

ANEXOS FETAIS: UMA FONTE ALTERNATIVA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA A MEDICINA VETERINÁRIA EQUINA

Bruna De Vita^{1*}
Loreta Lemes Campos²
Amanda Jerônimo Listoni³
Leandro Maia⁴
Natália Pereira Paiva Freitas⁵
Fernanda Landim e Alvarenga⁶
Nereu Carlos Prestes⁷

RESUMO

A equideocultura tem um papel importante no agronegócio brasileiro gerando divisas e diversos empregos diretos e indiretos. Por este motivo, a pesquisa científica em prol do desenvolvimento da produção equina brasileira tem refletido a tendência atual induzindo estudos principalmente nas áreas de medicina esportiva, neonatologia e biotecnologias da reprodução. Assim, na última década surgiu um grande interesse no estudo das células-tronco para a medicina equina principalmente para o tratamento das lesões musculoesqueléticas e osteoarticulares dos cavalos atletas, pelo seu alto potencial de aplicação na medicina veterinária regenerativa. As células-tronco (CT) podem ser classificadas quanto seu grau de potencialidade como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, e quanto a sua origem como embrionárias ou somáticas. As complicações do uso terapêutico das CTs embrionárias levaram à identificação de diversas fontes de células-tronco adultas, entre estas as CT hematopoiéticas e CTs mesenquimais. A fonte mais utilizada de células-tronco mesenquimais (CTM) é a medula óssea, no entanto, como o seu número e a capacidade de diferenciação destas células diminuem com a idade, seu potencial terapêutico também declina com o tempo. Devido a estas limitações outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas, sendo que as células derivadas dos anexos fetais têm recebido bastante destaque. CTMs derivadas do líquido amniótico, membrana amniótica, sangue do cordão umbilical e tecido de cordão umbilical humanos já foram isoladas e caracterizadas demonstrando muitas vantagens em sua utilização, como a coleta não invasiva e indolor, e a possibilidade de formação de bancos de armazenamento. Além disso, existem muitos relatos de que as CTMs derivadas de anexos fetais expressam marcadores embrionários como o Oct-4 e o Nanog, o que demonstra que estas células podem manter características de pluripotência dos tecidos de onde se originam. Recentemente, pesquisas com CTMs derivadas dos anexos fetais de eqüinos têm sido realizadas e vêm obtendo excelentes resultados. Esta revisão de

¹ Doutoranda do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

² Aluna especial de Mestrado do Depto Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

³ Aluna de Mestrado do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

⁴ Aluno de Doutorado do Depto de Clínica de Grandes Animais. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

⁵ Aluna de Mestrado do Depto de Clínica de Grandes Animais. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

⁶ Professora Titular do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

⁷ Professor Adjunto do Depto de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Júnior S/N, CEP 18618970. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista – Botucatu /SP.

*Bruna De Vita – Rodovia Antonio Butignolli, KM 10 – Cidade Universitária – BL B1, Apto 42. Rubião Júnior, Botucatu/SP. CEP 18618970. Tel: 14 8111 7530. E-mail: bruddev@gmail.com

literatura tem como objetivo reunir os estudos sobre as células-tronco mesenquimais com origem nos anexos fetais demonstrando-as como uma fonte alternativa, ética, de fácil obtenção e com grandes vantagens em sua utilização na medicina veterinária equina.

Palavras-chave: Células-tronco, anexos fetais, eqüinos

ANEXOS FETALES: UNA FUENTE ALTERNATIVA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES PARA LA MEDICINA VETERINÁRIA EQUINA

RESÚMEN

La cría de caballos tiene un papel importante en la agroindustria brasilera en la generación de divisas y varios puestos de trabajo directos e indirectos. Por esta razón, hoy en día la investigación científica para el desarrollo de la producción brasilera equina refleja la tendencia actual elaborando estudios con énfasis en medicina deportiva, neonatología y biotecnología de la reproducción. Por lo tanto, en la última década ha surgido un grande interés en el estudio de células madre para la medicina equina principalmente para el tratamiento de lesiones osteoarticulares y músculo esquelético de los caballos deportivos, debido a su alto potencial para aplicación en medicina regenerativa veterinaria. Las células madre (CM) se pueden clasificar por su grado de potencialidad como unipotentes, totipotentes, pluripotentes y multipotentes, y cuanto a su origen como embrionarias o somáticas. Las complicaciones del uso terapéutico de CM embrionarias llevaron a la identificación de varias fuentes de células madre adultas, entre estas las CMs hematopoyéticas y mesenquimales. La fuente más común de células madre mesenquimales (MSC) es la médula ósea, sin embargo, como el número y capacidad de diferenciación de estas células disminuye con la edad, su potencial terapéutico también se reduce con el tiempo. Debido a estas limitaciones otras fuentes de células madre mesenquimales fueron identificados, y las células derivadas de los anexos fetales han recibido mucha atención. CMMs derivados de líquido amniótico, membrana amniótica, sangre del cordón umbilical y tejido de cordón umbilical humano fueron aisladas y caracterizadas mostrando muchas ventajas en su uso, tales como la recogida no invasiva y sin dolor, y la posibilidad de formación de bancos de almacenamiento. Además, hay muchos informes de que las CMMs derivadas de los anexos fetales expresan marcadores embrionarios, como Oct-4 y Nanog, lo que demuestra que estas células pueden mantener las características de pluripotencialidad de los tejidos de donde provienen. Recientemente, la investigación con CMMs derivadas de anexos fetales de equinos están siendo hechas y están obteniendo excelentes resultados. Esta revisión pretende reunir a los estudios sobre células madre mesenquimales procedentes de los anexos fetales mostrando como una fuente alternativa, ética, de fácil obtención y con grandes ventajas en su uso en medicina veterinaria equina.

Palabras-clave: Células madre, anexos fetales, equino

FETAL ANNEXES: AN ALTERNATIVE SOURCE OF MESENCHYMAL STEM CELLS FOR EQUINE VETERINARY MEDICINE

ABSTRACT

The horse breeding industry has an important role in the Brazilian agribusiness generating wealth and many direct and indirect jobs. For this reason, the scientific research for the development of Brazilian horse production has reflected the current trend leading to studies

focusing on sports medicine, neonatology and biotechnology of reproduction. Thus, in the last decade, the study of stem cells has come in scope to equine medicine primarily for the treatment of osteoarticular and musculoskeletal injuries of athletic horses, because it's high potential for application in veterinary regenerative medicine. Stem cells (SC) can be classified by degree of potential as totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent, and by its origin as embryonic or somatic. Complications of the therapeutic use of embryonic SCs led to the identification of several sources of adult stem cells, as the hematopoietic SC and mesenchymal SC. The most common source of mesenchymal stem cells (MSCs) is bone marrow, however, as their number and differentiation capacity decrease with age, their therapeutic potential also declines with time. Because of these limitations other sources of mesenchymal stem cells were identified, and the cells derived from fetal annexes have received much attention. MSCs derived from amniotic fluid, amniotic membrane and umbilical cord blood and tissue have been isolated and characterized showing many advantages in its use, such as non-invasive, painless collection and the possibility of formation of storage banks. In addition, there are many reports that MSCs derived from fetal annexes express embryonic markers such as Oct-4 and Nanog, which demonstrates that these cells can maintain pluripotency characteristics of the tissue from which they arise. Recently, several studies using MSCs derived from fetal annexes of horses have been carried out with excellent results. This review aims to gather studies on mesenchymal stem cells derived from horse fetal annexes showing them as an alternative, ethical source, easy to obtain and with great advantages to be used in equine veterinary medicine.

Key words: Stem cells, fetal annexes, equine

INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque na equideocultura mundial sendo que o agronegócio do equino movimentava cerca de R\$7,5 bilhões e gera cerca de 3,2 milhões de empregos em nosso país. O segmento do esporte equestre movimentava cerca de R\$705 milhões e emprega cerca de 20500 pessoas (1). Neste contexto, muitas pesquisas científicas estão sendo realizadas para o incremento da produção equina nacional. Estas pesquisas refletem a tendência atual da indústria equina, com enfoque na medicina esportiva, neonatologia, diagnóstico clínico, novas tecnologias da reprodução e sanidade dos equinos (2).

Sendo assim, o interesse na pesquisa com células-tronco na medicina veterinária cresceu muito nos últimos anos devido ao seu alto potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico (3). Pesquisas que utilizam animais como modelos experimentais são de extrema importância para medicina humana, sendo descritas como pré-requisito no caminho da aprovação de sua utilização clínica (4-6). Na medicina equina, os estudos com células-tronco tem se dedicado principalmente ao tratamento de lesões músculoesqueléticas e osteoarticulares, particularmente em cavalos atletas, a fim de melhorar a arquitetura e constituição do tecido cicatricial, visando a produção de uma qualidade tecidual o mais próxima do normal possível. Porém, alguns poucos estudos em desenvolvimento também visam utilizar esta tecnologia para diminuir perdas econômicas relacionadas ao potencial reprodutivo de alguns animais.

As células-tronco diferem de outras células do organismo por serem indiferenciadas sendo capazes de se multiplicar por longos períodos ou ainda sendo capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular. Estas células podem ser classificadas quanto seu grau de potencialidade como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, e quanto a sua origem como embrionárias ou somáticas (7,8).

Como as células-tronco embrionárias são capazes de diferenciação em todos os tipos celulares encontrados no indivíduo adulto, a utilização destas células em sua forma indiferenciada pode seguir um programa desorganizado de diferenciação dando origem a tumores (teratomas). Este fato, e as implicações éticas na utilização de células embrionárias limitam a utilização das mesmas como instrumento de pesquisa (7,9).

Pesquisas nas últimas décadas resultaram na descoberta de uma grande variedade de células-tronco adultas, sendo as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea as conhecidas há mais tempo. Entre as células-tronco adultas, destacam-se as células-tronco mesenquimais com capacidade de diferenciação em muitas linhagens de células maduras (10).

A fonte mais utilizada de células-tronco mesenquimais é a medula óssea, no entanto, como o seu número e a capacidade de diferenciação destas células diminuem com a idade, seu potencial terapêutico também declina com o tempo (11). Devido a estas limitações outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas (12), sendo que as células derivadas dos anexos fetais tem recebido bastante destaque por se apresentarem como uma fonte de obtenção não invasiva, de tecidos normalmente descartados, com grande possibilidade de coleta ao nascimento para formação de bancos de armazenamento para uso posterior (13-18).

Além disto, as células-tronco mesenquimais derivadas dos anexos fetais como o líquido amniótico, a membrana amniótica e o cordão umbilical, preservam características dos tecidos embrionários de que se originam e muitos estudos estão indicando que estas células exibem características de células embrionárias como a expressão do marcador Oct-4, grande capacidade proliferativa sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade e ainda capacidade de diferenciação em diversos tecidos, inclusive extra mesenquimais (14,19,18).

Células-Tronco Mesenquimais Derivadas dos Anexos Fetais

Na última década houve um crescente interesse na investigação quanto à presença de células-tronco mesenquimais em tecidos fetais como na placenta, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, matriz extravascular de cordão umbilical e membrana amniótica (20,14,21,18). Este fato se deve a busca de novas fontes ricas de células-tronco em alternativa a utilização da medula óssea e à possibilidade da formação de bancos de armazenamento de células coletadas ao nascimento e congeladas para uso posterior (20,14,15,22,18).

Os anexos fetais são fontes de células-tronco extra-embrionárias, com grande potencial de aplicação na medicina regenerativa e perinatal. Células tronco derivadas das membranas placentárias, líquido amniótico, cordão umbilical ou tecidos fetais aparecem em maior quantidade e possuem maior potencial de expansão e de diferenciação do que as derivadas de adultos (15). Fauza (23) descreveu as membranas placentárias e o líquido amniótico como únicas fontes que contém diferentes populações de células-tronco, apresentando subpopulações mesenquimais, hematopoiéticas, trofoblásticas e possivelmente células-tronco embrionárias ainda mais primitivas e indiferenciadas.

O uso dos anexos fetais como fonte de células-tronco tem inúmeras vantagens em potencial. Além da grande quantidade de células, grande potencial de expansão e diferenciação, permite uma forma de coleta não invasiva de tecidos que, normalmente, seriam descartados após o parto. Este fato permite que o uso dessas células na medicina humana seja mais eticamente aceitável, fazendo dessas fontes um grande atrativo para medicina regenerativa (18).

As células-tronco derivadas dos anexos fetais preservam características dos tecidos embrionários de onde se originaram e muitos estudos estão indicando que as mesmas exibem algumas características de células-tronco embrionárias como a expressão de alguns marcadores de superfície como o Oct-4 e grande capacidade proliferativa, sem demonstrar

imunogenicidade e tumorigenicidade (não foi demonstrada a formação de teratomas após sua aplicação). Entretanto, o potencial de diferenciação destas células seria intermediário, ou seja, entre a pluripotencialidade das células embrionárias e as multipotencialidade das células adultas. Estas características abriram uma nova perspectiva no estudo da biologia do desenvolvimento e na medicina regenerativa, não só para humanos, mas também para animais (18).

Células-Tronco Derivadas do Líquido Amniótico

O líquido amniótico é formado por uma grande quantidade de células em suspensão, derivadas do embrião ou de origem extra-embriônica. Esta população celular varia com a fase gestacional e traduz as mudanças ocorridas no feto e seus anexos, estando bastante vinculada com a maturidade fetal (24). As células presentes no líquido amniótico apresentam tamanho variável de 6 a 50 μm , e morfologia variando de escamosas a arredondadas (25).

A detecção de células progenitoras no líquido amniótico humano foi inicialmente relatada em 1993, quando células arredondadas, pequenas e nucleadas, foram encontradas antes da 12ª semana de gestação sendo identificadas como progenitoras hematopoiéticas, possivelmente provenientes da vesícula vitelínica (26). Hoje, sabe-se que três tipos celulares são encontrados no líquido amniótico: Células Epitelióides (E), com origem na pele e trato urinário do feto; Células Amnióticas (AF) propriamente ditas, originadas nas membranas placentárias e trofoblásticas (produtoras de estrógenos, progesterona e gonadotrofina coriônica humana); e células fibroblásticas (F), originadas dos tecidos conjuntivos, apresentando características e marcadores para CTMs as quais devem ser chamadas de CTMs derivadas do líquido amniótico (15). As células dos tipos AF e E aparecem no início do cultivo enquanto as células F aparecem posteriormente, porém somente AF e F persistem enquanto as células do tipo E desaparecem com o passar do tempo (27).

Na medicina humana o líquido amniótico possui como vantagem a facilidade de obtenção, uma vez que a amniocentese é procedimento de rotina como modo de propedêutica fetal e associado a um baixo número de complicações, podendo também ser coletado em cesarianas eletivas (16,15,18). Já na medicina veterinária podem ser facilmente obtidos no momento do parto normal ou em cesarianas e também em frigoríficos abatedouros, já que úteros gravídicos são considerados como descarte (18,28,21,17).

Células derivadas do líquido amniótico, isoladas e cultivadas *in vitro* têm expressado, frequentemente, marcadores de pluricelularidade e capacidade de diferenciação em tecidos das três camadas germinativas (20,13,29,21). De Coppi et al. (30) observaram a diferenciação de CT do líquido amniótico em até 6 diferentes linhagens: osteogênica, adipogênica, miogênica, endotelial, neurogênica e hepática. Visando determinar se as células do líquido amniótico abrigam potencial de diferenciação em células neurogênicas, Prusa et al. (20) observaram que células cultivadas em meio padrão apresentaram a expressão de marcadores neurogênicos esporadicamente, no entanto, quando cultivadas em meio de indução de diferenciação neurogênica a expressão destes marcadores aumentou consideravelmente.

Tsai et al. (13) também obtiveram sucesso no isolamento e na cultura de CMTs provenientes do líquido amniótico a partir da amniocentese no segundo trimestre da gestação de 20 mulheres. Além disso, uma subpopulação das células cultivadas expressaram positivamente o gene de pluricelularidade OCT-4. Quando as CMTs foram cultivadas em meio acrescido de dexametasona, insulina, isobutimetilxantina e indometacin, foram diferenciadas em osteócitos. A osteogênese foi confirmada pela coloração de Von Kossa para acúmulo de mineralizações de cálcio. Já quando cultivadas em meio acrescido de β -mercaptoetanol e bFGF foram diferenciadas em células neuronais, a confirmação foi realizada por ensaio imunocitoquímico. Em 2006 os mesmos autores reafirmaram a expressão de

marcadores de pluricelularidade Oct -4 e NANOG-, e verificaram a expressão de diversos marcadores neurogênicos como NES, TUBB3, NEFH, NEUNA60 GALC E GFAP antes e depois da indução da diferenciação neurogênica (31).

Cabral et al. (16) concluíram que as CTMs do líquido amniótico humano obtidas por amniocentese no segundo terço da gestação foram capazes de se diferenciar em células miogênicas quando cultivadas em meio acrescido de DMSO, e em células adipogênicas quando cultivadas em meio acrescido de dexametasona, teofilina, insulina e indometacina. A diferenciação celular foi avaliada pela dosagem de triglicérides no caso da diferenciação adipogênica, e da dosagem de creatinofosquinase, desidrogenase láctica e aldolase para diferenciação miogênica, ambos com o método enzimático colorimétrico utilizando o aparelho ADVIA 2400 (Bayer®). A cariotipagem a fim de demonstrar se a cultura celular induziu alterações cromossômicas demonstrou resultados compatíveis com o cariótipo obtido antes da cultura celular.

Células do líquido amniótico obtidas durante o pré-natal de mulheres mantiveram suas características iniciais como a aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, a expressão dos marcadores CD73, CD105, CD44, CD29, CD90 e CD13, a não expressão dos marcadores CD45 e CD34 bem como viabilidade de 80% mesmo após a criopreservação pelo período de 5 meses, quando foram descongeladas e recultivadas com sucesso após ao nascimento do bebê, visando sua aplicação na medicina regenerativa neonatal (22). A expressão de Oct-4, SSEA4, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e as diferenciações nas linhagens osteogênica, adipogênica e neurogênica também foram demonstradas por Phermthai e colaboradores em 2010 (32).

Uma robusta deposição mineral de cálcio em um molde biodegradável foi obtida pelo cultivo 3D de células do líquido amniótico, sugerindo grande potencial da utilização destas células na ortopedia (33). Outro estudo demonstrou o isolamento e cultivo de células-tronco do líquido amniótico, bem como sua diferenciação osteogênica quando as células foram cultivadas diretamente em meio acrescido de β -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona, dispensando-se a fase de cultivo primário em meio padrão e acelerando-se o processo. A produção de nódulos mineralizados de cálcio pôde ser observada após 18 dias de cultivo, pela coloração Alizarin Red. Este trabalho também evidenciou, via RT-PCR, que estas células expressaram todos os marcadores de osteogênese a partir do 30º dia de cultivo (34).

Antigamente pensava-se que as melhores amostras de células-tronco do líquido amniótico estavam presentes no segundo terço da gestação e eram obtidas por amniocentese no período pré-natal. No entanto, o estudo das características biológicas de CMTs do líquido amniótico do terceiro terço da gestação de mulheres obtidos durante cesariana de fetos a termo demonstrou que as células podem ser isoladas e cultivadas com grande sucesso. Além da facilidade de expansão estas células não apresentaram propriedade tumorgênicas, e foram induzidas a diferenciar-se em osteócitos no cultivo adicionando-se de ácido ascorbico e β -glicerofosfato. A diferenciação foi comprovada ao observar-se a expressão do gene osteopontina por RT-PCR. Os antígenos de superfície específicos das CTMs foram caracterizados por citometria de fluxo e, da mesma forma, observou-se a expressão do gene de pluripotência OCT-4 (22).

You et al. (29) também concluíram que as células coletadas no momento do parto são facilmente expandidas e induzidas à diferenciação em muitos tipos celulares. As células expressaram o marcador de pluricelularidade Oct-4 e os marcadores CD29, CD73, CD90 e CD 105, não expressando os marcadores CD31, CD45 e CD61. Além disto, quando transplantadas em músculos de ratos não produziram a formação de tumores. Os autores concluíram que, no futuro, o líquido amniótico será uma providencial e conveniente fonte para formação de um banco de células-tronco.

Na medicina veterinária equina, ainda são poucos os estudos realizados com células-tronco derivadas do líquido amniótico. No entanto, alguns autores já descreveram o isolamento e caracterização de células desta fonte coletadas durante o parto de equinos. A população de células de fluido amniótico demonstrou ter maior taxa de crescimento e proliferação do que populações de células adultas e outras células fetais. Estas células apresentaram diferenciação avançada para diversas linhagens celulares como adipogênica, osteogênica, miogênica e neurogênica, bem como outras características marcantes: a expressão de marcadores de pluripotência como o Oct-4 (17). Recentemente, CTMs do líquido amniótico equino foram novamente isoladas com sucesso, demonstrando grande capacidade de proliferação e apresentando a expressão de marcadores típicos de CTMs e capacidade de diferenciação em três diferentes linhagens celulares (28).

Em nosso laboratório, obtivemos CTMs do líquido amniótico de úteros gravídicos de diferentes idades gestacionais coletados em abatedouro. As células foram isoladas e expandidas, apresentando morfologia fibroblastóide, e caracterizadas imunofenotipicamente sendo coradas para vimentina, CD44, PCNA, e não coradas para citoqueratina e Oct-4 demonstrando sua origem mesenquimal e seu potencial de multiplicação. A não observação da expressão de Oct-4 difere dos resultados demonstrados na literatura e pode ser explicada pela heterogeneidade da população celular encontrada em cada amostra colhida (35). Além disso diferenças na metodologia de avaliação não podem ser descartadas uma vez que em nosso estudo foi realizada a marcação *in situ* por imunofluorescência e não uma avaliação quantitativa por citometria de fluxo. Em concordância com os demais trabalhos da literatura, as células isoladas demonstraram capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica e adipogênica (36).

Células-Tronco Derivadas da Membrana Amniótica

A membrana amniótica demonstra propriedades antiinflamatórias, antibióticas e de proteção às feridas. Estas propriedades, combinadas com a ausência ou baixa imunogenicidade, levaram ao uso clínico da membrana amniótica como curativo para queimaduras de pele, úlceras nos membros inferiores e diversas lesões oftálmicas. No entanto, nos últimos anos um novo foco de pesquisa quanto às células derivadas da membrana amniótica surgiu: Sua utilização na terapia celular e medicina regenerativa em transplantes alogênicos ou xenogênicos (37).

Na membrana amniótica estão presentes dois tipos celulares de diferentes origens: células epiteliais amnióticas derivadas do ectoderma embrionário e células amnióticas mesenquimais derivadas do mesoderma embrionário (38). As células epiteliais amnióticas humanas desenvolvem-se a partir do epiblasto, 8 dias após a fertilização e antes da gastrulação do embrião, abrindo a possibilidade de que essas células possam manter a plasticidade das células embrionárias. Células epiteliais amnióticas foram isoladas e apresentaram marcadores de superfície característicos de células pluripotentes como NANOG e Oct-4. Sob certas condições de cultivo formam estruturas esféricas de aglomerados celulares que retêm características de células-tronco. Estas células possuem a vantagem de não necessitar de *feeder* como as células-tronco embrionárias e apesar de demonstrar possuir capacidade de diferenciação *in vitro* nos tecidos endodermis (células do fígado e pâncreas), mesodermis (cardiomiócitos) e ectodermis (células neurais), não produziram tumores após o transplante em ratos (14).

Células-tronco mesenquimais da placenta humana foram capazes de se diferenciar nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica (39). Estes resultados foram confirmados (40), que mostraram que as células-tronco derivadas da placenta apresentaram marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais e celular como SSEA-4, TRA-1-61, TRA-1-80 e

9, que também são capazes de sofrer diferenciação neurogênica. Os mesmos autores documentaram uma taxa proliferativa significativamente maior das células derivadas da placenta do que das células derivadas de medula óssea.

Recentemente estudos demonstraram o isolamento eficiente de células-tronco da membrana amniótica de humanos, sendo que as mesmas expressaram marcadores de superfície característicos de células mesenquimais como CD44, CD90 e vimentina e não expressaram CD45 (41). Díaz-Prado et al. (42) demonstraram que ambas as células epiteliais e as células mesenquimais da membrana amniótica humana apresentaram o perfil imunofenotípico e o potencial de diferenciação na maioria das linhagens mesodermiais similares, propondo a utilização de células derivadas deste tecido como boas candidatas para a terapia celular e medicina regenerativa.

Os estudos com células-tronco provenientes da membrana amniótica de eqüinos são ainda mais escassos do que os estudos com células derivadas do líquido amniótico. No entanto, obtivemos sucesso no cultivo e na caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica canina e eqüina. Estas células foram obtidas pela digestão enzimática em solução de colagenase que após o cultivo demonstraram habilidade de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, e foram marcadas positivamente para vimentina e não coradas para citoqueratina por meio de imunocitoquímica, além de expressar os marcadores característicos de células mesenquimais CD44 e CD 90 e não expressarem o CD34 (43,44.).

Células-Tronco derivadas do Cordão Umbilical

1) Células-Tronco derivadas do Sangue do Cordão Umbilical

Na medicina humana o sangue de cordão umbilical é utilizado há mais de 20 anos como fonte de células-tronco hematopoiéticas para transplante. Além disto, as células do sangue de cordão umbilical e as células derivadas do tecido extravascular do cordão já demonstraram potencial de diferenciação pluripotente, ou seja, para diversas linhagens celulares das três camadas germinativas *in vitro* e *in vivo*, o que as torna uma fonte de células-tronco rica, ética e interessante (19).

O sangue do cordão pode ser recuperado ao nascimento utilizando-se um kit estéril de coleta que consiste em uma bolsa de coleta contendo um anticoagulante (citrato ou heparina) conectados a uma ou várias agulhas de coleta. Estas amostras podem ser coletadas *in útero*, antes da liberação da placenta ou ainda, *ex útero*, em partos normais ou em cesarianas sem causar dor à criança ou à mãe (19).

O potencial clonogênico de células hematopoiéticas do cordão umbilical humano foi observado pela primeira vez em 1974 por Knudtson (45) e em 1989 Broxmeyer e colaboradores (46) reportaram a confirmação da presença de células-tronco hematopoiética no sangue do cordão umbilical. A partir de então muitos outros estudos foram realizados sobre o potencial clonogênico, a propriedade de auto-renovação e a capacidade de expansão *in vitro* destas células (19) e o transplante de células-tronco hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical vem sendo utilizado com sucesso no tratamento de inúmeras doenças malignas e benignas (47).

Além disto, em 2004 foi relatada a descoberta de células-tronco não hematopoiéticas, pluripotentes chamadas de células-tronco *embryonic-like* (48) que foram capazes de se diferenciar *in vitro* em células neuronais, hepatobiliares, pancreáticas, endoteliais, do músculo liso, adipócitos, condroblastos e osteoblastos (49,50,47).

Na medicina veterinária eqüina ainda são poucos os estudos sobre as células-tronco do sangue de cordão umbilical e seu armazenamento comercial para futuros transplantes autólogos. No entanto, CTMs do cordão umbilical eqüino foram isoladas, utilizando-se

amostras a fresco, coletadas no momento do parto, pela primeira vez em 2007. Estas células apresentaram rápida aderência a placa de cultivo e expansão, morfologia fibroblastóide, e foram eficientemente diferenciadas *in vitro* em osteócitos, condrócitos e adipócitos (51). No mesmo ano, foi demonstrado que uma população de, CTMs do sangue de cordão umbilical eqüino coletados ao nascimento, expressaram os marcadores de pluricelularidade Oct-4, SSEA,-I, Tra I-60 e Tra I-8. Estas células também foram diferenciadas para condrócitos, osteócitos, hepatócitos, adipócitos e miócitos (52).

Ao comparar o potencial condrogênico de CTMs do sangue do cordão umbilical e da medula óssea de equinos, observou-se que ambas foram capazes de se diferenciar em condrócitos, coradas positivamente para proteoglicanos e expressando marcadores para cartilagem. No entanto, as células de origem no sangue de cordão umbilical apresentaram alteração na morfologia de cartilagem hialina em menor tempo (6 dias). Já, a expressão de colágeno tipo 21, aggrecan, CD-RAP e Sox9 foi alta em ambos os tipos celulares utilizados (53).

Schuch et al. (54) demonstraram que 80% das 79 amostras de células do sangue de cordão umbilical eqüino, coletadas no momento do parto, foram isoladas, expandiram e foram capazes de diferenciação *in vitro* em diferentes linhagens celulares. Os autores sugerem que a utilização de fibronectina nas placas de cultivo e a redução da tensão de oxigênio de 20% para 5% na estufa melhoram a taxa de isolamento destas células, e ainda que a senescência das mesmas é atingida após a vigésima passagem.

2) Células-Tronco Derivadas da Matriz Extravascular do Cordão Umbilical

O cordão umbilical é recoberto pelo epitélio amniótico que protege uma matriz gelatinosa e elástica de mucopolissacarídeos (ácido hialurônico e sulfato de condroitina) chamada de "Wharton's Jelly" após sua descrição por Thomas Wharton em 1856. O âmnion e a gelatina de Wharton protegem três importantes vasos sanguíneos, essenciais para o desenvolvimento do feto: um grande vaso sanguíneo que supre o desenvolvimento fetal com sangue placentário, rico em nutrientes e oxigênio e dois vasos menores, que retornam o sangue fetal, com dióxido de carbono, resíduos e outras toxinas (19).

Muitos estudos da medicina humana têm reportado a possibilidade de obtenção de CTMs não apenas do sangue do cordão umbilical, como também da gelatina de Wharton. Em 1991 a possibilidade de isolamento de células fibroblastóides derivadas da gelatina de Wharton foi relatada pela primeira vez (19). A academia francesa de medicina, em 2010, relatou que consideram as pesquisas com células derivadas do cordão umbilical extremamente promissoras, podendo fornecer novas ferramentas para o tratamento de inúmeras doenças (19).

Um simples fragmento de 5 a 10 mm³ de gelatina de Wharton tem o potencial de render a produção de mais de um bilhão de CTMs em 30 dias (19). Considerando-se o tamanho médio do cordão umbilical de humanos de 50cm e, o ainda mais longo cordão umbilical eqüino, pode-se prever que esta fonte será cada vez mais clinicamente relevante com os avanços das pesquisas médicas e veterinárias.

Recentemente inúmeros estudos da medicina humana relataram o isolamento e a capacidade de diferenciação das células derivadas do tecido extravascular do cordão umbilical em células ósseas, da pele, endotélio, hepáticas e em linhagens neurogênicas (55-58).

A medicina veterinária eqüina também tem demonstrado interesse nesta fonte de CTMs. O Isolamento e cultivo de CTMs obtidas da gelatina de Wharton de cordões umbilicais eqüinos foram realizados com sucesso. As células demonstraram morfologia fibroblastóide e apresentaram a expressão de marcadores embrionários como Oct-4, SSEA-4 e c-Kit, bem como a expressão de c-Myc (proliferação celular), CD54, CD90, CD105 e CD146. Não

expressaram os marcadores CD34, CD45 e CD133. Além disso, as células demonstraram potencial de diferenciação *in vitro* para linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica (59).

Em 2008 Cremonesi et al. (60) consideraram a obtenção de CTMs do tecido do cordão de eqüinos um procedimento não invasivo, em que as células são caracterizadas por alta taxa de proliferação e capacidade de diferenciação, com expressão dos marcadores Oct-4 e Sox-2. Estas células também mostraram a habilidade de formar esferas de aglomerado celular já reportadas na literatura (14).

Em nosso laboratório isolamos CTMs por meio da digestão enzimática em solução de colagenase da matriz extravascular do cordão umbilical canino e equino e, após o cultivo, as mesmas demonstraram capacidade de aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, e foram marcadas positivamente para vimentina, não sendo coradas para citoqueratina através de imunocitoquímica, além de expressar os marcadores característicos de células mesenquimais CD44 e CD 90 e não expressarem o CD34 (43,44).

Ao comparar as CTMs derivadas de medula óssea, tecido de cordão umbilical e do líquido amniótico eqüino, observou-se que todos os tipos celulares expressaram os mesmos marcadores: positivas para CD105, CD29, CD44 e negativos para CD34, também expressaram Oct-4, SSEA-4 e TRA I-60, apresentando ainda a capacidade de diferenciar-se na linhagem osteogênica. No entanto, as células derivadas da medula óssea e do líquido amniótico apresentaram uma taxa de proliferação significativamente maior do que as células derivadas do tecido do cordão umbilical (17). No entanto, observou-se que a suplementação com EGF (fator de crescimento epidermal) no meio de cultivo de CTMs derivadas do tecido de cordão umbilical eqüino promoveu um aumento considerável na taxa de proliferação das mesmas, sem afetar a diferenciação condrogênica e adipogênica, promovendo o aumento da deposição de matriz de cálcio extra celular durante a diferenciação osteogênica (61). Também foi observado que a utilização de componentes como cálcio e calciomimético NPS R-476 no meio de cultivo de células derivadas do tecido de cordão umbilical eqüino podem aumentar consideravelmente a taxa de proliferação destas células (62), demonstrando que CTMs de origens diferentes podem requerer diferentes nutrientes para seu total desenvolvimento *in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração que o agronegócio do eqüino é uma parcela de grande importância na economia Brasileira gerando riquezas e empregos em nosso país, podemos concluir que as pesquisas no intuito de incrementar a produção nacional e diminuir perdas econômicas são de extrema relevância.

Neste sentido, os estudos relativos à utilização de células-tronco na medicina veterinária eqüina são de grande interesse devido ao seu enorme potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados e aplicação no campo terapêutico, incluindo a cirurgia regenerativa, principalmente no estabelecimento de novas terapias para as lesões osteomusculares e condroarticulares dos cavalos atletas.

Baseando-se nas pesquisas realizadas na medicina humana e nos resultados obtidos recentemente na medicina eqüina, também podemos ressaltar que os anexos embrionários são uma fonte ética de células-tronco mesenquimais, de fácil obtenção e coletadas de maneira não invasiva. Além disto, estas células apresentam grande capacidade de proliferação e potencial de diferenciação em linhagens celulares mesodermis, endodermis e ectodermis, apresentando-se como uma alternativa vantajosa de obtenção de células-tronco para a medicina veterinária equina.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. 2011. [cited 2011 Abr 20]. Available from: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>
2. Almeida FQ, Silva VP. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. *Rev Bras Zootec.* 2010;39(supl esp):119-29.
3. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells embryo stem cell markers and show the ability for fenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.* 2009;10:172-80.
4. Meisner R. Preclinical studies of a somatic stem cell therapy: pathway to clinical approval. In: *Proceedings of the ACVP/ASVCP Concurrent Annual Meetings; 2009, Monterey. Monterey: IVIS; 2009.*
5. Barry F, Murphy M, Dwyer R, O'Brien T, Kavanagh C, Duffy G. Stem cell therapy for tissue repair: the stem cell-host interaction. In: *Proceedings of the 15° ESVOT Congress; 2010, Bolonha. Bolonha: IVIS; 2010. p.43.*
6. Gandolfi F, Vanelli A, Pennarossa G, Rahaman M, Acocella F, Brevini TAL. Large animal models for cardiac stem cell therapies. *Theriogenology.* 2011;75:1416-25.
7. Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina.* São Paulo: Atheneu; 2006.
8. Mingroni-Netto RC, Dessen EMB. Células-tronco: o que são e o que serão? *Genet Esc.* 2006;1:12-5.
9. Pereira LV. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Cienc. Saude Colet.* 2008;13:7-14.
10. Nardi NB. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. *Genet Esc.* 2007;2:25-9.
11. Muller S. Age-related decline in the osteogenic potencial of human bone marrow cells cultured in three dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem.* 2001;86:583-90.
12. Minguell J, Erices A, Congent P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 2001;(226):507-20.
13. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-semester amniotic fluid using a novel model two-stage culture protocol. *Hum Reprod.* 2004;19:1450-6.
14. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells.* 2005;23:1549-59.
15. Gucciardo L, Lories R, Ochsenebeiri-Kölble N, Done E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potencial use in perinatology and regenerative medicine. *Int J Obstet Gynaecol.* 2008;16:166-72.

16. Cabral ACV, Ângelo PC, Leite HV, Pereira AK, Lpoes APBM, Oliveira MB, et al. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células-tronco de líquido amniótico. *Rev Assoc Med Bras.* 2009;54:489-93.
17. Lovati AB, Corradetti B, Consiglio AL, Recordati C, Bonacina E, Bizzaro D, et al. Comparison of equine bone marrow, umbilical cord, and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Vet Res Commun.* 2010;35:103-21.
18. Cremonesi F, Corradetti B, Lange CA. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animals: progress and perspectives. *Theriogenology.* 2011;75:1400-15.
19. Forraz N, MCGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.* 2010;44(Suppl 1):60-9.
20. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, Lubec G, Pollack A, et al. Neurogenic cells in human amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191:309-14.
21. Uranio FM, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'abbate A, et al. 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. *Mol Reprod Dev.* 2011 doi: 10.1002/mrd.21311.
22. Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J, et al. Preclinical regulatory validation of 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. *J Pediatr Surg.* 2009;43:1164-9.
23. Fauza D. Amniotic fluid stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18: 877-91.
24. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. *Br Med Bull.* 1983;39:348-54.
25. Bydlowski SP, Debes AA, Duarte SA, Janz FL, Cavaglieri RC, Maselli LM. Células-tronco do líquido amniótico. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31:45-52.
26. Torricelli F, Brizzi LB, Bernabei PA. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before 12th week of gestation. *Ital J Anat Embryol.* 1993;98:118-26.
27. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit.* 2002;8:RA253-RA7.
28. Park SB, Seo MS, Kang JG, Chae JS, Kang KS. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. *Cytotherapy.* 2011;13:341-9.
29. You Q, Tong X, Guan Y, Zhang D, Huang M, Zhang Y, et al. The biological characteristics of human third semester amniotic fluid stem cells. *J Int Med Res.* 2009;37:105-12.

30. De Coppi P, Bartsch Jr G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007;25:100-6.
31. Tsai MS, Hwang SM, Tsai LY, Cheng FJ, Lee JL. Clonal Amniotic Fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cell. *Biol Reprod.* 2006;74:545-51.
32. Phermthai T, Odglun Y, Julavijitphong S, Titapant V, Chuenwattana P, Vantanasiri C, et al. A novel method to derive amniotic fluid stem cell for therapeutic purposes. *BMC Cell Biol.* 2010;11:1-9.
33. Peister A, Deutsch ER, Kolambbkar Y, Hutmacher DW, Guldberg RE. Amniotic fluid stem cells produce robust mineral deposits on biodegradable Scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2008;15:3129-38.
34. Antonucci I, Iezzi I, Morizio E, Mastrangelo F, Pantalone A, Mattioli-Belmonte M, et al. Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step cultura protocol. *BMC Biotechnol.* 2009;9:1-9.
35. De Vita B, Maia L, Martin I, Freitas NPP, Listoni AJ, Campos LL, et al. Éxito en la caracterización inmunocitoquímica de células madre mesenquimales del líquido amniótico equino. In: *Anais do Primer Curso Congreso Internacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa*; 2011, Bogotá. Bogotá: Universidad Nacional De Colombia; 2011. p.860.
36. De Vita B, Maia L, Martin I, Freitas NPP, Pardo M, Monteiro BA, et al. Aislamiento y diferenciación de células madre mesenquimales de líquido amniótico equino en linaje adipogénico y osteogénico. In: *Anais do Primer Curso Congreso Internacional de Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa*; 2011, Bogotá. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011. p.890.
37. Parolini O, Caruso M. Review: preclinical studies on placenta-derived cells and amniotic membrane: an update. *Placenta.* 2011;32(Suppl 2):S186-95.
38. Sakuragawa N, Kakishita K, Kikuchi A, Okano H, Uchida S, Kamo I, et al. Human amnion mesenchyme cells express phenotypes of neuroglial progenitor cells. *J Neurosci Res.* 2004;78:208-14.
39. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamagushi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from corionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6:543-53.
40. Yen BL, Huang HI, Chien CC, Jui HY, Ko BS, Yao M, et al. Isolation of multipotent cells from human placenta. *Stem Cells.* 2005;23:3-9.
41. Shuang-Zhi H, Ping S, Xi-Ning P. Culture and identification of human amniotic mesenchymal stem cells. *Chin Med Sci J.* 2010;25:211-4.

42. Díaz-Prado S, Muiños-López E, Hermida-Gomez T, Cicione C, Rendal-Vázquez ME, Fuentes-Boquete I, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine. *Differentiation*. 2011;81:162-71.
43. De Vita B, Maia L, Freitas NPP, Alvarenga FCL, Amorim RL, Prestes NC. Isolation and culture of amniotic membrane and umbilical cord mesenchymal stem cells of canine foetus. In: *Proceedings of Annual International Meeting of the Portuguese Society for Stem Cells and Cellular Therapies; 2010, Guimarães*. Guimarães: Portuguese Society for Stem Cells and Cellular Therapies; 2010.
44. De Vita B, Maia L, Freitas NPP, Campos LL, Alvarenga FCL, Prestes NC. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas da membrana amniótica e gelatina de wharton de equinos. In: *Anais do 5º Congresso Brasileiro de Células-tronco e Terapia Celular; 2010, Gramado*. Gramado: ABTCel; 2010.
45. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*. 1974;43:357-61.
46. Broxmeyer HE, Douglas GW. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:3828-32.
47. Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation. In: *StemBook*. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute; 2010. [cited 2011 Abr 28]. Available from: <www.stembook.org 2010>.
48. McGuckin C, Forraz N, Baradez MO. Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol Exp*. 2006;66:321-9.
49. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*. 2004;22:625-34.
50. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 2004;200:123-35.
51. Koch TG, Heerckens T, Thomsen PD, Betts DH. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord. *BMC Biotechnol*. 2007;7:1-9.
52. Reed SA, Johnson SE. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol*. 2008;215:329-36.
53. Berg L, Koch T, Heerckens T, Bessonov K, Thomsen P, Betts D. Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2009;22:363-70.
54. Schuh EM, Friedman MS, Carrade DD, Li J, Heeke D, Oyserman SM, et al. Identification of variables that optimize isolation and culture of multipotent mesenchymal stem cells from equine umbilical-cord blood. *Am J Vet Res*. 2009;70:1526-35.

55. Xu HH, Zhao L, Detamore MS, Takagi S, Chow LC. Umbilical cord stem cell seeding on fast-resorbable calcium phosphate bone cement. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:2743-53.
56. Caballero M, Reed CR, Madan G, Van Aalst JA. Osteoinduction in umbilical cord- and palate periosteum-derived mesenchymal stem cells. *Ann Plast Surg*. 2010;64:605-9.
57. Zhang YN, Lie PC, Wei X. Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*. 2009;11:548-58.
58. Zhang HT, Fan J. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation*. 2010;79:15-20.
59. Hoynowski SM, Fry MM, Gardner BM, Leming MT, Tucker JR, Black L. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;362:347-53.
60. Cremonesi F, Violini S, Consiglio-Lange A, Ramelli P, Ranzenigo G, Mariani P. Isolation in vitro culture and characterization of foal umbilical cord cells at birth. *Vet Res Commun*. 2008;32(Suppl 1):S139-42.
61. Passeri S, Nocchi F, Lamanna R, Lapi S. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol Int*. 2009;33:100-5.
62. Martino NA, Lange-Consiglio A, Cremonesi F, Valentini L, Caira M, Guaricci AC, et al. Functional expression of extracellular calcium sensing receptor (CaSR) in equine umbilical cord matrix size-sieved stem cell. *PloS One*. 2011;6:1-9.

Recebido em: 12/08/11

Aceito em: 06/10/11