

FLUIDO AMNIÓTICO, ALTERNATIVA EFICIENTE PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES

(Amniotic fluid, efficient alternative to obtain multipotent mesenchymal stem cells)

Juliana Paula Martins ALVES; Juliana Gomes VASCONCELOS;
Davide RONDINA; Rafael ROSSETTO*

Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr.
Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza-CE, CEP: 60.740-000.

*E-mail: rafael.rossetto@hotmail.com

RESUMO

Na última década houve um crescente interesse na investigação quanto à presença de células-tronco no fluido amniótico, devido a facilidade de obtenção, isolamento e cultivo *in vitro*. Além disso, a utilização do fluido como fonte de células-tronco possibilita a obtenção de células com alto grau de indiferenciação e elevada taxa de proliferação *in vitro* e grande capacidade de diferenciação. Todas estas vantagens tornam o líquido amniótico uma fonte atrativa de células-tronco para utilização em biotecnologias reprodutivas, como a clonagem e transgênese, bem como ensaios clínicos e terapias celulares em animais para posterior utilização em seres humanos. Este artigo apresenta um panorama da pesquisa científica com células-tronco derivadas do fluido amniótico no mundo, a partir de levantamento bibliográfico de artigos científicos de pesquisadores brasileiros e estrangeiros.

Palavras-chave: Líquido amniótico, células-tronco, diferenciação celular; marcadores.

ABSTRACT

In the last decade there has been a growing interest in investigation of presence of stem cells in amniotic fluid due to the ease of obtaining, isolating and *in vitro* culture. In addition, the use of amniotic fluid as a source of stem cells makes it possible to obtain cells with a high degree of indifferenciation and a high rate of *in vitro* proliferation and a great capacity for differentiation. All of these advantages make amniotic fluid an attractive source of stem cells for use in reproductive biotechnologies, such as cloning and transgenesis, as well as clinical trials in animals for further use in humans. This article presents a panorama of the scientific research with stem cells derived from amniotic fluid in the world, from a bibliographical survey of scientific articles of Brazilian and foreign researchers.

Key words: Amniotic fluid, stem cells, cell differentiation; markers.

INTRODUÇÃO

No campo emergente da medicina regenerativa, a utilização de células-tronco representa uma ferramenta biológica útil para manter a homeostase de órgãos e realizar a restauração de tecidos danificados (COLOSIMO *et al.*, 2013). Estas células desempenham um papel importante na medicina humana e veterinária de várias maneiras, tornando-se

uma alternativa promissora para terapia regenerativa, engenharia de tecidos e terapia celular, buscando restaurar o funcionamento de tecidos ou órgãos lesionados, através da proteção da integridade celular, restituindo células lesionadas, promovendo assim regeneração e reparação adequada dos tecidos, além de apresentar características imunomoduladoras e imunossupressoras que ampliam sua utilização terapêutica (KOLAPARTHY e FAVARON *et al.*, 2015, MARTINELLI *et al.*, 2016). As células-tronco são células indiferenciadas, que estão presentes em diversos órgãos e tecidos, e são caracterizadas por sua capacidade de proliferação, auto renovação e de responder a estímulos externos e originar diferentes tipos celulares mais especializados (ALVES; MUOTRI, 2014).

Várias fontes de células-tronco são sugeridas, cada uma delas mostrando vantagens e limites, sendo divididas em dois grandes grupos: células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco mesenquimais (CTM) (REHEN e PAULSEN, 2007). Tais células podem ser encontradas após o nascimento em diferentes regiões do organismo, podendo gerar subtipos de células teciduais dos quais derivam, com capacidade limitada de diferenciação

(ZORZANELLI *et al.*, 2015). As CTM fetais apresentam vantagens, como telômeros mais longos, telomerase ativa e maior capacidade de expansão (HAWKINS *et al.*, 2018), porém o seu potencial está estritamente relacionado à idade do doador (PITTENGER *et al.*, 1999).

Na última década houve um crescente interesse na investigação quanto à presença de CTM em anexos fetais como a placenta, fluido amniótico, sangue do cordão umbilical, matriz extravascular de cordão umbilical e membrana amniótica (MIKI *et al.*, 2005; CREMONESI *et al.*, 2011; URANIO *et al.*, 2011).

As células-tronco dos anexos fetais possuem propriedades clínicas vantajosas, como a ausência de efeito tumorigênico *in vivo*, atividades anti-inflamatórias e antifibróticas (PAROLINI *et al.*, 2009), propriedades imunomoduladoras e capacidade de inibir fortemente a proliferação de linfócitos T (MAGATTI *et al.*, 2008). A descoberta de CTM oriundas do fluido amniótico acrescenta uma nova fonte promissora de células-tronco para terapias de medicina regenerativa (CREMONESI *et al.*, 2011), que ganhou grande importância devido à facilidade de obtenção e isolamento de uma população de células que possuem características de células-tronco pluripotentes (DE COPPI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009; JEZERSKI *et al.*, 2010). Além de apresentarem características semelhantes à das células-tronco adultas, as CTM derivadas do fluido amniótico apresentam também propriedades de células-tronco embrionárias (ROUBELAKIS *et al.*, 2015).

O fluido amniótico é constituído de uma população fenotipicamente heterogênea que inclui células derivadas da membrana fetal e tecidos fetais, variando em composição em relação à idade gestacional. Entre essa população heterogênea foram encontradas células multipotentes indiferenciadas e pluripotentes que apresentam propriedades biológicas preservadas, capazes de serem cultivadas e expandidas *in vitro* em humanos (DE

COPPI *et al.*, 2007) e diferentes modelos animais, incluindo rato (GHIONZOLI *et al.*, 2010), ovelha (MAURO *et al.*, 2010; COLOSIMO *et al.*, 2013), porco (CHEN *et al.*,

2011), cão (URANIO *et al.*, 2011), cavalo (PARK *et al.*, 2011), búfalo (DEV *et al.*, 2011), gatos (IACONO *et al.*, 2012), vacas (CORRADETTI *et al.*, 2013) e cabras (PRATHEESH *et al.*, 2013).

Embora já esteja clara a possibilidade de expansão das células-tronco do fluido amniótico *in vitro* (CHEN *et al.*, 2011), as informações sobre o efeito do ambiente de cultivo artificial sobre seu fenótipo e características de plasticidade ainda são limitadas. Desta forma, este artigo fornece uma visão geral sobre o conhecimento disponível na literatura sobre as etapas de isolamento, expansão, caracterização e possibilidades de utilização das células-tronco do líquido amniótico em diferentes espécies.

DESENVOLVIMENTO CARACTERÍSTICAS DO FLUIDO AMNIÓTICO

O fluido amniótico é um líquido aquoso protetor e nutritivo que fornece suporte mecânico durante a embriogênese, sendo constituído por cerca de 98% de água (ROUBELAKIS *et al.*, 2012). Outros componentes incluem eletrólitos, pigmentos, açúcares, gorduras, aminoácidos, proteínas, carboidratos, enzimas, fatores de crescimento e células variando seu volume e composição ao longo da gestação em decorrência das mudanças fetais e de seus anexos (GOSDEN, 1983; ESLAMINEJAD e JAHANGIR, 2012). O fluido amniótico começa a aparecer no início da segunda semana de gestação na maioria dos mamíferos, como uma pequena quantidade de líquido entre as células do epiblasto (futuro embrião) que aumenta ao longo do desenvolvimento do conceito e o separa do amnioblasto (futuro âmnio) formando a cavidade amniótica (MIKI e STROM, 2006).

O fluido pertencente à cavidade amniótica apresenta osmolaridade semelhante ao plasma fetal, podendo ser considerado um ultrafiltrado do sangue materno (HOEHN e SALK, 1982). A origem dos fluidos fetais, com destaque ao âmnio, é complexa e existem pelo menos quatro locais em que podem ocorrer a absorção e a secreção, tais como: o sistema respiratório, urinário, digestivo e a pele fetal (TONIOLLO e VICENTE, 1995). Nos animais domésticos, o fluido amniótico é considerado um produto de secreção das paredes ou folhetos amnióticos, bem como da saliva, escamação cutânea, secreção nasal do feto e, temporariamente, por urina eliminada pela uretra (GRUNERT e BIRGEL, 1984).

Independente da fase gestacional, o fluido amniótico é heterogêneo e contém vários tipos de células em suspensão, derivadas do embrião ou de origem extraembrionária. Algumas destas células possuem propriedades de CTE, enquanto outras podem ser células diferenciadas e indiferenciadas provenientes dos três folhetos germinativos, sendo que a sua derivação varia com a idade do feto (DEV *et al.*, 2011). Durante toda a gestação ocorre a liberação de diferentes tipos celulares de origem ectodérmica, mesodérmica e endodérmica as quais podem variar de tamanho e morfologia, de escamosas a arredondadas (BYDŁOWSKI *et al.*, 2009). Estas células podem ser classificadas em três grupos: epitelióides, que se originam da pele e da urina do feto (WEISSMAN, 2000); células específicas do fluido amniótico, originadas das membranas fetais e do trofoblasto (produtoras de estrógenos, progesterona e gonadotrofina coriônica humana); e células

proveniente de fibras de tecidos conjuntivos e fibroblastos dérmicos (ECKFELDT *et al.*, 2005).

As células-tronco do fluido amniótico têm características fenotípicas similares às de CTM derivadas de outras fontes, como sangue de cordão umbilical e tecido fetal de primeiro trimestre (sangue, fígado e medula óssea), as quais são imunofenotipicamente positivas para SH2, SH3, SH4, CD29, CD44 e HLA. - A, B, C e negativas para CD10, CD11b, CD14, CD34, CD117, EMA e HLA-DR, DP, DQ (PITTENGER *et al.*, 1999; COLTER *et al.*, 2001; YOUNG *et al.*, 2001). Mais importante ainda, CTM do fluido expressam tanto o RNAm para Oct4 como sua proteína (PRUSA *et al.*, 2003), e este é um fator de transcrição expresso em células-tronco embrionárias e células germinativas embrionárias (HENDERSON *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2002), o que sugere que o líquido amniótico pode conter células-tronco de alta eficiência.

Para comprovar esta hipótese, diversos trabalhos foram realizados para isolar, expandir e diferenciar as células-tronco do fluido *in vitro*. Roubelakis *et al.* (2007) comprovaram que as células-tronco podem ser facilmente isoladas do fluido amniótico e expandidas *in vitro* a partir da amniocentese de mulheres no segundo trimestre de gestação. Estes autores evidenciaram que as células-tronco obtidas podem se diferenciar em tipos de células derivadas dos três folhetos germinativos e expressaram o marcador de pluripotência Oct-4, a proteína Nanog humana e o antígeno embrionário específico para estágio 4 (SSEA-4). Quando os autores compararam o imunofenótipo das células-tronco de origem do fluido amniótico com as de origem da medula óssea, foi observado que as células-tronco cultivadas exibem padrões de expressão de proteínas, bem como padrão de funcionalidade destas proteínas semelhantes. No entanto, as células-tronco do fluido amniótico em cultivo exibiram um número maior de proteínas únicas relacionadas à proliferação e ao fenótipo primitivo (ROUBELAKIS *et al.*, 2007).

Assim, já está estabelecido que células do fluido amniótico ao serem isoladas, são capazes de manter a proliferação em estágio indiferenciado por longo período, e por ocasião de diferentes estímulos pode se diferenciar *in vitro* nas três linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica, apresentando alta cinética de crescimento e expressão de marcadores de pluripotencialidade (MACEK *et al.*, 1973; CREMONESI *et al.*, 2011; DEV *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011), podendo ainda se diferenciar em outros tipos celulares provenientes dos três folhetos embrionários. Outros estudos têm reportado que as CTM isoladas a partir do fluido amniótico mantêm a capacidade de se diferenciar *in vitro* em outros tipos de células além das linhagens mesenquimais comuns (adipócitos e osteócitos), já que foram diferenciadas com sucesso em células semelhantes a neurônios (TSAI *et al.*, 2004). Estudos mais recentes evidenciaram ainda que as células-tronco isoladas do fluido não apresentaram anormalidades no cariótipo, promovendo linhagem homogênea de células mesenquimais imaturas com longos telômeros e com grande potencial de proliferação (CREMONESI *et al.*, 2011). Esses achados são bastante encorajadores, já que estas células poderiam ser diferenciadas em múltiplos tipos de células mesodérmicas e neuronais que expressam marcadores neuronais, sugerindo que as CTM do fluido amniótico podem ser capazes de superar o comprometimento das linhagens germinativas (TSAI *et al.*, 2004).

MÉTODOS DE COLETA DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E CULTIVO *IN VITRO* DAS CTM DERIVADAS

A coleta das células do fluido para posterior isolamento e expansão das CTM é realizada por procedimentos mais simples e rápidos e menos invasivos do que aqueles para obtenção de outras fontes de CTM, o que constitui uma grande vantagem para utilização destas células. Além disso, encontra-se livre dos entraves éticos, morais e religiosos que cercam, por exemplo, o uso de CTE. Na medicina veterinária podem ser facilmente obtidas no momento do parto normal (Fig. 01), em cesarianas, através de intervenção cirúrgica ou ainda em abatedouros, já que úteros gravídicos são considerados descarte (CREMONESI *et al.*, 2011; LOVATI; PARK *et al.*, 2011; URANIO *et al.*, 2011), e em mulheres pode ser obtido a partir de exames clínicos como amniocentese (TSAI *et al.*, 2004).



Figura 01: Procedimento de coleta de líquido amniótico em cabras no momento do parto.

(A) Palpação e identificação do momento do parto; (B) Identificação da cavidade amniótica e aspiração do líquido amniótico; (C) Acondicionamento do líquido amniótico em tubo cônico para processamento.

Para obtenção de fluidos fetais em animais vivos em diferentes idades gestacionais, o método eleito é o da amniocentese transabdominal, que é considerado um procedimento seguro e pode ser realizado no ambulatório (HERVEY e SLATER, 1967; BAETZ *et al.*, 1976; WINTOUR *et al.*, 1986; DOMINGUEZ *et al.*, 2006). Resumidamente, antes da amniocentese, uma análise ultrassonográfica é realizada para confirmar a viabilidade fetal, idade gestacional, número de fetos, localização placentária, volume, levantamento anatômico fetal, anormalidades da cavidade uterina, para então ser realizada a avaliação do melhor local de inserção da agulha (MOSCHIDOU *et al.*, 2013). Em ovinos, (MELLOR e SLATER, 1972) indicaram a cateterização para obtenção dos líquidos fetais. Já em caprinos, (LOVELL *et al.*, 1995) recomendaram a aspiração guiada por ultrassonografia, entre os dias 59 a 65 de gestação. Contudo, é possível obter amostras em abatedouros, do início ao final da gestação (HERVEY e SLATER, 1967; BAETZ *et al.*, 1976; WINTOUR *et al.*, 1986; DOMINGUES *et al.*, 1990). Inicialmente, acreditava-se que as melhores amostras para a obtenção das CTM do fluido amniótico eram obtidas até o segundo trimestre de gestação. Entretanto, sabe-se que é possível obter as CTM que expressam marcadores de pluripotência em fluido amniótico em diferentes idades gestacionais (BYDLOWSK *et al.*, 2009). Em bovinos, realizou-se com sucesso a aspiração de líquido amniótico pela via transvaginal (GARCIA e SALAHEDDINE, 1997). Já na

espécie canina, a aminocentese foi realizada por (URANIO *et al.*, 2011), o qual empregou o procedimento cirúrgico (cesariana) para obtenção dos fluidos fetais de cadelas.

Na medicina humana, a utilização do fluido amniótico apresenta como principal vantagem a facilidade de obtenção, uma vez que a amniocentese é um procedimento de rotina como propedêutica fetal e está associado a um baixo número de complicações, podendo também ser coletado em cesarianas eletivas (CREMONESI *et al.*, 2011). De Coppi *et al.* (2007), isolaram populações de células do líquido amniótico com alto potencial clonogênico, as quais demonstraram excelente capacidade de auto renovação, ampla expansão em cultivo *in vitro* e manutenção do comprimento de telômeros por diversas passagens (DE COPPI *et al.*, 2007). É importante ressaltar que, apesar de sua alta taxa de proliferação, as células derivadas do fluido amniótico preservam uma constante morfologia, taxa de apoptose e expressão de marcadores de pluripotência em altas passagens (CANANZI, 2011). Diversos pesquisadores vêm demonstrando sistemas de isolamento e cultivo *in vitro* (Tab. 01), os quais podem variar de acordo com a espécie e métodos de obtenção.

Existem três protocolos principais para o isolamento de CTM derivadas do fluido amniótico: o primeiro é baseado no cultivo *in vitro* direto, descrito por Steigman *et al.* (2009), no qual as células-tronco coletadas do fluido amniótico no primeiro estágio gestacional são centrifugadas, o número de células é contado por hemocítômetro, as células são acondicionadas em placas e cultivadas utilizando o meio Dulbecco Medium Eagle modificado (DMEM[®]) suplementado com soro fetal bovino (SFB). Assim, as células podem aderir a placa de cultivo de plástico a concentração de 10^4 células/cm² incubadas a 37 °C em atmosfera gasosa contendo 5% de CO₂ em ar. A troca de meio é realizada a cada 3 a 5 dias para remoção das células não aderentes na etapa inicial de cultivo *in vitro*, e duas vezes por semana depois disso. As células primárias são cultivadas até atingirem à confluência e são definidos como passagem "0". Neste momento, as células podem ser criopreservadas, utilizando meios de criopreservação (10% de DMSO - dimetilsulfóxido e SFB - Soro Fetal Bovino a 90%), congeladas a -80 °C por 24 horas, e armazenadas em nitrogênio líquido no dia seguinte ou ainda serem expandidas (GHOLIZADEH-GHALEHAZIZ *et al.*, 2015). Nas primeiras passagens, as células mantêm uma forma arredondada e demonstram uma capacidade proliferativa muito baixa.

Após a primeira semana, as células mudam a sua morfologia, tornando-se mais alongadas e proliferando mais rapidamente, ao atingir 80% de confluência, elas precisam de uma passagem a cada 48 a 72 h. O tempo de duplicação das células indiferenciadas é de 36 h, com pequena variação de acordo com a passagem (DE COPPI *et al.*, 2007).

O segundo é um método de imunosseleção com base em antígenos de superfície. Ditadi *et al.* (2009) foram os primeiros pesquisadores a mostrarem que a população de células extraídas do fluido amniótico podia ser c-Kit positiva e ter potencial hematopoiético (DITADI *et al.*, 2009). Estudos realizados em seguida demonstraram que células isoladas c-kit e CD133 positivas podem ser facilmente expandidas *in vitro*, e subpopulações de CD133 positivos apresentaram características semelhantes a células mesenquimatosas (DE COPPI *et al.*, 2007).

Tabela 01: Método de Isolamento e sistemas de cultivo *in vitro* de CTM derivadas do líquido amniótico em diferentes espécies.

Espécie	Protocolo de Isolamento	Sistema de Cultivo	Referência
Humanos	Aminocentese guiada por ultrassonografia utilizando agulha 22G	α -MEM (Gibco, Invitrogen) contendo 15% SFB, 1% glutamina 1% penicilina/estreptomicina (Gibco), suplementado com 18% Chang B e 2% Chang C (Irvine Scientific) a 37 °C em 5% CO ₂ .	(DE COPPI <i>et al.</i> , 2007)
Rato	Cesariana com remoção do útero aos 14 dias de gestação. O líquido amniótico foi filtrado com filtro de 0.45- μ m e as amostras foram obtidas após centrifugação de 1.500 rpm a 5 min e imuno seleção com c-kit (Santa Cruz Biotechnology).	α -MEM (Gibco, Invitrogen) contendo 15% SFB, 1% glutamina 1% penicilina/estreptomicina (Gibco), suplementado com 18% Chang B e 2% Chang C (Irvine Scientific) a 37 °C em 5% CO ₂ .	(GHIONZOLI <i>et al.</i> , 2010)
Ovelha	Cesariana com 60-80 dias de gestação. Amostras obtidas após centrifugação com gradiente de Ficoll a 2500 rpm por 10 min.	DMEM contendo 20% soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina, 2 mM L-glutamina (Gibco, Grand Island, NY) and 5 ng/ml fator de crescimento fibroblático (FGF) (Sigma) a 38,5 °C em 5% CO ₂ .	(MAURO <i>et al.</i> , 2010)
Porco	Aminocentese realizada no início da gestação. Amostras centrifugadas a 400 g durante 5 min. Após lavagem com PBS, plaqueadas em placa de cultivo de 6 poços (Costar).	α -MEM (Invitrogen), 15% soro fetal bovino (SFB) 1% glutaminae 1% penicilina/estreptomicina, a 38 °C em 5% CO ₂ .	(CHEN <i>et al.</i> , 2011)
Cão	Cesariana no terço inicial da gestação, 25-40 dias de idade gestacional.	(DMEM; D5546; Sigma), soro bovino fetal (FBS;10%; F3018, Sigma), L-glutamina (2 mM; G7513; Sigma), penicilina (100 U/mL) de estreptomicina (100 mg/mL) e anfotericina (0,25 mg/mL) (A5955, Sigma) fator de crescimento epidérmico (EGF; 10 ng/mL; E4127, Sigma). 38,5 °C com 5% de CO ₂	(URANIO <i>et al.</i> , 2011)
Cavalo	Coleta no momento do parto com agulha de 30 ml e agulha calibre 18. Amostras obtidas após centrifugação com gradiente de Ficoll a 2500 rpm por 10 min.	EBM contendo soro fetal bovino (SFB 20%) em placas de cultivo com matriz de fibronectina sob incubação a 37 °C em 5% CO ₂ .	(PARK <i>et al.</i> , 2011)
Bovinos	Amostra obtida no momento do parto com agulha de calibre 18 e seringa de 60 mL contendo 1mL de EDTA. Amostra diluída de 1:1 com PBS e centrifugada a 470g por 15 min.	DMEM suplementadas com 10% SFB, 10 ng/mL EGF fator de crescimento epidermal, 1% penicilina (100 UI/mL), streptomicina (100 mg/mL), 0.25 mg/mL anfotericina B, e 2 mM L-glutamina. 38,5 °C c/ 5% de CO ₂ .	(CORRADETTI <i>et al.</i> , 2013)
Caprinos	Coleta realizada de úteros de abatedouros. O líquido foi centrifugado a 1000rpm/10 min para obtenção da amostra celular.	DMEM suplementado com 15% FBS, 1% glutamina e 1% penicilina/estreptomicina, a 37 °C em 5% de CO ₂ .	(PRATHEES H, <i>et al.</i> , 2013)

Aproximadamente 0,8% a 1,4% das células em fluido amniótico demonstraram ser c-kit positivo na análise por triagem celular ativada por fluorescência e podem ser facilmente isoladas pelo método de imunoseleção (JOO *et al.*, 2012).

O terceiro é o protocolo de cultivo de dois estádios estabelecido por (TSAI *et al.*, 2014), no qual no cultivo primário foram utilizadas células não aderentes derivadas do fluido amniótico para isolar as CTM. Neste protocolo, as células do fluido amniótico não aderentes são coletadas do sobrenadante das placas onde estão sendo cultivadas as células-tronco do fluido amniótico de acordo com o primeiro protocolo (primeira etapa), e isoladas apenas as células com potencial proliferativo que em passagens futuras constituirão a população homogênea de CTM derivadas do fluido amniótico (TSAI *et al.*, 2014).

Independentemente do método de isolamento e seleção das linhagens de CTM derivadas do fluido amniótico, estas devem obedecer aos critérios de classificação para multipotência com características semelhantes às CTE e CTM adultas (DE COPPI *et al.*, 2007).

CARACTERIZAÇÃO DAS CTM DERIVADAS DO FLUIDO AMNIÓTICO

Uma caracterização completa da população de células pluripotentes do fluido amniótico foi relatada por De Coppi *et al.* (2007). Estas células isoladas têm propriedades específicas que as caracterizam como CTM e fundamentam-se, inicialmente, na expressão de c-kit, um marcador de superfície expresso por células estaminais de origem mesenquimatosas (DE COPPI *et al.*, 2007). Além disso, estudos evidenciam que estas células mostram propriedades similares, mas não idênticas as CTE, sendo capazes de produzir linhagens representativas das três camadas germinativas (ANTONUCCI *et al.*, 2014). Em humanos, as CTM, expressam uma ampla gama de marcadores de pluripotência (OCT4, SOX2, SSEA4, SSEA3, c-MYC, KFL4) e marcadores de diferenciação (BMP-4, nestin, AFP, HNF-4e GATA) (ANTONUCCI *et al.*, 2014). Em outras espécies, estas mesmas células tem a capacidade de expressar CD73, CD90, CD105, CD29, CD166, CD49e, CD58, CD44 e antígenos HLA-ABC e não expressar marcadores hematopoiéticos, como CD14, CD34, CD45 e CD133, marcador endotelial como CD31 e o antígeno HLA-DR (ROUBELAKIS *et al.*, 2013) conforme apresentado na Fig. 02.

Apesar de existirem inúmeros marcadores para a caracterização da CTM, os critérios básicos exigidos envolvem a expressão de CD73, CD90 e CD105. O marcador CD73 é uma enzima catabólica de purina com ampla especificidade do substrato que catalisa a desfosforilação de purina e pirimidina ribo- e desoxirribonucleósido monofosfatos aos seus nucleósidos correspondentes (NAITO e LOWENSTEIN, 1981). Além disso, CD73 desempenha um papel na adesão celular (AIRAS *et al.*, 1995). CD90, também chamado Thy-1, e foi originalmente descoberto como um antígeno de timócito. Thy-1 pode ser usado como um marcador para uma variedade de células-tronco e para o axônio de neurônios maduros (NAKAMURA *et al.*, 2006).

Já o CD105, ou endoglobina, é um conhecido marcador de CTM o qual faz parte do complexo do receptor de TGF β envolvido na organização do citoesqueleto que afeta a morfologia e migração celular. Além disso, as CTM não expressam marcadores

hematopoiéticos, como CD14, CD34 e CD45. O CD45 é um marcador pan-leucocitário, enquanto os marcadores CD34 são primitivos progenitores hematopoiéticos e de células endoteliais e o CD14 é expresso em monócitos e macrófagos (DOMINICI *et al.*, 2006).

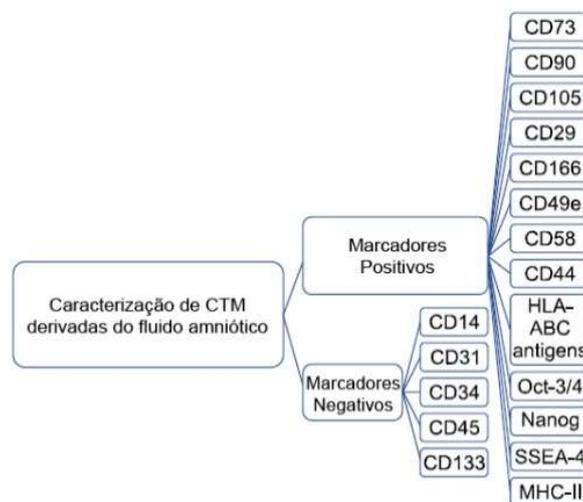


Figura 02: Diagrama de caracterização de CTM derivadas do fluido amniótico pela presença ou ausência de marcadores específicos. (adaptado de GHOLIZADEH-GHALEHAZIZ *et al.*, 2015).

Como critério de diferenciação clássica, a linhagem osteogênica requer incubação de células em monocamadas em meio contendo soro fetal bovino, com ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona, resultando em aumento da fosfatase alcalina e da deposição de cálcio. Já a diferenciação condrogênica requer um cultivo em pellets de alta densidade celular ou micromassa com o uso do fator de crescimento transformante- β em um meio quimicamente definido sem soro. A análise histológica revela a produção de cartilagens específicas, proteoglicanos sulfatados e colágeno tipo II. Para a diferenciação adipogênica é necessário o tratamento do meio com dexametasona, insulina, isobutil metil xantina e indometacina adicionada ao meio contendo soro fetal bovino. Após a indução da diferenciação nesta linhagem é possível observar o aparecimento de vacúolos lipídicos detectados com o corante oil red (PRATHEESH *et al.*, 2013).

BENEFÍCIOS DAS CTM DERIVADAS DO FLUIDO AMNIÓTICO

Devido sua origem fetal, as CTM derivadas do fluido amniótico permitem a reprogramação em células-tronco pluripotentes induzidas com maior eficiência do que as CTM adultas (MOSCHIDOU *et al.*, 2013). Quando utilizadas em terapias celulares, as células-tronco do fluido amniótico mantem sua capacidade de auto renovação e diferenciação e não formam tumores *in vivo* (ANTONUCCI *et al.*, 2014). Mais importante ainda, é a ausência de imunorreatividade do hospedeiro após a aplicação local ou sistêmica de CTM derivadas dos anexos fetais, representando uma vantagem inestimável para o seu uso em xenotransplantes que visam o reparo de estruturas e tecidos conjuntivos, incluindo osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo (ABDULRAZZAK *et al.*, 2010).

Outro fator relevante à ser considerado é a utilização das células-tronco em possíveis tratamentos para doenças debilitantes de várias etiologias, incluindo diabetes, Parkinson e doenças cardiovasculares (CHANG *et al.*, 2013), aumentando o interesse no seu uso na medicina veterinária devido ao alto potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico (VIOLINI *et al.*, 2009). Além disso, as pesquisas que utilizam as células-tronco em modelos experimentais com animais são de extrema importância para medicina humana, sendo descritas como pré-requisito no caminho da aprovação de sua utilização clínica (GANDOLFI *et al.*, 2011). Por esta razão, os modelos animais são utilizados para avaliar segurança, confiabilidade e eficácia de terapias baseadas em células para o tratamento de uma infinidade de alterações sistêmicas (COLOSIMO *et al.*, 2013), e as CTM derivadas do fluido amniótico constitui uma alternativa eficiente para tal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando o fácil acesso a esta nova fonte de células e seu rendimento quando expandidas, o fluido amniótico pode ser uma excelente fonte de CTM tanto para pesquisa básica quanto para possíveis aplicações terapêuticas. Assim, o uso das células-tronco do fluido amniótico é uma alternativa simples, rápida, eficiente e pouco invasiva para obtenção de células-tronco com alto grau de indiferenciação, elevada taxa de proliferação *in vitro* e grande capacidade de diferenciação celular. Todas estas vantagens transformam o líquido amniótico em uma fonte de escolha atrativa para obtenção de CTM, as quais podem ser utilizadas em estudos na medicina regenerativa para o estabelecimento de novas terapias celulares. A futura utilização dessas células em biotecnologias reprodutivas, como a clonagem e transgênese, e os ensaios clínicos em animais para posterior utilização em seres humanos, depende de maneiras eficientes de sua obtenção, cultivo *in vitro* e expansão. Assim, pesquisas utilizando animais como modelos experimentais são de extrema importância para medicina humana, constituindo um pré-requisito para a aprovação de sua utilização clínica.

REFERÊNCIAS

- ABDULRAZZAK, H.; MOSCHIDOU, D.; JONES, G.; GUILLOT, P.V. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of The Royal Society Interface*, v.7, n.6, p.689-706, 2010.
- AIRAS, L.; HELLMAN, J.; SALMI, M.; BONO, P.; PUURUNEN, T.; SMITH, D.J.; JALKANEN, S. CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *Journal of Experimental Medicine*, v.182, n.5, p.1603-1608, 1995.
- ALVES, A.; MUOTRI, A.R. *Simples assim: células-tronco*. 1ª ed., São Paulo-SP: Atheneu, p.224-234, 2014.

ANTONUCCI, I.R.; DI PIETRO, R.; ALFONSI, M.; CENTURIONE, M.A.; CENTURIONE, L.; SANCILIO, S.; PELAGATTI, F.; D'AMICO, M.A.; BALDASSARRE, A.; PIATTELLI, A.; TETÈ, S.; PALKA, G.; BORLONGAN, C.V. AND STUPPIA, L. Human second trimester amniotic fluid cells are able to create embryoid body-like structures *in vitro* and to show typical expression. profiles of embryonic and primordial germ cell. Cell Transplantation, v.23, n.12, p.1501-1515, 2014.

BAETZ, A.L.; HUBBERT W.T.; GRAHAM, C.K. Changes of biochemical constituents in bovine fetal fluids with gestational age. American Journal of Veterinary, v.37, n.9, p.1047-1052, 1976.

BYDŁOWSKI, S.P.; JANZ, F. L.; DUARTE, S. A.; CAVAGLIERI, R. DE C.; DEBES, A. A. AND MASELLI, L. M. F. Células-tronco do líquido amniótico. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v.31, n.1, p.45-52, 2009.

CANANZI, M.; ATALA, A.; DE COPPI, P. Stem Cells from Amniotic Fluid. In: ATALA, A.; LANZA, R.; THOMSON, J.; NEREM, R. Principles of Regenerative Medicine. 9^a ed., Elsevier Inc. All, cap.12, p.223-239, 2011.

CHANG, Y.J.; HO T.Y.; WU, M.L.; HWANG, S.M.; CHIOU T.W.; TSAI, M.S. Amniotic fluid stem cells with low gamma-interferon response showed behavioral improvement in Parkinsonism rat model. PLoS One, v.8, n.9, p.76118-76128, 2013.

CHEN, Z.; LU, X.C.; SHEAR, D.A.; DAVE, J.; DAVIS, A.R.; EVANGELISTA, C.A.; DUFFY, D.; TORTELLA, F.C. Synergism of human amnion-derived multipotent progenitor (AMP) cells and a collagen scaffold in promoting brain wound recovery: pre-clinical studies in an experimental model of penetrating ballistic-like brain injury. Brain Research, v.1368, p.71-81, 2011.

COLOSIMO, A.V.R.; RUSSO, V.; MAURO, A.; CURINI, V.; MARCHISIO, M.; BERNABO, N.; ALFONSI, M.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. Prolonged *in vitro* expansion partially affects phenotypic features and osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, v.15, n.8, p.930-950, 2013.

COLTER, D.C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotent adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, v.98, n.14, p.7841-7845, 2001.

CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F.; AND LANGE A. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. Reproduction research, v.145, n.4, p.391-400, 2013.

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

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A.C.; SNYDER, E.Y.; YOO, J.J. Isolation of amniotic

stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, v.25, n.1, p.100-106, 2007.

DEV, K.; GIRI, S.; KUMAR, A.; YADAV, A.; SINGH, B.; GAUTAM, S. Isolation, culturing and characterization of feeder-independent amniotic fluid stem cells in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Research in Veterinary Science*, v.93, n.2, p.743-748, 2011.

DITADI, A.; DE COPPI, P.; PICONE, O. Human and murine amniotic fluid c-Kit⁺ Lin⁻ cells display hematopoietic activity. *Blood*, v.113, n.17, p.3953-3960, 2009.

DOMINGUES, M.M.; LIPTRAP, R.M.; BASRUR, P.K. Fetal fluids steroids and their relationship to gonadal steroid secretion in single and twin bovine fetuses. *Theriogenology*, v.34, n.1, p.57-73, 1990.

DOMINGUEZ, L.P.I. Líquido pulmonar fetal. *Revista médica del hospital general*, v.69, n.4, p.221-225, 2006.

DOMINICI, M.; LE BLANC K.; SLAPER-CORTENBACH, F.C.; KRAUSE M.; DEANS R.J.; KEATING A.; PROCKOP D.J. AND HORWITZ E.M. 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.

ECKFELDT, C.E.; MENDENHALL E.M.; VERFAILLIE, C.M. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.6, n.9, p.726-737, 2005.

ESLAMINEJAD, M.B.; JAHANGIR, S. Amniotic fluid stem cells and their application in cell-based tissue regeneration. *International Journal of Fertility and Sterility*, v.6, n.3, p.147-156, 2012.

FAVARON, P.O.; CARVALHO, R.C.; BORGHESI, J.; ANUNCIAÇÃO, A.R.; MIGLINO, M.A. The amniotic membrane: development and potential applications: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.6, p.881-892, 2015.

GANDOLFI, F.; VANELLI, A.; PENNAROSSA, G.; RAHAMAN, M.; ACOCELLA, F.; BREVINI, T.A. Large animal models for cardiac stem cell therapies. *Theriogenology*, v.75, n.2, p.1416-1425, 2011.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Bovine ultrasound-guided transvaginal amniocentesis. *Theriogenology*, v.47, n.5, p.1003-1008, 1997.

GHIONZOLI, M.; CANANZI, M.; ZANI, A. Amniotic fluid stem cell migration after intraperitoneal injection in pup rats: implication for therapy. *Pediatric Surgery International*, v.26, n.1, p.79-84, 2010.

GHOLIZADEH-GHALEHAZIZ, S.; FARAHZADI, R.; FATHI, E.; PASHAIAS, M. A Mini Overview of Isolation, Characterization and Application of Amniotic Fluid Stem Cells. *International Journal of Stem Cells*, v.8, n.2, p.115-120, 2015.

GOSDEN, C.M. Amniotic fluid cell types and culture. *British Medical Bulletin*, v.39, n.4, p.348-354, 1983.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H. *Obstetrícia veterinária*. 2ª ed., Porto Alegre, RS: Sulina, 1984. 323p.

HAWKINS, K.E.; CORCELLI, M.; DOWDING, K.; RANZONI, A.M.; VLAHOVA, F.; HAU, K.L. Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Have a Superior Neuroprotective Capacity Over Fetal MSCs in the Hypoxic-Ischemic Mouse Brain. *Stem Cells Translational Medicine*, v.7, n.5, p.439-449, 2018.

HENDERSON, J.K.; DRAPER, H.S.; FISHEL, J.A.; MOORE, P.W.; ANDREWS, P.D. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, v.20, n.4, p.329-337, 2002.

HERVEY, E.J.; SLATER, J.S. The sources of sheep foetal fluids in the later stages of gestation. *Journal of Physiology*, v.194, n.1, p.40-41, 1967.

HOEHN, H.; SALK, D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. In: LATT, S.A.; DARLINGTON, G.J. *Methods in Cell Biology: Prenatal diagnosis: Cell biological approaches*, 26ª ed., Academic Press, v.26, p.11-34, 1982.

IACONO, E.; BRUNORI, L.; PIRRONE, A.; PAGLIARO, P.P.; RICCI, F.; TAZZARI, P.L.; MERLO, B. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, v.143, n.4, p.455-468, 2012.

JEZIEWSKI, A.; RENNIE, K.; TREMBLAY, R.; ZURAKOWSKI, B.; GRUSLIN, A.; SIKORSKA, M.; BANI-YAGHOUB, M. Probing stemness and neural commitment in human amniotic fluid cells. *Stem Cell Reviews*, v.6, n.2, p.199-214, 2010.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v.418, n.6893, p.41-49, 2002.

JOO, S.; KO, I.K.; ATALA, A.; YOO, J.J.; LEE, S.J. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Archives of Pharmacal Research*, v.35, n.2, p.271-280, 2012.

KIM, W.S.; LEE, Y.; KIM, H.; HWANG, K.J.; KWON, H.C.; KIM, S.K.; CHO, D.J.; KANG, S.G.; YOU, J. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors. *Journal of Dermatological Science*, v.53, n.2, p.96-102, 2009.

KOLAPARTHY, L.K.; SANIVARAPU, S.; MOOGLA, S.; KUTCHAN, R.S. Adipose tissue - adequate, accessible regenerative material. *International Journal of Stem Cells*, v.8, n.2, p.121-127, 2015.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A.; RECORDATI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow-umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Veterinary Research Communications*, v.35, n.2, p.103-121, 2011.

LOVELL, K.L.; SPRECHER, D.J.; AMES, K.N. Development and efficacy of ultrasound-guided fetal fluid aspiration techniques for prenatal diagnosis of caprine beta-mannosidosis. *Theriogenology*, v.44, n.4, p.517-527, 1995.

MACEK, M.; HURYCH, J.; REZACOVA, D. Collagen synthesis in long-term cultures of amniotic fluid. *Ceskoslovenská Pediatrie*, v.28, n.9, p.478-480, 1973.

MAGATTI, M.; DE MUNARI, S.; VERTUA, E.; GIBELLI, L.; WENGLER, G.S.; PAROLINI, O. Human amnion mesenchyme harbors cells with allogeneic T-cell suppression and stimulation capabilities. *Stem Cells*, v.26, n.1, p.182-192, 2008.

MARTINELLI, D.; PEREIRA, R.C.; MASSIMO, M.; ROBERTO, B.; MASTROGIACOMO, M.; DOMENICO, C.; CANCEDDA, R.; GENTILI, C.A. humanized system to expand *in vitro* amniotic fluid-derived stem cells intended for clinical application. *Cytotherapy*, v.18, n.3, p.438-451, 2016.

MAURO, A.; TURRIANI, A.; IOANNONI, V.; RUSSO, A.; MARTELLI, O.; DI GIACINTO, D.; BERARDINELLI, P. Isolation, characterization, and *in vitro* differentiation of ovine amniotic stem cells. *Veterinary Research Communication*, v.34, n.1, p.25-28, 2010.

MELLOR, D.J.; SLATER, J.S. Daily changes in amniotic fluid during the last three months of pregnancy in conscious, unstressed ewes, with catheters in their foetal fluid sacs. *Journal of Physiology*, v.217, n.3, p.573-604, 1972.

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

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI H.; STOLZ, D.B.; STROM, S.C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, v.23, n.10, p.1549-1559, 2005.

MOSCHIDOU, D.; MUKHERJEE, S.; BLUNDELL, M.P. Human mid-trimester amniotic fluid stem cells cultured under embryonic stem cell conditions with valproic acid acquire pluripotent characteristics. *Stem Cells*, v.22, n.3, p.444-458, 2013.

NAITO, Y.; LOWENSTEIN, J.M. 5'- Nucleotidase from rat heart membranes. *Biochemistry*, v.20, n.18, p.5188-5194, 1981.

NAKAMURA, Y.; MUGURUMA, Y.; YAHATA, T. Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *British Journal of Dermatology*, v.154, n.6, p.1062-1070, 2006.

PARK, S.B.; SEO, M.S.; KANG, J.G.; CHAE, J.S.; KANG, K.S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *Cytotherapy*, v.13, n.3, p.341-349, 2011.

PAROLINI, O.; PONCINI, M.; EVANGELISTA, M.; SCHMIDT, D. Amniotic membrane and amniotic fluid-derived cells: potential tools for regenerative medicine? *Regenerative Medicine*, v.4, n.2, p.275-291, 2009.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG S.; MARSHAK, D.R.

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

PRATHEESH, M.D.; GAGE, N.E.; KATIYAR, A.N.; DUBEY, P.K.; SHARMA, B.; SAIKUMAR, G.; AMARPAL, S.G.T. Isolation, culture and characterization of caprine mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid. *Research in Veterinary Science*, v.94, n.2, p.313-319, 2013.

REHEN, S.; PAULSEN, B. Células-tronco: o que são? Para que servem? 1ª ed., Rio de Janeiro, RJ: Vieira e Lent, 2007. 96p.

ROUBELAKIS, M.G. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.16, n.6, p.931-952, 2007.

ROUBELAKIS, M.G.; BITSIKA, V.; ZAGOORA, D.; TROHATOU, O.; PAPPA, K.I.; MAKRIDAKIS, M.; ANTSAKLIS, A.; VLAHOU, A.; ANAGNOU, N.P. Sindle shaped human mesenchymal stem/stromal cells from amniotic fluid promote neovascularization. *PLoS One*, v.8, n.1, p.4747-4752, 2013.

SCHMIDT, D.; ACHERMANN, J.; ODERMATT, J.; ODERMATT, B.; BREYMAN, C.; MOL, A.; GENONI, M.; ZUND, G.; HOERSTRUP, S.P.P. Prenatally fabricated autologous human living heart valves based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. *Circulation*, v.116, n.11, p.64-70, 2007.

STEIGMAN, S.A.; AHMED, A.; SHANTI, R.M.; TUAN, R.S.; VALIM, C.; FAUZA, D.O. Sternal repair with bone grafts engineered from amniotic mesenchymal stem cells. *Journal of Pediatric Surgery*, v.44, n.6, p.1120-1126, 2009.

TONIOLLO, G.H.; VICENTE, W.R.R. Manual de Obstetrícia Veterinária, 1ª ed., São Paulo-SP: Livraria Varela, p.31-36, 1995.

TSAI, M.S.; LEE J.L.; CHANG, Y.J.; HWANG, S.M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, v.19, n.6, p.1450-1456, 2004.

TSAI, P.J.; WANG, H.S.; JAN, G.J. Undifferentiated Wharton's jelly mesenchymal stem cell transplantation induces insulin-producing cell differentiation and suppression of T-cell-mediated autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Cell Transplant*, v.24, n.8, p.1555-1570, 2014.

URANIO, F.M.; VALENTINI, L.; CONSIGLIO, A.L.; CAIRA, M.; GUARICCI, A.C.; VENTURA, M.; CATACCIO, C.R.; MARTINO, N.A.; VALENTI, L. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and *in vitro* differentiation potency of canine stem cells from adnexa: A comparative study of amniotic fluid, amnion and umbilical cord matrix. *Molecular Reproduction and Development*, v.78, n.5, p.361-373, 2011.

VIOLINI, S.; GORDI, C.; PISANI, L.; RAMELLI, P.; CANIATTI, M.; MARIANI, P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show

the ability for tenogenic differentiation by *in vitro* exposure to BMP-12. BMC Plant Biology, v.10, n.29, p.172-180, 2009.

WEISSMAN, I.L. Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell, v.100, n.1, p.157-168, 2000.

WINTOUR, E.M.; McFARLANE, C. Anatomy, physiology and pathology of the amniotic and allantoic compartments in sheep and cow. Australian Veterinary Journal, v.63, n.7, p.216-221, 1986.

YOUNG, H.Y.; FAIRBUM, H.R. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. The Anatomical Record, v.264, n.1, p.51-62, 2001.

ZORZANELLI, R.T.; SPERONI, A.V.; MENEZES, R.A. AND LEIBING, A. Pesquisa com células-tronco no Brasil: A produção de um novo campo científico. História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v.24, n.1, p.129-144, 2015.