmo células de sinalização medicinal (CAPLAN e CORREA, 2011).

Apesar da medula óssea ser a fonte de obtenção de CTM mais utilizada (ARINZEH et al., 2003.), pesquisas mostram que é possível isolar células semelhantes às CTM a partir do tecido adiposo (TA) (EIRIN et al, 2012), placenta (FUKUCHI et al, 2004), polpa dentária (HUANG et al, 2009), membrana sinovial (HERMIDA-GÓMEZ et al., 2011), sangue periférico

(TONDREAU et al, 2005), ligamento periodontal (PARK et al., 2011), endométrio (SCHWAB et al., 2008), cordão umbilical (CU) (BAKSH et al., 2007) e sangue do cordão umbilical (SCB) (MARTIN-RENDON et al., 2008).

Em 2007, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) afirmou que as CTM devem aderir ao plástico em condições de cultura padrão; e o perfil imunológico das células tronco é analisado através da citometria de fluxo onde devem expressar (95% +) CD105, CD73, CD90 e não expressar (2% +) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19, HLA-DR gerando pelo menos três linhagens diferenciadas: osteoblástica, adipogênica, condroblástica, as quais precisam ser identificadas por meio de coloração especial (DOMINICI et al., 2006). Além disso, outros marcadores podem ser usados na identificação das CTM, como o CD29 e CD44 utilizados como marcadores de adesão; o CD90, CD73 e CD105 são utilizados como marcadores de células mesenquimais. As CTM precisam ser negativas para o marcador de células endoteliais CD31, marcadores de células hematopoiéticas como CD34, CD45 e CD117 e classe de antígeno de diferenciação de leucócitos humanos II (HLA-DR) (SEO et al., 2009).

2.2 Células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMO)

A medula óssea é um tecido heterogêneo, constituído por células hematopoiéticas, eritrócitos, macrófagos, fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e células precursoras mesenquimais, que apresentam como principal característica a multipotencialidade (SALEM e THIEMERMANN, 2010). A primeira evidência de células semelhantes a fibroblastos foi relatada por Friedenstein et al. (1968), que as isolaram da medula óssea, as quais apresentavam formato fusiforme em meio de cultura, por isso foram denominadas de fibroblastos formadores de colônia (CFU-F). Outros experimentos confirmam a capacidade das células de se diferenciarem em adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos, tanto in vitro como in vivo (BYDLOWSKY et al., 2009; DE FARIA et al., 2016).

Embora as CTM sejam encontradas em tecidos como cérebro, pulmões, coração, rins e baço, a medula óssea ainda é considerada o melhor local de obtenção. Estas células são raras, e correspondem de 0,01% a 0,0001% das células nucleadas da medula. Apesar disso, as células da medula apresentam uma expressiva proliferação ao duplicar sua população em 8 semanas (SALEM e THIEMERMANN, 2010). Ao atingirem 40 duplicações, o potencial de propagação das células diminui gradativamente até entrarem em senescência (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; KRAMPERA et al., 2007;).

As CTMO são heterogêneas, resultado de uma combinação do desenvolvimento de células progenitoras de diferentes estágios, desenvolvidas a partir do mesoderma (BYDLOWSKY et al., 2009). Mesmo em colônias isoladas de uma mesma cultura, notamos a heterogeneidade destas células, que podem variar tanto na morfologia quanto no potencial de multiplicação celular. Estas colônias apresentam uma hierarquia de células progenitoras, não identificadas devido à ausência de marcadores específicos (KUZNETSOV et al., 2009). Apesar da relevância clínica atribuída às células-tronco mesenquimais, o entendimento completo sobre sua biologia ainda permanece inconsistente (SALEM e THIEMERMANN, 2010).

Em função de sua segurança e reduzida imunogenicidade, as BMSCs são largamente estudadas em diversas doenças (POURRAJAB et al, 2013). Nesse contexto, elas têm mostrado capacidade na resolução da injúria pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeos, hiperoxia, pneumonia e sepse em modelos animais (AKRAM et al., 2013). Ademais, outros estudos têm sugerido a aplicação das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em casos de infarto do miocárdio (MIYAHARA et al., 2006), diabetes (LEE et al.,2006), insuficiência hepática (PAREKKADAN et al., 2007) e renal (TOGEL et al.,2005), bem como em várias afecções da retina (PARK et al, 2017).

As células-tronco da medula óssea de bubalinos mostraram-se viáveis por exibirem capacidades auto renováveis e potencial de diferenciação em várias linhagens (GATE et al., 2013). O uso de CTM como doadores nucleares aumenta as taxas de desenvolvimento embrionário desses animais (LEE et al.,

2010), além disso as células-tronco de grandes ruminantes, como os bovinos e búfalos, podem ser usadas como um modelo relevante de aplicação em humanos (BERG et al., 2011).

2.3 Células Tronco do cordão umbilical (CTCU)

O cordão umbilical é composto por duas artérias e uma veia umbilical, que são revestidas por um tecido conjuntivo mucoso específico, conhecido como geleia de Wharton, considerado uma importante fonte de células tronco mesenquimais (PHUC et al., 2014). As células do sangue do cordão umbilical possuem uma grande capacidade de reconstruir o sistema hematopoiético danificado. Células tronco do cordão umbilical apresentam um perfil de expressão genica semelhante às células tronco embrionárias e auto-renovação mais rápida do que células tronco obtidas a partir do tecido adiposo (HSIEH et al., 2010, FONG et al., 2011).

A colheita de células do cordão umbilical é facilmente realizada, não havendo necessidade da morte do doador, além de ser um material geralmente descartado pelos médicos, tornando fácil a sua obtenção na espécie humana (HSIEH et al., 2010). Segundo Nagamura-Inoue e He (2014), as células tronco do cordão umbilical possuem propriedades imunomoduladoras, atraindo bastante interesse da medicina regenerativa e imunoterapia. Por serem células imaturas, o risco de rejeição do enxerto é consideravelmente inferior, portanto, o transplante de células do cordão umbilical não requer plena compatibilidade entre doador e receptor (TAKAHASHI, 2004; MALGIERI, 2010). A duração da restauração do sistema imunológico é maior, porque as células tronco que participam do processo são mais primitivas do que as encontradas no sangue periférico e medula óssea, tornando o paciente vulnerável às infecções por um maior período de tempo (GREWAL et al, 2003; AAPSH, 2007).

Quanto à aplicação clínica, as células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical são consideradas a melhor escolha, em função de sua fácil obtenção, alta vitalidade celular (LI et al., 2009), baixa imunogenicidade (LEE et al., 2014), e alto potencial parácrino, que acelera os processos de reparação

tecidual (EL OMAR et al., 2014). Elas têm o potencial de melhorar a função hepática e reduzir ascite e mortalidade, especialmente em pacientes com vírus da hepatite B com cirrose hepática descompensada (ZHANG et al., 2012) e insuficiência hepática (SHI et al., 2012). Possuem, ainda, relevância na prevenção ou tratamento de lesões pulmonares (MOODLEY et al., 2009; LIU et al., 2014) e no tratamento de lesões condronais, osteocondrais e defeitos ósseos, sendo possíveis candidatas para um produto de células-tronco no campo da engenharia de tecidos ortopédicos (A. MARMOTTI et al., 2014).

2.4 Perfil Imunofenotípico das CTM

As CTM se apresentam como uma população heterogênea, se diferenciando quanto a morfologia, fisiologia e na expressão dos antígenos de superfície. Diante da heterogeneidade das CTM e da diversidade de moléculas de superfície existentes, ainda não há um único marcador que possibilite a identificação das CTM, tornando-se necessário o uso da associação de diferentes antígenos (KRAMPERA et al., 2007; LV et al., 2014). Sabe-se que a expressão de algumas citocinas e marcadores de superfície é afetada conforme as condições de cultivo, sendo sensíveis com o tipo de meio, origem e forma das amostras e a passagem que serão utilizadas (BOBIS et al., 2006).

Segundo LV et al. (2014), os marcadores de CTM mais utilizados são Stro-1, CD271, antígeno embrionário-4 (SSEA-4), e CD146. Estas moléculas recebem uma maior atenção por serem encontradas em quase todas as populações de CTM. O marcador Stro-1 é o antígeno mais adequado na identificação de CTM, porém, ele não é específico para estas células e apresenta perda da sua expressão gênica ao decorrer das passagens (MEIRELLES et al., 2008). Além disso, as CTM apresentam um conjunto de receptores de superfície que correspondem à adesão célula-célula e célula-matriz como as $\alpha 5\beta 3$ e $\alpha 5\beta 5$, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 e L-selectina (BOBIS et al., 2006).

Os principais receptores de citocinas que podem ser expressos nas células tronco são IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R e IL-7R. Além disso, estas células secretam diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que também são facilmente identificados como as citocinas IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF (Fator Inibidor da Leucemia), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), SCF (Stem Cell Factor), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos) e flk-3L; as quimiocinas CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL1; e os fatores de crescimento β FGF-R, PDGF-R, TGF- β R, Thy-1, INF- γ R e TNF-R (KODE et al., 2009).

As populações de células tronco imaturas ou células tronco embrionárias expressam os marcadores Oct-4 e Sox2, proteínas intracelulares, portanto, não fazem parte do grupo de marcadores de superfície (KURODA, 2010). Outro fator importante na identificação das CTM por meio molecular é a identificação da co-expressão de marcadores de superfície, que é influenciada principalmente pelo local de coleta e pela idade do doador (MAIJENBURG, 2011).

2.5 Uso das células-tronco mesenquimais

As CTM são encontradas em todos os tecidos do organismo animal, as quais repõem as células maduras degradadas, por meio da remodelação dos tecidos (DA VEIGA PEREIRA, 2008). A reposição tecidual é sempre necessária por conta de doenças e do envelhecimento dos organismos, evidenciando a importância da terapia celular ou da medicina regenerativa (BOYETTE e TUAN, 2014; TAJBAKSHI, 2013). Embora haja estudos que mostram a capacidade de transformação dessas células na regeneração de órgãos e tecido, ainda sabemos pouco sobre os fatores envolvidos no controle da autorenovação (CARVALHO et al., 2009; YARAK e OKAMOTO, 2010), sendo necessário entender os processos de proliferação e diferenciação das CTM *in vitro* e *in vivo*, assim como os processos que podem levar a formação de tumores, garantindo a efetividade da terapia celular e seu comportamento a longo prazo. (BYDLOWSKI et al., 2009).

Os linfócitos T são as principais células da resposta imune adaptativa e as CTM são capazes de modular a função das células T. Apesar das CTM não possuírem expressão do MHC classe II, elas podem expressar essas moléculas em condições específicas, mostrando que os antígenos do MHC de classe II presentes dentro das CTM podem ser expressados na superfície celular após a indução com Interferon-gama (IFN- γ) (WILLIAM et al., 2003). Ao observar os efeitos imunossupressores, tanto in vitro quanto in vivo, as CTM são utilizadas no tratamento da doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), uma rejeição das células transplantadas por linfócitos T reativos, caracterizada por lesões em pele, fígado, trato digestivo (GIORDANO et al., 2007).

Assim, as CTM têm sido utilizadas na recuperação de órgãos e tecidos danificados que, após sua introdução e indução de diferenciação, poderão restaurar a função perdida (NARAZAKI & CRISTANTE, 2011). Destarte, essas células são estudadas clinicamente no tratamento de diversas patologias com diferentes graus de sucesso (RAFII & LYDEN, 2003; MACKIE & LOORDO, 2011; SQUILLARO et al, 2015; PARK 2016). Exemplo disso é a sua exploração nas áreas da oftalmologia, cardiologia, ortopedia, neurologia, dentre outras (OLIVEIRA 2008, RYU et al. 2012). Em adição, devido à sua forte propensão para formar cartilagem, as CTM têm sido o alvo de incontáveis trabalhos que objetivam a reparação da cartilagem em pacientes humanos ou veterinários com osteoartrite (WHITWORTH; BANKS, 2014).

Apesar das CTM apresentarem propriedades importantes para regeneração tecidual, estas células enfrentam diversos obstáculos ao garantir sua sobrevivência quando enxertadas em um paciente (MA, 2010), necessitando de cuidados ao serem utilizadas na terapia celular e na compatibilidade do doador-paciente (CROOK et al., 2010.). Diante dessa situação, a criação de um banco de dados de células-tronco mesenquimais é um importante passo para a ciência por garantir um registro das linhagens, facilitando seu estudo em futuras aplicações alogênicas (BORSTLAP et al., 2010).

2.6 O Búfalo como modelo para Biotecnologias

O uso de animais de produção em testes e ensaios pré-clínicos contribui para a medicina e o avanço da ciência nestas espécies. Isso mostra a importância em caracterizar células de búfalos que podem ser usadas como modelos experimentais (BARRY et al. 2010), que despontam como uma técnica inovadora na terapia regenerativa, podendo ser isoladas e expandidas de diversos tecidos, como a medula óssea (GADE et al., 2013), confirmando que as células isoladas dos búfalos podem ser expandidas com sucesso in vitro, e exibem capacidades auto renováveis e clonogênicas, revelando células indiferenciadas molecularmente que expressam de genes de pluripotência, além disso, células isoladas da membrana amniótica de búfalos também demonstraram seu potencialmente de diferenciação em multilinhagens (GHOSH et al., 2015), e células isoladas da geleia de Wharton são facilmente isoladas, e apresentam um ótimo potencial de multiplicação celular (SREEKUMAR et al., 2014).

Diante dessa situação, os búfalos têm sido largamente utilizados como modelos experimentais, por oferecem uma ótima fonte de células tronco multipotentes, que podem ser cultivadas e mantidas in vitro para várias aplicações terapêuticas, como a reprodução assistida nesses animais, utilizados como uma ferramenta poderosa nos estudos sobre desenvolvimento embrionário precoce, segmentação gênica, clonagem, formação de quimera e transgênese (ANAND et al., 2011; YADAV et al., 2011).

A maioria dos trabalhos que envolvem pesquisa em búfalos utiliza células da membrana amniótica, a fim de caracteriza-las in vitro para aplicação clínica (GHOSH et al. 2015). SAMPAIO et al. (2015) demonstraram que o tecido adiposo de búfalos pode ser usado como fonte de CTM, sendo uma interessante opção na terapia celular e medicina regenerativa. Estudos mais recentes mostram que as células tronco embrionárias de búfalos são capazes de se diferenciar em oócitos, bem como em espermátócitos sob condições de cultura adequadas (SHAH et al., 2017). Outro estudo demonstra que CTMs isoladas a partir do tecido adiposo de búfalos apresentam um genoma indiferenciado, importante em uma reprogramação eficiente para reativar a

expressão de genes embrionários precoce na transferência nuclear de búfalos (SADEESH et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Isolar populações de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos (*Bubalus bubalis*) após o abate.

3.2 Específicos

- Isolar células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMO) e do cordão umbilical (CTCU) de bubalinos;
- Avaliar a morfologia das populações de CTMO e de CTCU de bubalinos,
- Avaliar a curva de crescimento das células das CTMO e de CTCU de bubalinos após o descongelamento;
- Verificar as curvas de crescimento das CTMO e das CTCU de bubalinos;
- Avaliar as CTMO e CTCU de bubalinos imunofenotípicamente;
- Avaliar a expressão gênica das CTMO e das CTCU de bubalinos;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DE CTM EM BÚFALOS

4.1.1 Isolamento e Cultura de células das CTMO

A medula óssea foi coletada do esterno de cinco búfalos oriundos do matadouro de Boituva – SP. As amostras foram retiradas com agulhas e seringas estéreis, colocadas em tubos cônicos com meio de cultivo, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o laboratório de Anatomia da Universidade de São Paulo (USP). As células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 200g por 10 minutos e descartado o sobrenadante, sendo repetido duas vezes. Em seguida, a medula foi ressuspensa em meio de cultivo DMEM, e depositado sobre uma solução de Ficoll-paque (1.077 g/mL - Sigma) em uma proporção 1:1 e centrifugado a 1200g por 20 minutos. O anel branco correspondente à fração de células nucleadas da medula foi aspirado. Finalmente estas células foram lavadas em PBS, centrifugadas 1200g por 10 minutos, ressuspensas e plaqueadas. As células foram expandidas em cultura até 3ª passagem e congeladas em tubos de criopreservação, armazenadas em freezer -80°C para estudos de caracterização.

4.1.2 Isolamento e cultura das CTCU

Foram coletados úteros fechados de bubalinos provenientes de abatedouros da cidade de São Luís, Maranhão. Os úteros fechados foram acondicionados em caixas isotérmicas e transportados ao Laboratório de Cultivo Celular Integrado ao Laboratório de Reprodução da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). Em meio estéril, foi realizada a incisão no útero, para a remoção de fragmentos do cordão umbilical, e foram feitas lavagens em solução de PBS e antibiótico (penicilina e estreptomicina) a 10%, para remover possíveis contaminantes e excesso de sangue, o procedimento foi repetido de 3 a 4 vezes. Em seguida, as amostras do cordão umbilical foram dissociadas mecanicamente e depositados em placas de petri estéreis. O material resultante foi transferido e acondicionado em garrafas de 25 cm² contendo meio de cultivo α -MEM e 3% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), e incubadas em estufas com 5% de CO₂ a 37°C.

4.2 Análise morfológica das células

Para a análise morfológica, as amostras foram avaliadas a cada dois dias por meio de um microscópio invertido (NIKON ECLIPSE TS-100) durante duas semanas. As células foram até serem congeladas na 3^o passagem, desta maneira foi possível observar as alterações morfológicas durante o seu desenvolvimento.

4.3 Análise da curva de crescimento

As células da medula foram descongeladas e semeadas em placas de 24 poços a uma densidade aproximada de 2×10^4 células por poço, cultivadas durante quatro dias e tripsinizadas e contadas com o corante azul de trypan nos intervalos de 24, 48, 72 e 96h (3 poços cada vez), para determinar o número de células e o melhor tempo de duplicação da população (PDT).

4.4 Caracterização por Citometria de Fluxo

Para análise imunofenotípica foi utilizado o método de imunomarcagem de proteínas de superfície, no laboratório de imunomodulação da Universidade de São Paulo. As células foram descongeladas na quarta passagem e cultivadas, após à aderência na placa foram tripsinizadas, fixadas em paraformaldeído, centrifugadas e ressuspensas em PBSA (Tampão fosfato-salino com 5% de azida sódica) na concentração de 1×10^5 células/ml e incubadas com anticorpos primários (diluição de 1: 100) por 30 minutos a 40°C. Após este período as células foram incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:500) por 30 minutos a 40°C. Após a incubação, as células foram lavadas e analisadas por citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, USA). O citômetro de fluxo foi calibrado utilizando células não marcadas e células marcadas apenas com o anticorpo secundário policlonal. Para cada amostra, foram contados 10000 eventos. Os anticorpos primários utilizados foram: Nanog (n-17, sc30331), Sox-2 (sc-17320), Vimentina (sc-73259), CK 18 (RGE53, sc-32329), Stro-1 (sc-47733), PCNA (sc-46) β -tubulina (sc-47751), TRA-1-60 (sc-21705), CD73 (sc-14684), CD 105 (Abcam, ab53321, Cambridge, UK) CD 117(A4502 DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), CD45 (Invitrogen, MHCD4501, Carlsbad CA, USA), os resultados foram avaliados através do software Flowjo (10.0).

4.5 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol[®] (Invitrogen, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Após o descongelamento das células, foi adicionado Trizol[®] e incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos, para completar a dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, e agitadas vigorosamente por 15 segundos. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por dois minutos antes de serem centrifugados a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Aproximadamente 550 μ L da fase superior aquosa foram transferidos para outro tubo eppendorf de 1,5 mL, ao qual foram adicionados 500 μ L de isopropanol para precipitar o RNA. Os tubos foram invertidos vagarosamente e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos até nova centrifugação a

12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1 mL de etanol 75%, seguido de homogeneização e centrifugação a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em aproximadamente 40 µL de água de injeção e incubado por 10 minutos a 55°C. Alíquotas para dosagem de RNA em espectrofotômetro foram feitas e o RNA congelado a -80°C até confecção de cDNA.

4.6 Confecção de cDNA

Para confecção do cDNA foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para um volume final de 20 µL de cDNA, foram utilizados no preparo do mix 4,7 µL de água DEPC, 4,4 µL de MgCl₂, 4 µL de dNTPs, 1 µL de hexâmeros, 0,4 µL de inibidor de RNAses, 2 µL de tampão, 0,5 µL de transcriptase reversa e 3 µL de RNA das amostras, em uma concentração final de 500 ng/µL. As amostras foram levadas para o termociclador, nos seguintes ciclos: 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos.

4.7 Quantificação de mRNA de genes células tronco mesenquimais e de pluripotência por qPCR

A expressão de mRNA dos genes CD29, CD44, SOX-2 e NANOG, além da GAPDH, foi mensurada por PCR em tempo real, objetivando a quantificação desses genes nas população celulares. Para cada reação foi utilizado 2,5 µL de cDNA, 1 µL de cada primer a 10 µM (Tabela 2), 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen, USA) e 8 µL de água, com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Os dados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ normalizados com base na expressão de GAPDH.

Tabela 1 - Lista de genes e primers utilizados na qRT - PCR

Sequência alvo	Sequência de Primes	Temp. de Anelamento (°C)	pb	Nº de Acesso
GAPDH	TACTCAGCACCAGCATCACC (F) TGACCCCTTCATTGACCTTC (R)	55	180	620060082:C2671

CD29	CTTATTGGCCTTGCATTGCT (F) TTCCCTCGTACTTCGGATTG (R)	58	169	XM.005606848
CD44	ATCCTCACGTCCAACACCTC (F) CTCGCCTTTCTTGGTGTAGC (R)	58	165	NM_001085435.1
SOX-2	CATGGCAATCAAAATGTCCA (F) AGACCACGGAGATGGTTTTG (R)	55	215	DQ126150.1
NANOG	GGAAGGGTAATGAGTCCAA (F) AGCCTCCCTATCCCAGAAAA (R)	55	211	DQ487022.1

4.8 Eletroforese em gel de agarose

Para preparo de 100 ml do gel de agarose, foram utilizados 10 ml de tampão TBE e 90 ml de água destilada, acrescidos de 1,5 gramas de agarose. Após, a mistura foi levada ao microondas por 45 segundos ou tempo suficiente para dissolver a agarose. Depois de resfriada, foi colocado 2 microlitros de brometo de etídio à mistura, que foi colocada em uma cuba grande até endurecer. Após solidificado, as amostras de DNA amplificado foram adicionadas em cada poço, juntamente com o padrão de peso molecular. A corrida foi realizada na voltagem de 90 v por 30 minutos.

4.9 Comitê de ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, sob o número de protocolo 31/2016.

4.10 Análise estatística

Os dados de expressão gênica foram normalizados com base na expressão de 1000 cópias de GAPDH e apresentados como média \pm desvio padrão, e analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e Expansão

Nas primeiras 12 horas após o isolamento das células da medula óssea, foi observado grandes quantidades de hemácias, células hematopoiéticas e células mortas durante o processo de extração, as quais apresentavam pouca aderência no fundo das garrafas. No entanto, após 48 horas de cultivo houve adesão das primeiras células, atingindo a confluência de 80% com 10 dias de cultivo, tornando necessário o repique da cultura.

Quanto ao cordão umbilical, migração celular para o fundo da placa iniciou a partir do terceiro dia de cultivo. No 15º dia de cultivo, as células atingiram confluência de 80%, semelhante aos resultados obtidos por Singh et al. (2013), que atingiram confluência média de 75% entre o 9º e o 11º dia de cultivo. Inicialmente, as células do cordão umbilical apresentam menor densidade celular quando comparadas às células da medula óssea, o que acarretou no preenchimento mais lento das placas e, conseqüentemente levaram mais tempo para pavimentar o fundo da placa *in totum*.

Em uma cultura de células-tronco, a confluência está diretamente ligada capacidade de proliferação, sendo um importante critério a ser analisado (REN

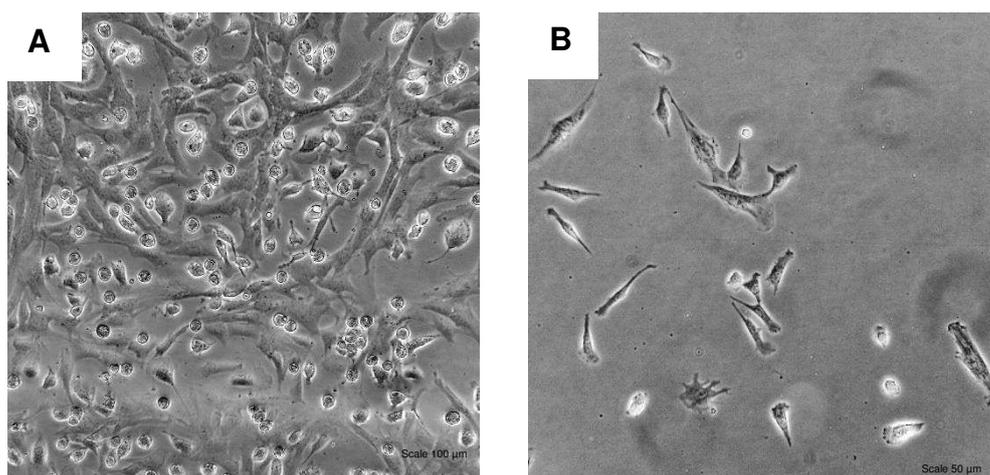
et al., 2015). É fundamental o estabelecimento de uma confluência ideal para a realização das passagens e das análises de caracterização, ao fim de minimizar alterações nas propriedades biológicas destas células (WOLFE et al., 2008). Segundo Abo-Aziza (2017), a confluência de 80% é ótimo indicador de proliferação em culturas de células-tronco mesenquimais, sendo considerada uma confluência ideal para a realização de passagens, análises experimentais e utilizações em terapias celulares.

Tanto as células isoladas de medula óssea como as de cordão umbilical apresentaram alta capacidade de expansão *in vitro* após a primeira passagem, segundo Salem e Thiemermann (2010) e Sprada et al., (2014), as células mesenquimais apresentam alta taxa de proliferação durante o isolamento e primeiras passagens.

5.2 Análise Morfológica

A morfologia das células da medula e do cordão umbilical apresentaram formato que variou de arredondado a fusiforme semelhantes a fibroblastos (Figura 1). O mesmo padrão celular encontrado neste trabalho foi descrito também para células tronco isoladas a partir de membrana amniótica, geleia de Wharton e medula óssea de búfalos, independente da região e do tecido de onde foram isoladas as células apresentam predominantemente o formato fusiforme (GADE et al., 2013; SREEKUMAR et al., 2014; GHOSH et al., 2015).

Figura 1 – Fotomicrografia de células de búfalos. A. Cultura de células da medula óssea de búfalos 10x. B. Cultura de células do cordão umbilical de búfalos 10x.

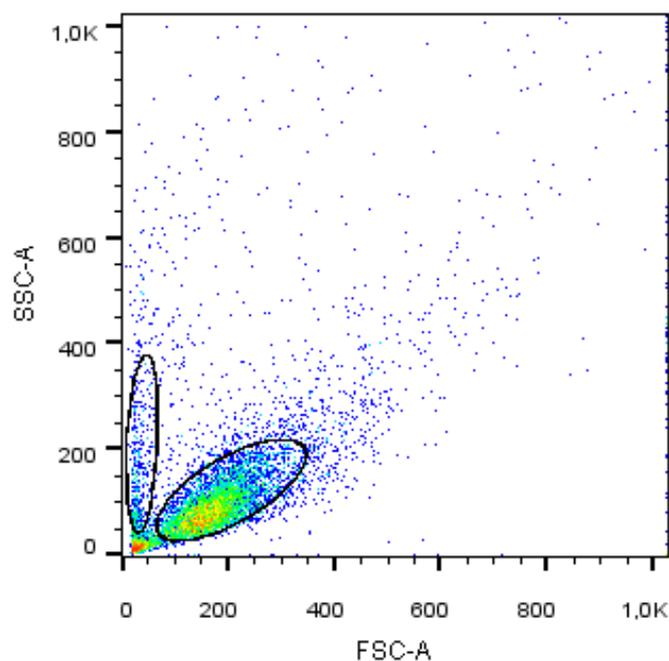


Fonte: FERREIRA (2018).

Quanto à avaliação morfológica dos tipos celulares isolados, foi evidenciada uma população de células mesenquimais heterogênea, com diversidade de tamanhos, que estão de acordo com a morfologia padrão das células-tronco mesenquimais definida pelo *The International Society for Cellular Therapy* (DOMINICI et al., 2006), e confirmada por outros pesquisadores (DAVIES et al., 2015; GONG et al., 2014; LI et al., 2014). Esse padrão morfológico também foi descrito para células de cordão umbilical de humanos (SALEH e REZA, 2017), equinos (MAIA et al., 2017) e cães (FILIOLI URANIO et al., 2014).

As células da medula óssea foram analisadas por citometria de fluxo, onde foram observadas duas populações celulares distintas, confirmando a heterogeneidade da cultura (Figura 2). As células-tronco mesenquimais em cultivo se apresentam em populações heterogêneas (RENNERT et al., 2016) e apresentam morfologias distintas já na cultura primária, que são precocemente identificadas (BAER e GEIGER, 2012). Uma única célula-tronco mesenquimal pode dar origem a populações altamente heterogêneas, com variável capacidade de proliferação e diferenciação (AUGELLO et al. 2010)

Figura 2 – Análise morfológica de células isoladas da medula óssea de búfalos por citometria de fluxo. Notar os círculos demonstrando a identificação de duas populações de células, de tamanhos semelhantes e granulósidades diferentes.



Fonte: FERREIRA (2018).

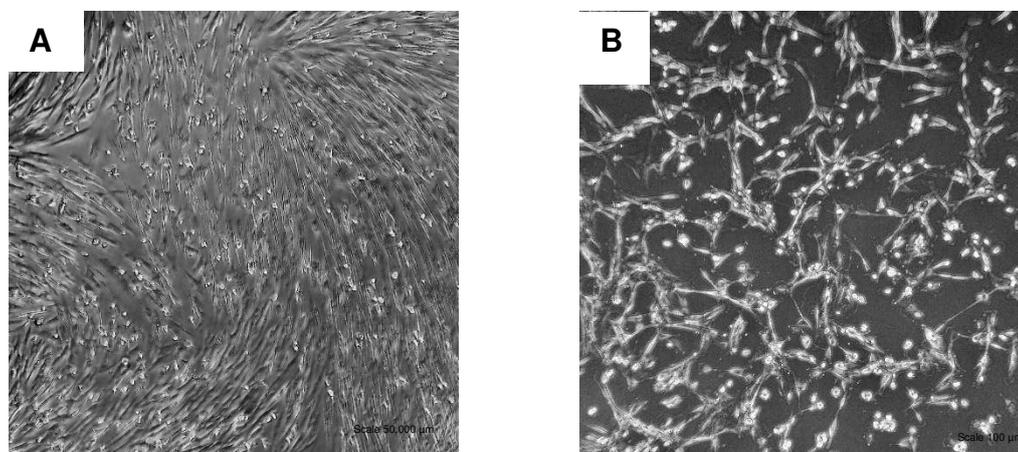
Como observado no nosso estudo, a medula óssea é um tecido altamente heterogêneo, pois nem todas as células mononucleares são células tronco mesenquimais, um grande número delas é representado por leucócitos e células tronco hematopoiéticas (YOSHIMURA et al., 2007; SALEM e THIEMERMANN, 2010). As células mesenquimais encontradas na medula também diferem morfológicamente entre si, evidenciando que as populações de células isoladas da medula óssea são heterogêneas (MURAGLIA et al., 2000; BARA et al., 2014). Apesar da heterogeneidade morfológica dessas células, foi comprovado a expressão positiva para marcadores de células mesenquimais, como o CD29, CD44, CD73, CD105, e Stro1 e não possuem expressões de marcadores de linhagem hematopoiéticos (RHODES e YANG, 2013). Além disso, essa diversidade morfológica pode ser minimizada usando a classificação por citometria de fluxo ou separação imunomagnética, seja por seleção positiva ou por seleção negativa para um marcador específico (BAER e GEIGER, 2012; RADA et al. 2011). Essa heterogeneidade foi encontrada em células-tronco de fibroblastos fetais de búfalos (ANJANA et al., 2015) e em células derivadas da membrana amniótica (GOSH et al., 2015).

5.3 Teste de viabilidade de criopreservação

Após a descongelação, as células isoladas não sofreram alterações no formato, isso mostra que a morfologia não altera quando estas são submetidas a baixas temperaturas. Além disso, a capacidade de proliferação permaneceu a mesma quando comparada a células não criopreservadas, com confluência média de 80% após três dias de cultivo, dados semelhantes aos de Vidane et al. (2014) e Franciele (2012), ao perceberem que mesmo sendo criopreservadas, as células, apresentam características semelhantes às células que não foram submetidas a baixas temperaturas. A partir destas análises, foi possível a criação de um banco de células, para expansão e realização dos demais experimentos

A criopreservação de células-tronco mesenquimais tornou-se uma técnica viável que objetiva a conservação destas células por um longo período de tempo (MAIA, 20017). A técnica garante que as células sejam corretamente preservadas, e após descongeladas, serem usadas na terapia celular, transporte de amostras e desenvolvimento de testes morfológicos e moleculares (MIYAZAKI e SUEMORI, 2014; DA SILVA et al., 2017).

Figura 3 – Fotomicrografia de células descongeladas após a criopreservação de búfalos. A. Células da medula óssea. 20x. B. Células do cordão umbilical.



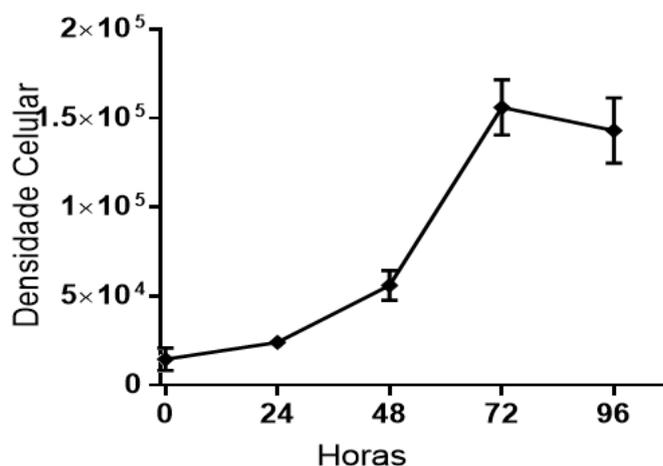
40x.

Fonte: FERREIRA (2018).

5.4 Curva de crescimento

As células da medula óssea apresentaram as quatro fases do crescimento celular em cultura (Gráfico 1). 24 horas após o plaqueamento, as células se encontravam na fase Lag, correspondente a um período de adaptação celular, com pouca variação no número de células e pouca aderência à superfície da placa. Entre 48 e 72 horas, a cultura se encontrava na fase Log, com aumento exponencial na quantidade de células, que ocupavam toda a superfície de crescimento disponível. Após 72 horas, o cultivo atingiu a fase de *plateau*, onde foi observado o início da redução da velocidade do crescimento celular e por fim, com 96 horas, houve redução do número de células (morte celular). O tempo de duplicação da população foi 72 horas. Esses resultados são semelhantes aos observados por Gade et al. (2013), que relatam que a cultura inicialmente apresentou crescimento lento, seguido de uma fase de crescimento exponencial e finalizando com uma fase estacionária.

Figura 04 - Gráfico da curva de crescimento de cultivo celular de medula óssea isolada de búfalos.



Fonte: FERREIRA (2018).

Bhorghesi (2014), ao comparar células de quarta e oitava passagem em 96 horas, observou que as primeiras tendem a apresentar maior capacidade de proliferação. Isso pode ser explicado uma vez que as células na quarta passagem estão no pico do seu crescimento, quando comparadas as de oitava passagem.

5.5 Imunofenotipagem

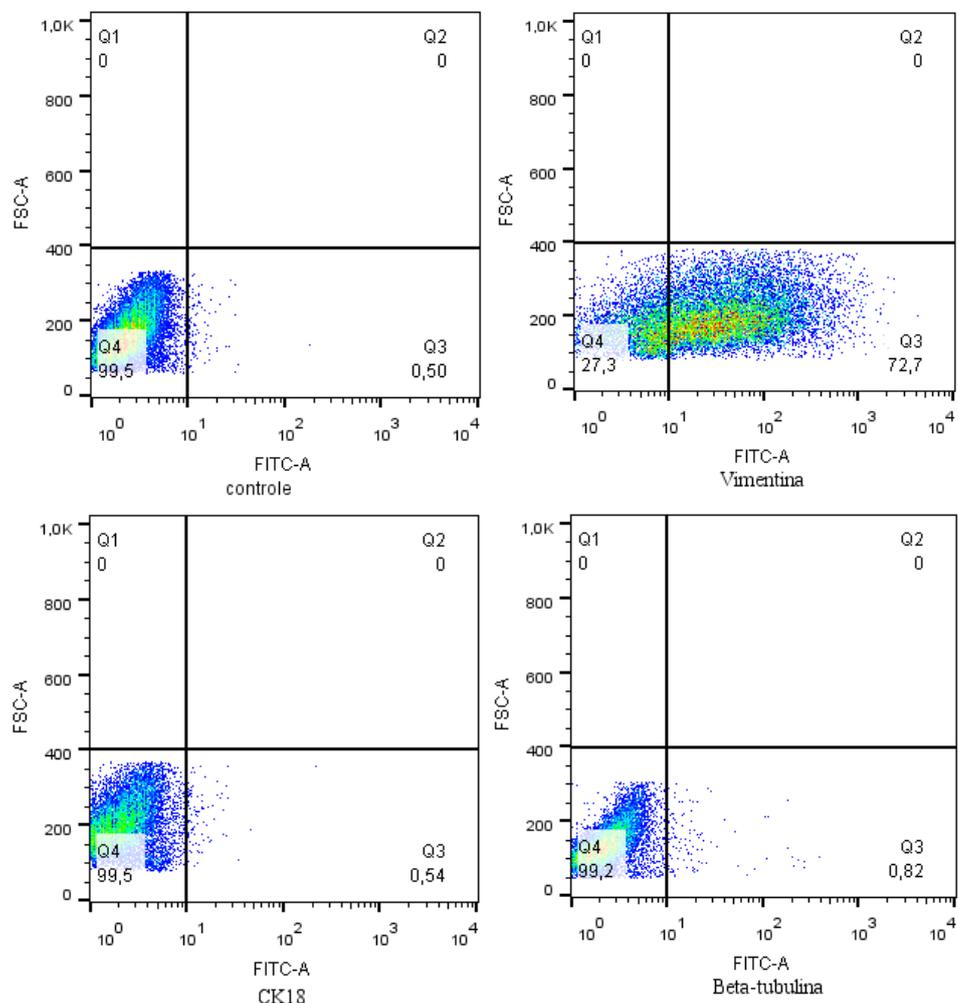
A caracterização imunofenotípica das células da medula óssea de bubalinos apontou expressão negativa para os marcadores de citoesqueleto, com exceção da vimentina, que apresentou expressão positiva (Figura 4). Tanto a vimentina quanto a citoqueratina 18 são encontradas em filamentos intermediários das células mesenquimais e células epiteliais, respectivamente (TABATABEI et al., 2014). Semelhantemente aos estudos realizados por Chae, et al., (2016), em células do tecido adiposo de humanos e em células tronco do fluxo menstrual relatadas por DA SILVA SASSO et al., (2017), indicando a origem mesenquimatosa da célula.

A vimentina, também conhecida como proteína específica de fibroblastos 1, é expressa em quase todas as células de origem mesenquimal, incluindo fibroblastos, células endoteliais, células das linhagens hematopoiéticas e células da glia (MANI et al., 2008; ZEISBERG e NEILSON, 2009). Chen et al. (2007) afirmam que a coexpressão de nestin e vimentina está relacionada com a capacidade de multipotência dos fibroblastos, o que pode representar um novo tipo de células-tronco adultas. A vimentina é um dos componentes do citoesqueleto celular responsável pela integridade e flexibilidade da célula (Goldman, et al., 1996). Diversos estudos demonstram o importante papel da vimentina ao desempenhar funções de migração, sinalização e mobilidade celular (Eckes, et al., 1998; Cochard e Paulin, 1984; Lehtonen, et al., 1983; Franke et al., 1982). Atualmente há diversos estudos que mostram a associação da vimentina com células tumorais mesenquimatosas, podendo ser um forte indicador da transição epitélio-mesenquimatosa causando mais agressividade, desta forma, com a diminuição das características epiteliais há

um aumento das características mesenquimatosas indicada pelo crescimento da expressão de vimentina, fibronectina e enzimas proteolíticas (MITRA et al., 2015; YU et al., 2015; WERNER et al., 2017). Além disso, as mecanoterapias baseadas em células-tronco são controladas por propriedades mecânicas do citoesqueleto destas células, que incluem os filamentos intermediários de vimentina (SHARMA et al., 2018).

A baixa expressão da citoqueratina 18 sugere que as células isoladas de medula óssea de bubalinos não são capazes de se diferenciarem em células epiteliais. As citoqueratinas são um grupo de proteínas de filamentos intermediários composto por mais de 50 polipéptidos diferentes (SCHWEIZER et al., 2006). Essas proteínas são encontradas no citoplasma das células eucarióticas, e juntamente com a vimentina constituem um dos importantes componentes do citoesqueleto, sendo responsáveis pela função de manutenção estrutural da célula e do tecido e a proteção contra traumas mecânicos (ISHIDAYAMAMOTO, 2002; OSHIMA, 2002). Estão presentes principalmente no tecido epitelial, sendo expressa de forma estável em células epiteliais normais (WAN et al., 2012).

Figura 5 – Gates de imunofenotipagem de células isoladas de medula óssea de búfalos em 4ª passagem por citometria de fluxo. Notar marcação positiva para o marcador de citoesqueleto (Vimentina) e as expressões quase nulas para os marcadores CK18 e β -tubulina.

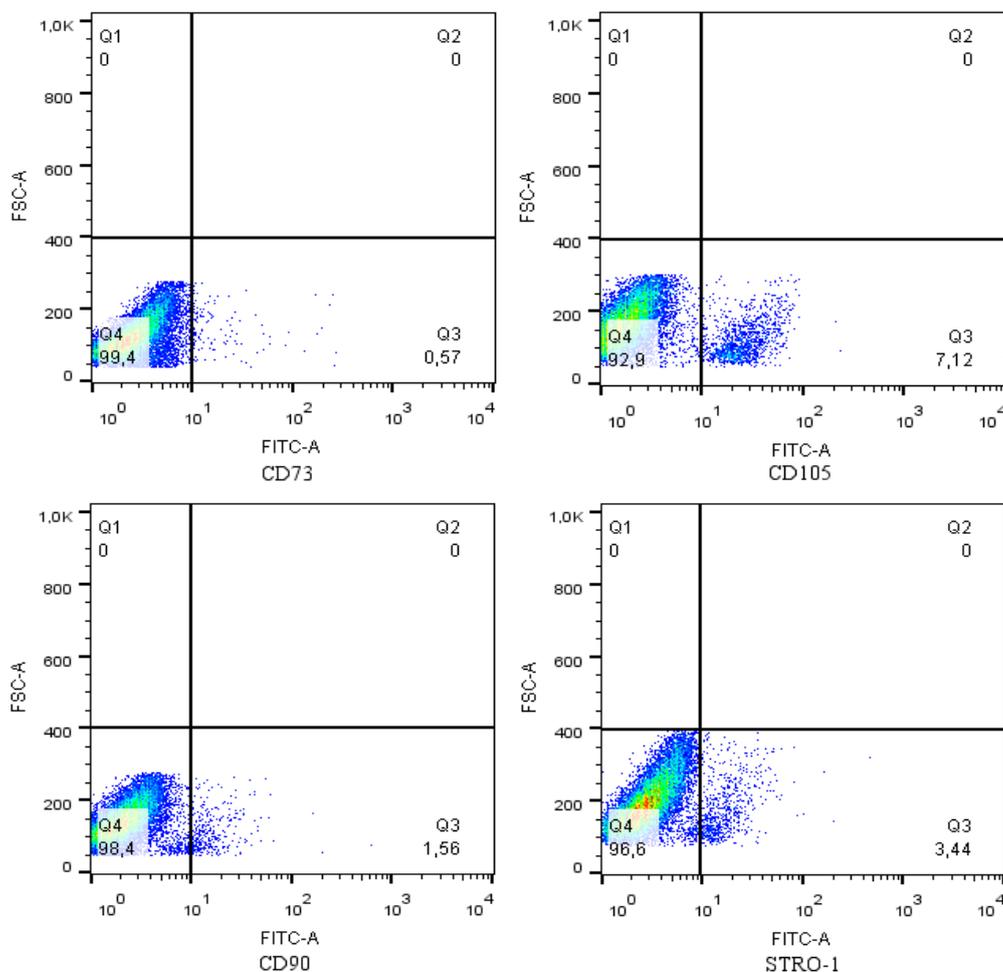


Fonte: FERREIRA (2018).

Os marcadores mesenquimais CD-105 (7,12%), CD-90 (1,56%), Stro-1(3,44%) e CD-73 (0,57%) não foram expressos nas células da medula óssea de búfalos (Figura 5). De acordo com Vidane et al. (2014), a expressão do marcador CD-73 é quase nula na quarta passagem, havendo um aumento considerável na sua expressão à medida que são feitas as passagens. Esses resultados são semelhantes aos achados de Borghesi (2016), ao cultivar células mesenquimais de coelhos, Francioli et al. (2012), ao cultivar células

mesenquimais de equinos e nas células cultivadas no líquido sinovial de humanos (DE SOUSA et al., 2017). Os dados de expressão dos marcadores CD-105, CD-90 e Stro-1 diferem dos encontrados na literatura (GADE et al., 2013), em células tronco isoladas de búfalos vivos ao encontrarem expressão positivas para esses marcadores, o que pode ser um indicador de que a forma de coleta influenciou no resultado obtido, pois as células isoladas da medula post-mortem sem anticoagulante não apresentaram marcações para marcadores de células-tronco mesenquimais. Apesar disso, é válido ressaltar que uma cultura de células tronco-mesenquimais pode ser facilmente influenciada pelo tipo de meio e a passagem que serão utilizadas (BOBIS et al., 2006). Conforme os critérios mínimos exigidos pela “Sociedade Internacional de Terapia Celular”, as CTM são caracterizadas pela aderência à superfície plástica, diferenciação em outras células e capacidade em expressar pelo menos um dos anticorpos: CD105, CD73 e CD90, (Dominici et al., 2006; LUNA et al., 2014). Conforme descrito por Maleki et al. (2014), o CD90 possui importante papel na morfologia e proliferação das CTM, enquanto o CD105 (endoglina) está envolvido na diferenciação e migração destas células.

Figura 6 – Gates de imunofenotipagem de células isoladas da medula óssea de búfalos em quarta passagem por citometria de fluxo.

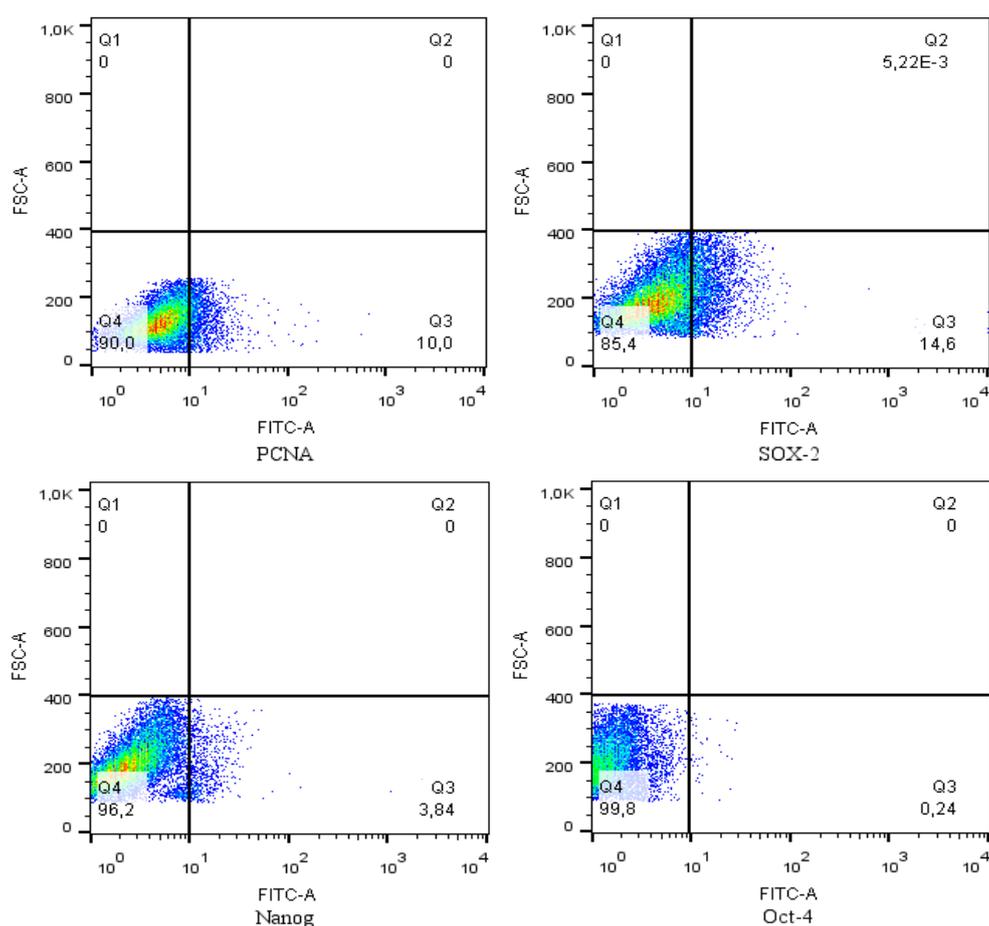


Fonte: FERREIRA (2018).

As células apresentaram expressão negativa para o marcador de proliferação celular PCNA (10%) e para os marcadores de pluripotência SOX-2 (14,6%), NANOG (3,84%) e OCT-4 (0,24%) (Figura 6). Os dados obtidos diferem dos achados de Gade et al. (2013) e Sreekumar et al. (2014) que, ao analisarem medula óssea e cordão umbilical de búfalos, respectivamente, relataram expressões significativas de SOX-2, NANOG e OCT-4. Embora a expressão dos marcadores de pluripotência já tenha sido confirmada em diversas pesquisas por meio de citometria de fluxo, ainda não se tem um

consenso no meio científico sobre o conjunto de marcadores equivalentes a animais de produção, principalmente bubalinos (DOMINITI et al., 2006). Por conta disso, até hoje são utilizados marcadores específicos da espécie humana, fazendo com que muitos pesquisadores questionem a eficiência destes marcadores ao serem utilizados em espécies diferentes.

Figura 7 – Gates de imunofenotipagem das células isoladas de medula óssea de búfalos em P4 por citometria de fluxo. Notar níveis baixos de expressão positiva para marcador de proliferação celular (PCNA) e os marcadores de



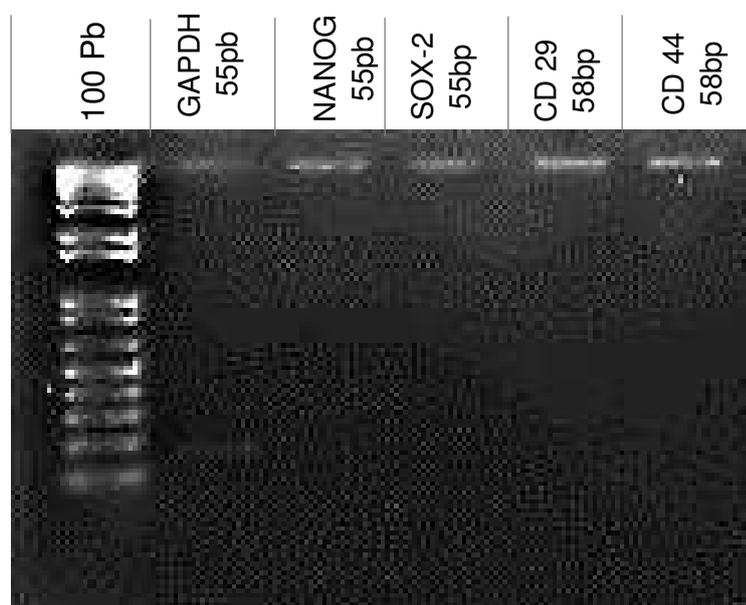
pluripotência (SOX-2 e NANOG) e marcação insignificante para OCT-4.

Fonte: FERREIRA (2018).

5.6 Expressão Gênica

Não houve expressão de nenhum dos genes analisados nas amostras da medula óssea de bubalinos (CD29, CD44, SOX-2 e NANOG) por qRT-PCR, a curva de melt das amostras não foram formadas. Diante desses resultados, as amostras foram corridas em gel de agarose, onde foi observada marcação apenas do controle endogênico (Figura 7). Estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Gates et al. (2013), por encontrarem expressões para os marcadores de pluripotência NANOG e SOX-2 em células da medula óssea de búfalos vivos, assim como os resultados obtidos por Gosh et al. (2015), que encontraram expressões tanto para os genes de células mesenquimais CD29 e CD44, quanto para os genes de pluripotência SOX-2 e NANOG.

Figura 8 – Gel de agarose das células da medula óssea de búfalos. Notar a expressão negativa tanto para os genes de células mesenquimais (CD29 e CD44), quanto para os genes de pluripotência (SOX-2 e NANOG).

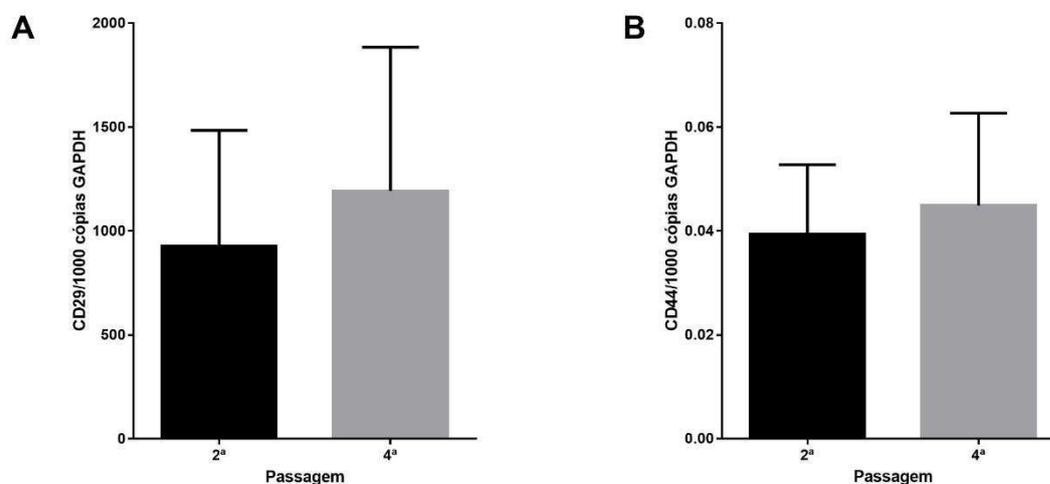


Fonte: FERREIRA (2018).

A análise de expressão gênica por qRT-PCR em células do cordão umbilical de bubalinos foi realizada em culturas de segunda e quarta passagem e foi observado que ambas passagens expressaram transcritos de mRNA dos

genes avaliados (CD29, CD44, SOX-2 e NANOG). Houve aumento na expressão do marcador de células mesenquimais CD29 da segunda para a quarta passagem, enquanto que o marcador CD44 apresentou pouca variação dos níveis de expressões entre essas passagens (Figura 8). Isso justifica o uso de células em quarta passagem na maioria dos experimentos, pois além de apresentar um grande número de células, a expressão dos marcadores de células mesenquimais (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e HLA-I) é mais homogênea (DEUS et al., 2012; PINTO FILHO et al., 2013).

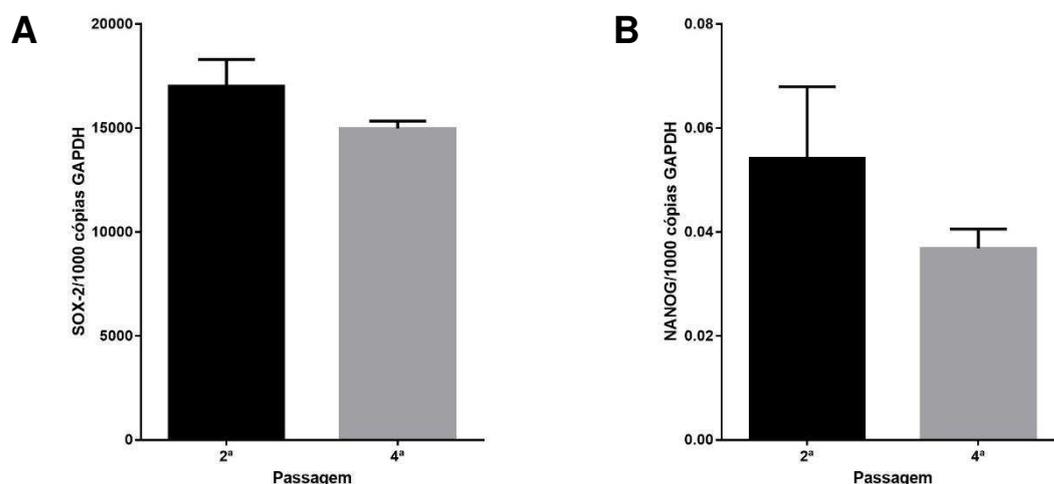
Figura 9 – Expressão gênica das células do cordão de búfalos por RT-PCR para marcadores de células mesenquimais.



Fonte: FERREIRA (2018).

No entanto, as células do cordão umbilical expressaram marcações para SOX-2 e para NANOG, que diminuíram suas expressões da passagem 2 para a passagem 4 (Figura 9). Esses marcadores de pluripotência são expressos em grande quantidade nas superfícies de células embrionárias e, quando se diferenciam em outras células, deixam de ser expressos (GAGLIARDI, 2013).

Figura 10 - Expressão gênica das células do cordão umbilical de búfalos por RT-PCR para marcadores de pluripotência.



Fonte: FERREIRA (2018).

SOX-2 e NANOG são capazes de manter suas características de auto renovação e a capacidade de pluripotência das células tronco embrionárias, porém os fatores que controlam a expressão desses genes ainda são desconhecidos (CHAMBERS et al., 2003). Com isso, podemos presumir que, quanto mais antigas forem as células, menor será a expressão dos marcadores de pluripotência. SOX2 e NANOG são considerados importantes fatores específicos das células-tronco mesenquimais, e quando expressos, evidenciam suas capacidades de pluripotência (OTSU et al., 2014). Já foi comprovado que esses fatores de transcrição (OCT4, SOX2 e NANOG) são capazes de reprogramar fibroblastos em células-tronco indiferenciadas e pluripotentes pela técnica de iPS (CHAMBERS et al., 2003). O NANOG desempenha a função de impedir a diferenciação celular, enquanto que o OCT4 possui propriedades indutoras da diferenciação, desta forma, o NANOG atua restringindo o potencial indutor de diferenciação celular do OCT4, permitindo que a célula continue indiferenciada (SARKAR e HOCHEDLINGER, 2013)

A quantificação absoluta elevada do NANOG é suficiente para sustentar os atributos necessários para identificação de uma célula tronco mesenquimal (CHAMBERS et al., 2003), além disso, a alta expressão do SOX2 é considerada um fator confiável na identificação destas células (BANERJEE et al., 2016). Desta forma, podemos afirmar que as células cultivadas a partir do cordão umbilical de búfalos *post-mortem* possuem tanto características mesenquimais quanto de capacidade de pluripotência.

O grande diferencial deste trabalho refere-se à coleta das amostras de cordão umbilical e medula óssea de bubalinos após o abate destes animais. Embora a coleta de material biológico *post-mortem* possa apresentar algumas desvantagens em relação à coleta in vivo, principalmente em relação à autólise das células, nossos resultados nos permitem afirmar que, de modo geral, o isolamento celular *post-mortem* não interferiu na capacidade de crescimento e proliferação celular, porém a imunofenotipagem e expressão de marcadores de pluripotência das células da medula ficaram comprometidas, entretanto foram expressos genes de células mesenquimais e de pluripotência nas células do cordão umbilical.

6 CONCLUSÃO

As células derivadas do cordão umbilical e da medula óssea de bubalinos *post-mortem* apresentam origem mesenquimatosa, assim como as células isoladas do cordão umbilical, sendo necessário a realização de mais testes.

REFERÊNCIAS

- ABO-AZIZA, Faten Abo-Aziza Mohamed; ZAKI, Abd El-Kader Ahmed. The Impact of Confluence on Bone Marrow Mesenchymal Stem (BMMS) Proliferation and Osteogenic Differentiation. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 121-132, 2017.
- ALABDULKARIM, Yasir et al. Recent advances in bone regeneration: The role of adipose tissue-derived stromal vascular fraction and mesenchymal stem cells. **Journal of Limb Lengthening & Reconstruction**, v. 3, n. 1, p. 4, 2017.
- ALVES, Endrigo Gabellini Leonel et al. Isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-14, 2017.
- ANAND, T. et al. Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryonic Stem Cell-Like Cells and Preimplantation Embryos Exhibit Comparable Expression of Pluripotency-Related Antigens. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 1, p. 50-58, 2011.
- ARINZEH, Treena Livingston et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. **JBJS**, v. 85, n. 10, p. 1927-1935, 2003.
- AUGELLO, Andrea; KURTH, Tobias B.; DE BARI, Cosimo. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. **Eur Cell Mater**, v. 20, n. 121, p. e33, 2010.
- BAER, Patrick C.; GEIGER, Helmut. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem cells international**, v. 2012, 2012.
- BAKSH, Dolores; YAO, Raphael; TUAN, Rocky S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem cells**, v. 25, n. 6, p. 1384-1392, 2007.
- BANERJEE, Abhishek et al. OCT4 and SOX2 are reliable markers in detecting stem cells in odontogenic lesions. **Journal of Orofacial Sciences**, v. 8, n. 1, p. 16, 2016.
- BARA, Jennifer J. et al. Concise review: Bone marrow-derived mesenchymal stem cells change phenotype following in vitro culture: implications for basic research and the clinic. **Stem cells**, v. 32, n. 7, p. 1713-1723, 2014.

BARBOZA, Carlos Augusto Galvão et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, n. 1, p. 75-81,

BARRY, Katherine L.; KOKKO, Hanna. Male mate choice: why sequential choice can make its evolution difficult. **Animal Behaviour**, v. 80, n. 1, p. 163-169, 2010.

BERG, Debra K. et al. Trophectoderm lineage determination in cattle. **Developmental cell**, v. 20, n. 2, p. 244-255, 2011.

BOBIS S.; JAROCHA D. MAJKA M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical Applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**. v. 44, p. 215-230, 2006.

BORGHESI, Jéssica. **Fenótipo e multipotencialidade de células progenitoras de membrana amniótica de Coelho (Oryctolagus cuniculus)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BORSTLAP, Joeri et al. International stem cell registries. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 242-246, 2010.

BOYETTE, Lisa B.; TUAN, Rocky S. Adult stem cells and diseases of aging. **Journal of clinical medicine**, v. 3, n. 1, p. 88-134, 2014.

BOYETTE, Lisa B.; TUAN, Rocky S. Adult stem cells and diseases of aging. **Journal of clinical medicine**, v. 3, n. 1, p. 88-134, 2014.

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. suppl 1, p. 25-35, 2009.

BYDLOWSKI, Sergio P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. suppl 1, p. 25-35, 2009.

CAPLAN, Arnold I.; CORREA, Diego. The MSC: an injury drugstore. **Cell stem cell**, v. 9, n. 1, p. 11-15, 2011.

CARVALHO, Antonio Carlos C. et al. Cell therapy in cardiology. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p. 75-81, 2009.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stemcells**, v. 25, p. 2739–2749, 2007.

CHAMBERS, Ian et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643-655, 2003.

CHAPEL, Alain et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. **The journal of gene medicine**, v. 5, n. 12, p. 1028-1038, 2003.

CHEN, Faye H.; TUAN, Rocky S. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. **Arthritis research & therapy**, v. 10, n. 5, p. 1-12, 2008.

CHEN, Fu Guo et al. Clonal analysis of nestin–vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. **Journal of cell science**, v. 120, n. 16, p. 2875-2883, 2007.

CHOI, Mi Ran et al. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience letters**, v. 472, n. 2, p. 94-98, 2010.

CHOPRA, Hitesh; HANS, Manoj Kumar; SHETTY, Shashit. Stem cells-the hidden treasure: A strategic review. *Dental research journal*, v. 10, n. 4, p. 421, 2013.

CHOPRA, Martin et al. Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 6, p. 1296-1303, 2013.

COCHARD, Philippe; PAULIN, Denise. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 2080-2094, 1984.

CROOK, Jeremy Micah; HEI, Derek; STACEY, Glyn. The international stem cell banking initiative (ISCB): raising standards to bank on. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 169-172, 2010.

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CAPLAN, Arnold I.; NARDI, Nance Beyer. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, Lindolfo; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

DA VEIGA PEREIRA, Lygia. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, 2008.

DAMASCENO, Flávio Alves et al. Adaptação de bubalinos ao ambiente tropical. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 7, p. 1370-1381, 2010.

DE FARIA, Andrea Baptista Coelho et al. Comparative Study Between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and from Adipose Tissue, Associated with Xenograft, in Appositional Reconstructions: Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 31, n. 6, 2016.

DEANS, Robert J.; MOSELEY, Annemarie B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental hematology**, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DEUS, Glaziane Cordeiro de et al. Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais de filtros reutilizáveis e descartáveis de medula óssea. **Einstein (São Paulo)**, v. 10, n. 3, p. 296-301, 2012.

DOMINICI, M. L. B. K. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ECKES, Beate et al. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. **Journal of cell science**, v. 111, n. 13, p. 1897-1907, 1998.

EIRIN, Alfonso et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. **Stem Cells**, v. 30, n. 5, p. 1030-1041, 2012.

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

FONG, Eliza LS; CHAN, Casey K.; GOODMAN, Stuart B. Stem cell homing in musculoskeletal injury. **Biomaterials**, v. 32, n. 2, p. 395-409, 2011.

FRANCIOLLI, André Luis Rezende. **Medicina Veterinária Regenerativa: multipotencialidade das células da membrana amniótica e do saco vitelino no modelo equino (Equus caballus, Linnaeus 1758)**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FRANKE, Werner W. et al. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis: III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. **Differentiation**, v. 23, n. 1-3, p. 43-59, 1982.

FRIEDENSTEIN, A.J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of pre-cursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**. 6:2 p. 30-247. 1968.

FUKUCHI, Yumi et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem cells**, v. 22, n. 5, p. 649-658, 2004.

GADE, Nitin E. et al. Molecular and Cellular Characterization of Buffalo Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 358-367, 2013.

GADE, Nitin E. et al. Molecular and Cellular Characterization of Buffalo Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 358-367, 2013.

GAGLIARDI, Alessia et al. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. **The EMBO journal**, v. 32, n. 16, p. 2231-2247, 2013.

GHOSH, Kaushalya et al. Buffalo (*Bubalus bubalis*) term amniotic-membrane-derived cells exhibited mesenchymal stem cells characteristics in vitro. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 51, n. 9, p. 915-921, 2015.

GIMBLE, Jeffrey M.; KATZ, Adam J.; BUNNELL, Bruce A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation research**, v. 100, n. 9, p. 1249-1260, 2007.

GIORDANO, Antonio; GALDERISI, Umberto; MARINO, Ignazio R. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of cellular physiology**, v. 211, n. 1, p. 27-35, 2007.

GOLDMAN, Robert D. et al. The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. **The Journal of cell biology**, v. 134, n. 4, p. 971-983, 1996.

GRAVES, Kathy H.; MOREADITH, Randall W. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 36, n. 4, p. 424-433, 1993.

GREWAL, S. et al. Continued neurocognitive development and prevention of cardiopulmonary complications after successful BMT for I-cell disease: a long-term follow-up report. **Bone marrow transplantation**, v. 32, n. 9, p. 957-960, 2003.

HERMIDA-GÓMEZ, Tamara et al. Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. **The Journal of rheumatology**, v. 38, n. 2, p. 339-349, 2011.

Himes, B.T., Neuhuber, B., Coleman, C., et al., 2006. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil. Neural Repair* 20, 278-296.

Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., ... & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395.

HSIEH, P.-S. et al. Suppressive effect of COX2 inhibitor on the progression of adipose inflammation in high-fat-induced obese rats. **European journal of clinical investigation**, v. 40, n. 2, p. 164-171, 2010.

HUANG, B. et al. Generation and Characterization of Embryonic Stem-Like Cell Lines Derived from In vitro Fertilization Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 122-128, 2010.

HUANG, GT-J.; GRONTHOS, S.; SHI, S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **Journal of dental research**, v. 88, n. 9, p. 792-806, 2009.

Iannaccone, P.M., Tabom, G.U., Garton, R.L., Caplice, M.D. and Brenin, D.R. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* 163,288-292. 1994;

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; TAKAHASHI, H.; IIZUKA, H. Lessons from disorders of epidermal differentiation-associated keratins. **Histology and histopathology**, v. 17, n. 1, p. 331-338, 2002.

KERN, Susanne et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.

KODE, A. J.; MUKHERJEE, S.; JOGLEKAR, V. M.; HARDIKAR, A. A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. **Cytotherapy**, v. 11, p. 377-391, 2009.

KRAMPERA, M.; FRANCHINI M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfus**, v. 5, p. 120-129, 2007.

KURODA, Yasumasa et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8639-8643, 2010.

KUZNETSOV, Sergei A. et al. Enumeration of the colony-forming units—fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. **Stem cell research**, v. 2, n. 1, p. 83-94, 2009.

LE BLANC, Katarina et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579-1586, 2008.

LE BLANC, Katarina; RINGDÉN, Olle. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, n. 5, p. 321-334, 2005.

LEE, Phil Hyu; PARK, Hyun Jung. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a candidate disease-modifying strategy in Parkinson's disease and multiple system atrophy. **Journal of Clinical Neurology**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2009.

LEE, Sung-Lim et al. Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 256-262, 2010.

LEHTONEN, E. et al. Parietal and visceral endoderm differ in their expression of intermediate filaments. **The EMBO journal**, v. 2, n. 7, p. 1023, 1983.

Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1044:132-8.

LUNA, Arthur CL et al. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. **BMC research notes**, v. 7, n. 1, p. 552, 2014.

LV, Feng-Juan et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 32, n. 6, p. 1408-1419, 2014.

MA, Teng. Mesenchymal stem cells: From bench to bedside. **World journal of stem cells**, v. 2, n. 2, p. 13, 2010.

MAIA, Leandro et al. Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. **Cell biology international**, v. 41, n. 3, p. 239-248, 2017.

MAIJENBURG, Marijke W. et al. The composition of the mesenchymal stromal cell compartment in human bone marrow changes during development and aging. **Haematologica**, p. haematol. 2011.047753, 2011.

MALEKI, Masoud et al. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. **International journal of stem cells**, v. 7, n. 2, p. 118, 2014.

MALGIERI, Arianna et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 3, n. 4, p. 248, 2010.

MANI, Sendurai A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.

MARTIN-RENDON, E. et al. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox sanguinis**, v. 95, n. 2, p. 137-148, 2008.

MEIRELLES, S. L.; CAPLAN, I. A.; NARDI, B. N. In Search of the In vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2287–2299, 2008.

MIMEAULT, Murielle; BATRA, Surinder K. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. **Stem cells**, v. 24, n. 11, p. 2319-2345, 2006.

MITRA, Abhisek et al. Cell-surface Vimentin: A mislocalized protein for isolating csVimentin+ CD133- novel stem-like hepatocellular carcinoma cells expressing EMT markers. **International journal of cancer**, v. 137, n. 2, p. 491-496, 2015.

MONTI, Manuela et al. Stem cells: sources and therapies. **Biological research**, v. 45, n. 3, p. 207-214, 2012.

MURAGLIA, Anita; CANCEDDA, Ranieri; QUARTO, Rodolfo. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **J Cell Sci**, v. 113, n. 7, p. 1161-1166, 2000.

NAGAMURA-INOUE, Tokiko; HE, Haiping. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. **World journal of stem cells**, v. 6, n. 2, p. 195, 2014.

Notarianni, E., Galli, C., Laurie, S., Moor, R.M. and Evans, M.J. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 43:255-260. 1991.

OKTAR, Pinar Akpınar et al. Continual expression throughout the cell cycle and downregulation upon adipogenic differentiation makes nucleostemin a vital human MSC proliferation marker. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 2, p. 413-424, 2011.

OSHIMA, R. G. Apoptosis and keratin intermediate filaments. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 5, p. 486-492, 2002.

Otsu K, Kumakami-Sakano M, Fujiwara N, Kikuchi K, Keller L, Lesot H, *et al.* Stem cell sources for tooth regeneration: Current status and future prospects. *Front Physiol* 2014;5:36.

PARK, Jung-Chul et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. 8, p. 721-731, 2011.

PAROLINI, Ornella et al. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine?. 2009.

PHINNEY, Donald G.; PROCKOP, Darwin J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.

PINTO FILHO, Saulo Tadeu Lemos et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 49-59, 2013.

PRENTICE, David A.; TARNE, Gene. Treating diseases with adult stem cells. **Science**, v. 315, n. 5810, p. 328-328, 2007.

RADA, Tommaso; REIS, Rui L.; GOMES, Manuela E. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 1, p. 64-76, 2011.

RAMÍREZ-ESPINOSA, Jesus J. et al. Bovine (*Bos taurus*) Bone Marrow Mesenchymal Cell Differentiation to Adipogenic and Myogenic Lineages. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 1, p. 51-64, 2016.

REN, Jiaqiang et al. Human bone marrow stromal cell confluence: effects on cell characteristics and methods of assessment. **Cytotherapy**, v. 17, n. 7, p. 897-911, 2015.

ANJANA, P. et al. STUDIES ON IN-VITRO CULTURING OF BUFFALO (*BUBALUS BUBALIS*) FETAL FIBROBLAST STEM CELLS. **The Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 32, n. 1, 2015.

RHODES, Steven D.; YANG, Feng-Chun. Single Cell Assay, Mesenchymal Stem Cells. In: **Encyclopedia of Systems Biology**. Springer New York, 2013. p. 1947-1950.

RUBINSTEIN, Pablo et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 22, p. 1565-1577, 1998.

RUSSELL, Katie C. et al. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. **Stem cells**, v. 28, n. 4, p. 788-798, 2010.

SADEESH, E. M. et al. A comparative study on expression profile of developmentally important genes during pre-implantation stages in buffalo hand-made cloned embryos derived from adult fibroblasts and amniotic fluid derived stem cells. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1447-1461, 2016.

SAITO, Takayuki et al. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells. **The Annals of thoracic surgery**, v. 74, n. 1, p. 19-24, 2002

SALEH, Razwa; REZA, Hasan Mahmud. Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 222, 2017.

SALEM, Husein K.; THIEMERMANN, Chris. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem cells**, v. 28, n. 3, p. 585-596, 2010.

SALLES, Marcela Miranda. Avaliação e caracterização de células-tronco mesenquimais na fração de células mononucleares de medula óssea de pacientes com doença falciforme. 2015.

SAMPAIO, R. V. et al. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 53-62, 2015.

SANTOS, Manuel J.; VENTURA-JUNCA, Patricio. Bioethical aspects of basic research and medical applications of human stem cells. **Biological research**, v. 45, n. 3, p. 317-326, 2012.

Sarkar A, Hochedlinger K. The sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell stem Cell* 2013;12:15-30.

SCARANO, Antonio et al. Bone Regeneration Induced by Bone Porcine Block with Bone Marrow Stromal Stem Cells in a Minipig Model of Mandibular "Critical Size" Defect. **Stem cells international**, v. 2017, 2017.

SCHWAB, K. E.; HUTCHINSON, P.; GARGETT, C. E. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. **Human reproduction**, v. 23, n. 4, p. 934-943, 2008.

SCHWEIZER, Jürgen et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. **J Cell Biol**, v. 174, n. 2, p. 169-174, 2006.

SEO, Kwang-Won et al. OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB- MSCs). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 384, n. 1, p. 120-125, 2009.

SHAH, Syed Mohmad et al. Retinoic acid induces differentiation of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryonic stem cells into germ cells. **Gene**, v. 626, p. 358-366, 2017.

SHARMA, Poonam et al. Correction to: Deformability of Human Mesenchymal Stem Cells Is Dependent on Vimentin Intermediate Filaments. **Annals of Biomedical Engineering**, p. 1-2, 2018.

SINGH, Jarnail et al. Cultured buffalo umbilical cord matrix cells exhibit characteristics of multipotent mesenchymal stem cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, n. 6, p. 408-416, 2013.

SPRADA, Arícia Gomes et al. Toxicidade e estresse oxidativo das células mesenquimais estromais de tecido adiposo de cão em diferentes passagens de cultura. 2014.

SPRING, Herbert et al. Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 50, p. 18111-18116, 2005.

SREEKUMAR, T. R.; ANSARI, M. M.; CHANDRA, V. G Sharma T (2014) Isolation and Characterization of Buffalo Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells. **J Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 207, p. 2, 2014.

STOLL, Elizabeth A. Advances toward regenerative medicine in the central nervous system: challenges in making stem cell therapy a viable clinical strategy. **Molecular and cellular therapies**, v. 2, n. 1, p. 12, 2014.

STRELCHENKO, N. Bovine pluripotent stem cells. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 131-140, 1996

STRUYS, Tom et al. Ultrastructural and immunocytochemical analysis of multilineage differentiated human dental pulp-and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **Cells Tissues Organs**, v. 193, n. 6, p. 366-378, 2011.

TABATABAEI, Meraj et al. Isolation and partial characterization of human amniotic epithelial cells: the effect of trypsin. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 10, 2014.

TAJBAKHS, Shahrugim. Losing stem cells in the aged skeletal muscle niche. **Cell research**, v. 23, n. 4, p. 455, 2013.

TAKAHASHI, Satoshi et al. Single-institute comparative analysis of unrelated bone marrow transplantation and cord blood transplantation for adult patients with hematologic malignancies. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3813-3820, 2004.

TELUGU, Bhanu Prakash VL; WALKER, Angela M.; GREEN, Jonathan A. Characterization of the bovine pregnancy-associated glycoprotein gene family—analysis of gene sequences, regulatory regions within the promoter and expression of selected genes. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 185, 2009.

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

THOMSON, James A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 7844-7848, 1995.

TONDREAU, Tatiana et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem cells**, v. 23, n. 8, p. 1105-1112, 2005.

TROUNSON, Alan. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. **Endocrine reviews**, v. 27, n. 2, p. 208-219, 2006.

VAN PHAM, Phuc et al. Good manufacturing practice-compliant isolation and culture of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of translational medicine**, v. 12, n. 1, p. 56, 2014.

VARMA, Maikel J. Oedayrajsingh et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem cells and development**, v. 16, n. 1, p. 91-104, 2007.

VIDANE, Atanasio S. et al. Cat amniotic membrane multipotent cells are nontumorigenic and are safe for use in cell transplantation. **Stem cells and cloning: advances and applications**, v. 7, p. 71, 2014.

WAN, Chi-Dan et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 7, n. 1, p. 29-33, 2008.

WAN, Jian-Xin et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into tubular epithelial-like cells in vitro. **Cell biochemistry and function**, v. 30, n. 2, p. 129-138, 2012.

WANG, Youwei et al. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. **Stem cells international**, v. 2012, 2012.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WEISSMAN, Irving L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **cell**, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2000.

WERNER, Stefan et al. Expression of Epithelial Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cell Markers in Circulating Tumor Cells. In: **Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells**. Springer International Publishing, 2017. p. 205-228.

WHEELER, Matthew B. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. **Reproduction, fertility and development**, v. 6, n. 5, p. 563-568, 1994

WILLIAM, T. Tse et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v. 75, n. 3, p. 389-397, 2003.

WOLFE, Margaret et al. Isolation and culture of bone marrow-derived human multipotent stromal cells (hMSCs). **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols**, p. 3-25, 2008.

YADAV, P. S. et al. Expression of pluripotency genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) amniotic fluid cells. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 4, p. 705-711, 2011.

YARAK, Samira; OKAMOTO, Oswaldo Keith. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2010.

YOSHIMURA, Hideya et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. **Cell and tissue research**, v. 327, n. 3, p. 449-462, 2007

YU, Jennifer et al. Abstract A45: Semaphorin 3C mediates glioma stem cell tumorigenicity and radioresistance. 2015.

ZEISBERG, Michael; NEILSON, Eric G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 6, p. 1429, 2009.

ZHANG, Jiwang et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 518-522, 2006.

ZHENG, Z. H. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell and mesenchymal stem cell-differentiated chondrocyte suppress the responses of type II collagen-reactive T cells in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 47, n. 1, p. 22-30, 2008.

CHAE, Yeon Ji et al. PO-020: FOXA2 Overexpression Promotes Hepatic Differentiation of Adipose Tissue Derived Stem Cells. **춘·추계 학술대회 (KASL)**, v. 2016, n. 1, p. 89-89, 2016.

DA SILVA SASSO, Gisela Rodrigues et al. Células-tronco oriundas do fluxo menstrual: possíveis aplicações. **Reprodução & Climatério**, v. 32, n. 1, p. 39-42, 2017.