

A MELHOR FONTE DE CÉLULAS-TRONCO: O ÂMNIO DO CÃO E DO GATO

[An useful source of stem cells: The cat and dog amnion]

Mariana Trés Cardoso¹, Atanásio Serafim Vidane², Daniele dos Santos Martins¹, Carlos Eduardo Ambrósio^{1*}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil. *Autor de correspondência: E-mail: ceambrosio@usp.br.

² Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO - Nos últimos anos tem se registrado um crescente aumento de doenças crônicas e degenerativas, sendo uma das alternativas para o seu tratamento o uso de células tronco capazes de se diferenciar em múltiplas linhagens e restituir as células defeituosas ou degeneradas. Neste contexto, a identificação de fontes viáveis de células-tronco tem sido o objeto de estudo nas pesquisas atuais. O âmnio surge como fonte bastante promissora das células-tronco mesenquimais (CTM's). Estas células podem ser propagadas em cultivo por varias passagens e criopreservadas sem registro de perda das suas características imunofenotípicas. Quando cultivadas em condições específicas demonstram uma alta plasticidade e se diferenciam em múltiplas linhagens celulares. Em análises imunofenotípicas reagem positivamente a marcadores típicos de células tronco mesenquimais e não expressam os marcadores de células hematopoiéticas. Outra atração por esta fonte de células-tronco reside no fato de que o âmnio é descartado logo após o nascimento, favorecendo o isolamento destas células sem recurso a procedimentos invasivos. Além disso, as células amnióticas derivam do tecido extraembrionário no período antes da gastrulação o que presume que estas retêm propriedades primitivas e altas propriedades imunomoduladoras que as restantes fontes comumente estudadas.

Palavras-Chaves: âmnio; cão; célula-tronco; gato; placenta; plasticidade.

ABSTRACT - In recent few years has been registered an increasing of chronic and degenerative diseases, being one of the alternatives for treatment the use of stem cells, capable to differentiate into multiple lineages and restore the defective or degenerated cells. In this context the identification of viable sources of stem cells has been the object of study in current studies. The amnion arises as a promising source of mesenchymal stem cells. These cells can be expanded in culture for several passages and cryopreserved without changes of their immunophenotypic characteristics. When cultured under specific conditions demonstrated a high plasticity and differentiated into multiple cell lineages. In immunophenotypic analysis they expressed the mesenchymal stem cells specific markers and do not express the hematopoietic cell markers. The amnion is discarded after birth therefore these cells can be isolated without using invasive procedures. Furthermore, the amniotic cells are derived from extraembryonic tissues, before the gastrulation, which suggests that these cells retain the primitive properties and high immunoregulatory properties than other sources commonly studied.

Keywords: amnion; dog; stem cells; cat; placenta; plasticity.

INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento das doenças crônicas e degenerativas, a terapia celular surge como melhor alternativa para o tratamento destas moléstias. Uma das grandes preocupações dos pesquisadores tem sido a identificação de fontes seguras que não constituem nenhum risco ao doador e que favoreçam o isolamento de células com alto potencial regenerativo. O outro desafio na temática da terapia celular tem sido a identificação dos

fatores que determinam a diferenciação de uma determinada célula tronco em linhagem específica após o transplante. Diversos estudos apontam uma ação sinérgica do microambiente onde a célula está inserida com os fatores solúveis de crescimento bem como sinalização parácrina e o contato célula-célula como os principais intervenientes na diferenciação celular (Vidane et al., 2013b).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidas por vários investigadores para tornar realidade o uso da

célula tronco na medicina regenerativa. Apesar da sua totipotencia, a destruição do blastocisto para o isolamento da célula tronco embrionária acarreta enormes implicações de ordem ética e religiosa. Neste contexto a identificação de novas fontes de células-tronco com alto potencial regenerativo tem sido o alvo dos estudos atuais. A medula óssea foi por muito tempo considerado a melhor fonte de células tronco mesenquimais. Contudo, os procedimentos invasivos majoritariamente necessários para o seu isolamento estão associados a altas taxas de morbidade, sendo que a quantidade e as características das células obtidas variam consideravelmente com a idade do doador (Sonciniet al., 2007; Colleoni et al., 2009). Em análise dos aspirados da medula óssea, foi registrado uma baixa frequência destas células em relação ao total das células que constituem o estroma da medula óssea. Devido a sua alta heterogeneidade, as suas propriedades imunogênicas podem ser altamente influenciadas por vários fatores como os métodos de isolamento, superfície e meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com produtos químicos, entre outros (Bydlowski et al., 2009).

Portanto, com a evidência da sua diversidade celular e de distintas características biológicas das células que apresenta, o âmnio é consagrado como uma importante fonte de células-tronco com maior atração para a terapia celular e engenharia de tecidos. A membrana amniótica é geralmente descartada após o parto (humanos e animais) podendo ser usadas em barreiras éticas de sua obtenção. Tem se mostrado uma fonte bastante promissora de CT's para a medicina regenerativa. Sua origem embrionária deriva do epiblasto, anterior a fase de gastrulação. Acredita-se que seu bom desempenho no que diz respeito á multipotencialidade e plasticidade (capacidade de diferenciação celular) são reflexos de uma possível memória celular da capacidade de diferenciação do epiblasto nos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) (Hodges et al., 2012).

A membrana amniótica já foi utilizada no auxílio de diversas terapias em animais e humanos, como por exemplo: lesões de pele secundárias a queimaduras químicas, lesões penfigóides cicatriciais, síndrome de Stevens Johnson, úlceras corneanas persistentes, dentre outras. Ela demonstra características antiadesivas, antibacterianas, imunomoduladoras, proteção da ferida, além de facilitar a adesão e migração de células epiteliais basais melhorando a restauração do fenótipo epitelial (Moreira et al., 2000). Devido às características supracitadas, juntamente com sua alta capacidade regenerativa e proliferativa, a membrana amniótica é, sem

dúvidas, uma fonte de MSC's extremamente importante a ser explorada.

CÉLULAS-TRONCO: CONCEITO E CLASSIFICAÇÃO

As células-tronco são células com características neutras e capacidade de diferenciação em outros tipos celulares quando especificamente estimuladas *in vitro* e *in vivo* (Park et al., 2012). Elas podem ser de origem embrionária e adulta. A célula tronco embrionária é obtida da massa celular interna do blastocisto embrionário. Apresenta um incrível potencial de diferenciação sendo classificada como pluripotente, porém sua obtenção acarreta a destruição do embrião doador representando uma barreira ética tanto para humanos quanto para animais (Mancuso, 2003). A célula tronco embrionária descrita como totipotente origina-se da primeira divisão do zigoto quando o blastômeto possui apenas 8 células sendo capaz de formar um indivíduo completo (Kmiecik et al., 2013). A célula-tronco adulta é originada de tecidos que tiveram sua formação após o surgimento do blastocisto. São encontradas nos tecidos adultos como repositoras fisiológicas do organismo (Jurgaet al., 2006; Caplan, 2009). Apresentam capacidade de renovação, são “pré-diferenciadas” a partir do folheto embrionário de que foram originadas sendo capazes de se diferenciar em outras linhagens quando estimuladas para tal. Devido a estas características citadas acima são conhecidas como células mesenquimais multipotentes (Urânioet al., 2011; Kmiecik et al., 2013). As células tronco mesenquimais (CTM's) são as mais exploradas devido a facilidade de obtenção e cultivo, boa plasticidade (potencial elevado de diferenciação), características imunomoduladoras e imunossupressoras. Apresentam uma característica particular de aderência ao plástico quando cultivadas *in vitro* e morfologia fibroblastóide (Bydlowskiet al., 2009; Monteiro et al., 2010). Diversos estudos na área da medicina regenerativa utilizando CTM's estão em andamento como por exemplo, na área de injúrias neurológicas agudas, subagudas e crônicas, traumáticas ou degenerativas e ortopedia (Bruder et al., 1998; Arinzeh et al., 2003; Feitosa, 2011; Forostyak et al., 2013). Diversas fontes já foram estudadas, dentre elas a medula óssea, polpa dentária, tecido adiposo, epitélio olfatório, membrana amniótica, líquido amniótico, dentre outras (Arinzeh et al., 2003; Feitosa, 2011; Vidane et al., 2013a). Estas e outras fontes estão sendo pesquisadas a fundo a fim de se chegar a uma conclusão da fonte ideal de células tronco principalmente no que diz respeito a viabilidade e facilidade de obtenção, cultivo, qualidade celular e eficácia nos tratamentos propostos.

CÉLULA-TRONCO AMNIÓTICA

Para o desenvolvimento e a sobrevivência, o conceito desenvolve uma série de tecidos extraembrionários que providenciam o suporte nutricional e proteção do próprio embrião. Os amniontas (mamíferos, aves e reptéis) consistem de quatro membranas extraembrionárias, nomeadamente o âmnio, córion, saco vitelino e o alantoide. O âmnio é a membrana extraembrionária mais interna que envolve o feto e delimita a cavidade amniótica repleta do fluido amniótico, proporcionando um nicho para o desenvolvimento do concepto e conferindo proteção e resistência ao impacto. É completamente composto pelo tecido fetal, fato bastante importante que caracteriza a natureza primitiva das suas células (Bourne, 1962; Tiedemann, 1979; Pereira et al., 2011).

O âmnio consiste de uma camada epitelial de células cuboides (AECs) que delineiam a camada interna da cavidade amniótica denominado ectoderma amniótico. Estas células derivam do epiblasto (também denominadas amnioblastos) antes da gastrulação e se diferenciam em AECs. Logo a seguir a ectoderma amniótico encontra-se uma fina camada da mesoderme adjacente ao forro mesodérmico do corion. As células amnióticas mesenquimais (AMCs), encontram-se aleatoriamente distribuídos na matriz extracelular, tendo uma origem mesodérmica extraembrionária. São ricas em colágeno e laminina e com um aspecto fibroblastóide (Chang et al., 2010; Pereira et al., 2011).

Estudos apontam que ambos os tipos celulares do âmnio, se originam durante o estágio de pré-gastrulação da embriogênese prior ao delineamento dos três folhetos embrionários o que sugere que retém propriedades primitivas e características de células tronco pluripotentes (Ilancheran et al., 2007; Manuelpillai et al., 2011). Estas propriedades justificam a maior atração por estas células, sendo alvo de maior investigação nos últimos dias. Para além disso, o âmnio é o biomaterial de eleição para engenharia tecidual devido a sua habilidade de reduzir a inflamação e a formação da cicatriz para além de possuir propriedades antimicrobianas o que a torna molde ideal para proliferação e diferenciação celular (Niknejad et al., 2008). Tem sido amplamente usada em transplantes biológicos para o curativo de diversas patologias como feridas graves e úlceras não cicatrizantes, cirurgia de reconstituição vaginal, reparação da hérnia abdominal, prevenção da adesão cirúrgica, fechamento do pericárdio e cirurgias oftálmicas. Neste contexto, com a evidência da sua diversidade celular e de distintas características biológicas das células que apresenta, o âmnio é consagrado como uma importante fonte de células-tronco com maior

atração para a terapia celular e engenharia de tecidos. As células mesenquimais da membrana amniótica são conhecidas por possuir propriedades imunomoduladoras o que as torna mais acessíveis para transplantes alogênicos (Mihu et al., 2009; Huo et al., 2010). Entretanto, o âmnio é comumente descartado após o nascimento, podendo ser usado sem levantar quaisquer conflitos éticos ou morais, além de que permite o isolamento das MSCs com alta eficiência sem recurso a procedimentos invasivos (Huo et al., 2010; Consiglio et al., 2011; Diaz-Prado et al., 2011, Fernandes et al., 2012). Além dessas diferenças, estas células possuem propriedades primitivas, baixa tumorigenicidade e maior plasticidade que as restantes células homólogas (Abdulrazzak et al., 2010).

As células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica (AMSC's) do gato e do cão são alvo de estudo do Grupo de desenvolvimento de terapias inovadoras (GDTI – FZEA/USP). Recentemente o grupo comprovou a existência desta linhagem celular no âmnio de gato, tendo apresentado características morfológicas e imunofenotípicas similares a das restantes fontes de CTM's previamente descritas. Em cultivo, demonstraram uma boa taxa de proliferação sem alterações fenotípicas, alta plasticidade tendo-se diferenciado em linhagem condrogênica, osteogênica e adipogênica. Quando inoculadas em camundongos imunossuprimidos não foram observados formação de teratomas o que leva a concluir que a membrana amniótica felina representa uma fonte viável de CTM's para a medicina regenerativa. Estes resultados motivaram o grupo a propor um projeto piloto da aplicação destas células em pacientes com insuficiência renal crônica.

Na descrição das células-tronco da membrana amniótica canina realizada por Lima (2012), foi constatada a formação de teratomas do tipo carcinoma embrionário após a aplicação das mesmas em camundongos imunossuprimidos inviabilizando, a princípio, a utilização desta fonte para terapias celular. Porém, a fonte em questão demonstrou diversas características positivas como boa plasticidade (diferenciação osteogênica e adipogênica), boa proliferação e facilidade de cultivo, fácil obtenção motivando assim novos estudos em cima da membrana amniótica canina com o intuito de desvendar o exato ponto em que ela se diferencia da membrana amniótica felina que possa justificar esta diferença de resultados no teste carcinogênico.

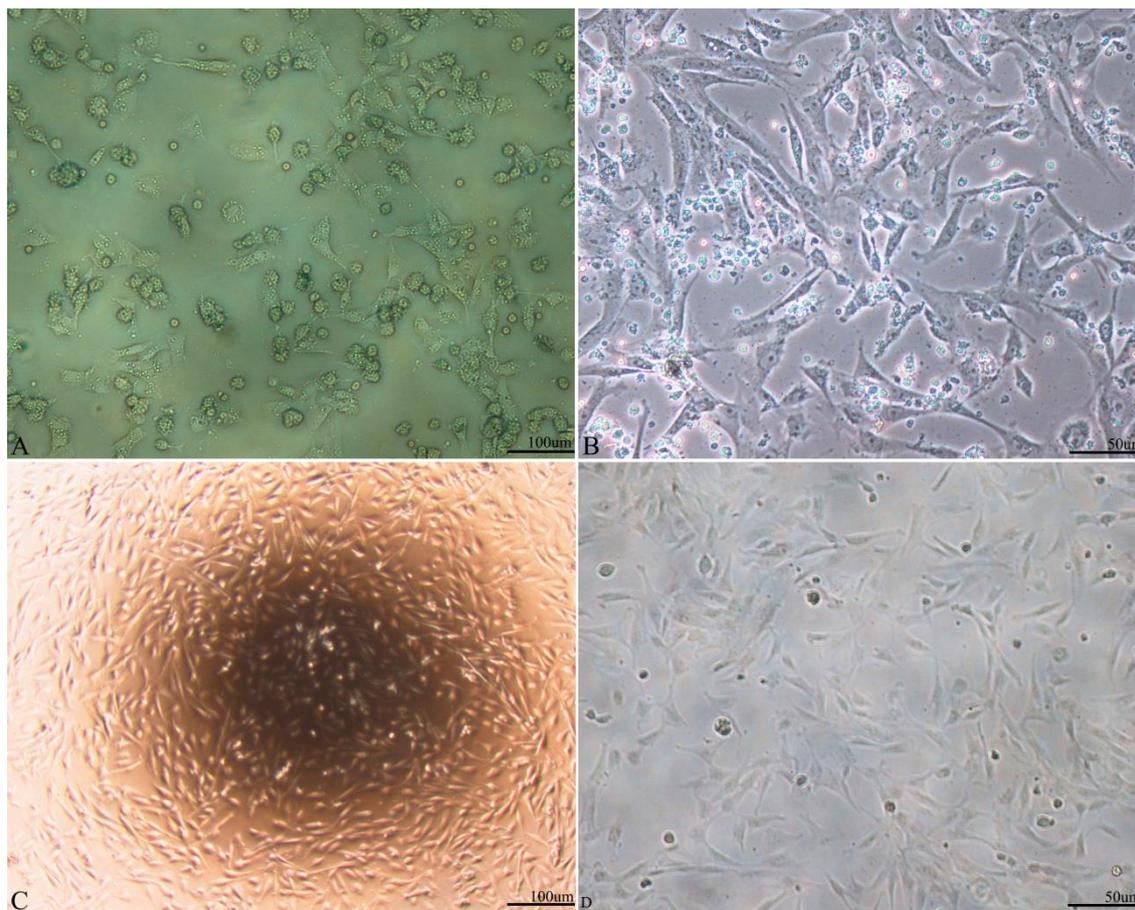


Figura - Fotomicrografia da morfologia das células mesenquimais indiferenciadas derivadas do âmnio de gato (A e B) e cão (C e D). Após 24 horas de cultivo inicial (A e C), as células apresentavam-se aderentes a placa de cultivo com uma morfologia fibroblastóide. Esse fenótipo foi mantido nas passagens subsequentes (B e D) e sem alterações na taxa de proliferação. Na sua maioria as células apresentam-se pareadas como indicativo de intensa proliferação.

ESTABELECIAMENTO DA LINHAGEM CELULAR DO ÂMNIO FELINO E CANINO

As membranas amnióticas são obtidas de campanhas de castração eletiva na cidade de Pirassununga – SP. Esporadicamente são encontrados úteros gravídicos no ato cirúrgico. Estes úteros são transportados em condições de refrigeração até ao laboratório GDTI onde são lavados e dissecados de forma estéril para exteriorização das placentas.

A membrana amniótica é separada manualmente, lavada em PBS+antibiótico, macerada mecanicamente com auxílio de lâminas de bisturi e submetida à digestão enzimática com colagenase 0,1% durante 3 horas a 38,5°C. Em seguida, é cultivada em meio Alpha-MEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Penicilina +Streptomicina). Após atingirem a confluência de 80-90%, as células são tripsinizadas, centrifugadas e replaqueadas em uma placa com maior capacidade de volume visando a expansão da cultura. Estas células também podem ser

criopreservadas em meio de congelamento composto por 45% Alpha MEM, 45 % SFB e 10% de DMSO para utilização posterior. Na figura que se segue estão ilustradas as imagens de cultivo primário e secundário da linhagem de células-tronco derivadas do âmnio de cão e gato.

CONCLUSÃO

A membrana amniótica dos gatos e cães domésticos apresenta células mesenquimais com características morfológicas e fenotípicas típicas de células progenitoras, capazes de se propagar indefinidamente em cultivo sem alterar as suas qualidades funcionais e de se diferenciar em múltiplas linhagens específicas. Esta linhagem celular reage a marcadores específicos das MSCs e apresentam alta plasticidade podendo se diferenciar em múltiplas linhagens em condições específicas. Estas constatações sugerem o âmnio de gato e do cão como fonte promissora de células-tronco mesenquimais com alto potencial para a terapia celular.

REFERÊNCIAS

- Abdulrazzak, H., Moschidou, D., Jones, G., Guillot, P.V. 2010. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of the Royal Society Interface*, 7:S689-S706.
- Arinzech, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., Bos, C.D., Gordon, S., Kraus, K., et al. 2003. Allogeneic mesenchymal stem cell regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 85:A(10).
- Bourne, G. 1962. The foetal membranes. a review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgraduate Medical Journal*, 38:193-201.
- Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S. 1998. Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 80-A(7).
- Bydlowski, S.P., Debes, A.A., Maselli, L.M., Janz, F. 2009. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31:25-35.
- Caplan, A.I. Mesenchymal stem cells. In: Lanza, R. *Essentials of Stem cell biology*. ed.2, cap 29, Editora Academic Press, 2009, p.243-248.
- Chang, Y.J., Hwang, S.M., Tseng, C.P., Cheng, F.C., Huang, S.H., Hsu, L.F., Hsu, L.W., Tsai, M.S. 2010. Isolation of mesenchymal stem cells with neurogenic potential from the mesoderm of the amniotic membrane. *Cells Tissues Organs*, 192(2):93-105.
- Colleoni, S., Bottani, E., Tessaro, I., Mari, G., Merlo, B., Romagnoli, N., Spadari, A., Galli, C., Lazzari, G. 2009. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Veterinary Research Communications*, 33(8):811-821.
- Consiglio, A.L., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S., Parolini, O., Cremonesi, F. 2011. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Pré-print
- Diaz-Prado, S., Muinos-Lopez, E., Hermida-Gomez, T., Esther Rendal-Vazquez, M., Fuentes-Boquete, I., De Toro, F. J., Blanco, F.J. 2011. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 17(1):49-59.
- Feitosa, M.L.T. *Terapia celular com células-tronco em coelhos com lesão medular induzida e em cães com lesão medular crônica espontânea*. [Stem cell therapy in rabbits with induced spinal cord injury and in dogs with spontaneous chronic spinal cord injury]. 2011. 118f (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- Fernandes, R.A., Wenceslau, C.V., Reginato, A.L., Kerkis, I., Miglino, M.A. Derivation and characterization of progenitor stem cells from canine allantois and amniotic fluids at the third trimester of gestation. *Placenta*, Pré-print.
- Forostyak, S., Jendelova, P., Sykova, E. 2013. The role of mesenchymalstromal cells in spinal cords injury, regenerative medicine and possible clinical applications. *Biochimie*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.004>
- Hodges, R., J., Lim, R., Jenkin, G., Wallace, E., M. 2012. Amnio epithelial cells as a candidate therapy for acute and chronic lung injury. *Stem Cells International*. 1-7.
- Huo, S., Shi, P., Pang, X. 2010. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. *Chinese Medical Sciences Journal*, 25(4):211-214.
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E.M., Pera, M., Manuelpillai, U. 2007. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biology of Reproduction*, 77(3):577-588.
- Jurga, M., Markiewicz, I., Sarnowska, A., Habich, A., Kozłowska, H., Lukomska, B., Buzanska, L., Janik, K.D. 2006. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *Journal of Neuroscience Research*, 83:627- 637.
- Kmieciak, G., Niklinska, W., Pancewicz, W.J., Fil, D., Karwowska, A., Karczewski, J., Mackiewicz, Z. 2013. Fetal membranes as a source of stem cells. *Advances in medical sciences*, 58(2).
- LIMA, E. B. Estabelecimento e caracterização de células-tronco fetais de membrana amniótica de cão. 2012. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- Mancuso, S. 2003. Stem cell research need not be carried out utilizing human embryos. *Reprod. Biomed Online*. v.6, n.2, p.169-169, 2003. (MANCUSO, 2003)
- Manuelpillai, U., Moodley, Y., Borlongan, C. V., Parolini, O. 2011. Amniotic membrane and amniotic cells: Potential therapeutic tools to combat tissue inflammation and fibrosis?. *Placenta*, 32(4):S320-S325.
- Mihu, C.M., Ciuca, D.R., Soritau, O., Susman, S., Mihu, D. 2009. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 50(1):73-77.
- Moreira, H., Oliveira, C.S. O. 2000. Transplante de membrana amniótica. *Arquivo brasileiro de oftalmologia*. 63(4):303-305.
- Monteiro, B.S., Neto, N.M.A., Carlo, R.J.D. 2010. Células tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, 40(1):238-245.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, A.M. 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *European Cells & Materials*, 15:88-99.
- Park, S.B., Seo, M.S., Kim, H.S., Kang, K.S. 2012. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. *Plos-one*, 7.
- Pereira, P.N.G., Dobrev, M.P., Graham, L., Huylebroeck, D., Lawson, K.A., Zwijsen, A.N. 2011. Amnion formation in the mouse embryo: the single amniochorionic fold model. *BMC Developmental Biology*, 11(48):1-13.
- Soncini, M., Vertua, E., Gibelli, L., Zorzi, F., Denegri, M., Albertini, A., Wengler, G. S., Parolini, O. 2007. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1(4):296-305.
- Tiedemann, K. 1979. The amniotic, allantoic and yolk sac epithelia of the cat: SEM and TEM studies. *Anatomy and Embryology*, 158:75-94.

Urânio, M. F., Valentini, L., Consiglio, A. L., Caira, M., Guaricci, A.C., L'abbate, A., Catacchio, C. R., Ventura, M., Cremonesi, F., Dell'aquila. 2011. Isolation, Proliferation, Cytogenetic, and Molecular Characterization and In Vitro Differentiation Potency of Canine Stem Cells From Foetal Adnexa: A Comparative Study of Amniotic Fluid, Amnion, and Umbilical Cord Matrix. *Molecular Reproduction & Development*, 78:361-373.

a Vidade, A.S., Souza, A.F., Sangali, J.R., Sampaio, R., Bressan, F.F., Casals, J.B., Pierre, N.C., Mançaneres C.A., Meirelles, F., Miglino, M.A., Martins, D.S. & Ambrósio, C.E. 2013 The feline amniotic membrane: a valuable alternative source of mesenchymal stem cells. *Placenta*, 34(9):A60.

bVidane, A.S., Zomer, H.D., Oliveira, B.M.M., Guimarães, C.F., Fernandes, C.B., Perecin, F., Silva, L.A., Miglino, M.A., Meirelles, F.A., Ambrósio, C.E. 2013. Reproductive Stem Cell Differentiation: Extracellular Matrix, Tissue Microenvironment, and Growth Factors Direct the Mesenchymal Stem Cell Lineage Commitment. *Reproductive Sciences*, 20(10):1137-1143.