

**THAÍS MARIA VALÉRIO SANTOS**

**INTERAÇÃO *IN VITRO* DOS MEIOS DE CULTIVO GLUTAMINA ADITIVADO E FOLICULAR OVARIANO SOBRE A CINÉTICA E PLASTICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CAPRINAS**

**Teresina  
Piauí - Brasil  
2017**

**THAÍS MARIA VALÉRIO SANTOS**

**INTERAÇÃO *IN VITRO* DOS MEIOS DE CULTIVO GLUTAMINA ADITIVADO E FOLICULAR OVARIANO SOBRE A CINÉTICA E PLASTICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CAPRINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

**Sanidade e Reprodução Animal**

Orientadora:

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Acelina Martins de Carvalho**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto**

**Teresina**

**Piauí – Brasil**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**S237i** Santos, Thaís Maria Valério

Interação *in vitro* dos meios de cultivo glutamina aditivado e folicular ovariano sobre a cinética e plasticidade de células-tronco mesenquimais caprinas / Thaís Maria Valério Santos - 2017.

41 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2017.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Acelina Martins de Carvalho

1.Células-tronco mesenquimais 2.Meios de cultivo 3.Folicular ovariano 4. Cinética 5. Plasticidade I.Título.

**CDD 575. 1**

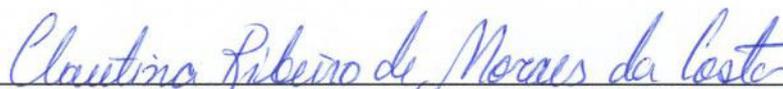
INTERAÇÃO IN VITRO DOS MEIOS DE CULTIVO GLUTAMINA  
ADITIVADO E FOLICULAR OVARIANO SOBRE A CINÉTICA E  
PLASTICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CAPRINAS

THAIS MARIA VALÉRIO SANTOS

Dissertação aprovada em: 29/06/2017

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externa) / IFPI

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andressa Rego da Rocha (Externa) / IFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto (Interno) / DMV/CCA/UFPI

*Dedico,*

*À Deus, que em sua infinita misericórdia, sempre foi minha fonte de  
força e meu guia, mantendo-me de pé por toda a caminhada.*

*Aos meus pais, pelo exemplo de uma vida digna e honesta.*

*Ao meu namorado e amigos, pelo carinho, incentivo e momentos  
compartilhados.*

## ***Agradecimentos,***

*À Universidade Federal do Piauí, pela oferta do curso de pós-graduação e pela disponibilização de um ambiente adequado para o desenvolvimento da pesquisa realizada.*

*À professora Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho, minha orientadora, pela oportunidade e confiança. Pela orientação prestada, incentivo, conhecimento compartilhado, amizade e apoio que sempre demonstrou. Pelo exemplo de ética e pesquisadora. Aqui lhe exprimo minha enorme gratidão.*

*Ao professor Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto, meu coorientador, pela disponibilidade, treinamento em cultivo celular, supervisão das etapas do meu experimento, revisão do meu trabalho e especialmente pela referência profissional.*

*À Dra. Lucilene dos Santos Silva, pelo auxílio com os resultados histológicos e atenção.*

*Aos pós-graduandos, Gustavo Cardoso e Camila Ernanda de Carvalho, pela parceira e grande auxílio. Agradeço também a Dayseanny Bezerra, Renata Patrícia Sousa, Elis Rosélia Silva, Yulla de Carvalho, Aíla Vieira, Laís Meirelles, Cristiano Jackson Coelho e Huanna Soares, pela disponibilidade em ajudar e esclarecer dúvidas. Obrigada pelas amizades construídas e pelos momentos de descontração que amenizaram as aflições do dia a dia.*

*A todos os funcionários do NUPCelt, em especial à Fabiana, Hermínio, Janete e Flávia por sempre colaborarem para o desenvolvimento das atividades do núcleo.*

*Minha eterna gratidão aos meus amados pais, Francisco e Maria de Fátima, minhas raízes e asas, pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos. Ao meu namorado e companheiro de todas as horas, Klaudson, pelo carinho, compreensão e amor. Por sempre se propor a aprender algo na tentativa de me auxiliar. Aos amigos, pela força e torcida.*

*Carinhosamente, também agradeço, à Cecília Guimarães, Fábica Rocha, Ludmila Moura e Paula Fortes, pela amizade, cumplicidade e suporte.*

*E sou grata, sempre e acima de tudo, a Deus, meu refúgio e minha fortaleza, pelo dom da vida e pelas bênçãos concedidas em minha jornada.*

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*(Chico Xavier)*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
INTRODUÇÃO.....	13
MANUSCRITO.....	19
<i>ABSTRACT</i> .....	20
<i>INTRODUÇÃO</i> .....	20
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	21
<i>Coleta, isolamento e cultura celular</i> .....	21
<i>Criopreservação</i> .....	21
<i>Meios de cultivos e grupos experimentais</i> .....	22
<i>Ensaio de unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F)</i> .....	22
<i>Ensaio de diferenciação celular</i> .....	23
<i>Ensaio de cinética celular sob curva de crescimento por saturação</i> .....	23
<i>Análise estatística</i> .....	24
<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	24
<i>CONCLUSÃO</i> .....	30
<i>DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS</i> .....	30
<i>REFERÊNCIAS</i> .....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	34
REFERÊNCIAS .....	35

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
Figura 1.	CTMMO de caprino. (A) Isolamento após 24h, poucas células mesenquimais aderidas e células mononucleares e hemácias em suspensão; (B) Células em formato fibroblastóide, com confluência celular de 65%.	24
Figura 2.	Ensaio de unidade formadora de colônias fibroblastóides de CTMMO de caprino. (A) Grupo 1(Controle); (B) Grupo 2 (CTMMO em 70% do MEIO 1 e 30% do MEIO 2); (C) Grupo 3 (CTMMO em 50% do MEIO 1 e 50% do MEIO 2); (D) Grupo 4 (CTMMO em 30% do MEIO 1 e 70% do MEIO 2).	25
Figura 3.	Ensaio de diferenciação celular de CTMMO de caprino. Diferenciação osteogênica avaliada com Alizarin Red, grupos 1, 2, 3 e 4. Diferenciação condrogênica comprovada com Alcian Blue, grupo 1, grupos 2, 3 e 4,. Diferenciação adipogênica evidenciada com Oil Red, grupos 1, 2, 3 e 4.	26
Figura 4.	Histologia dos botões celulares. Diferenciação condrogênica. (A) HE; (B e C) material amorfo fracamente basofílico sugestivo de matriz extracelular (*). Diferenciação osteogênica. (D) material sugestivo de mineralização (→) HE	27
Figura 5.	Representação gráfica da cinética de crescimento de CTMMO de caprino cultivadas em quatro diferentes meios, durante 21 dias.	29

**LISTA DE TABELAS**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
Tabela 1	Meios de cultivo utilizados para avaliação da resposta celular quanto à cinética e plasticidade de CTMMO de caprinos.	22
Tabela 2	Descrição do crescimento médio e desvio-padrão de CTMMO cultivadas em quatro diferentes meios, durante 21 dias, demonstrando, a média de crescimento celular e o desvio-padrão.	28

## RESUMO

### **Interação *in vitro* dos meios de cultivo glutamina aditivado e folicular ovariano sobre a cinética e plasticidade de células-tronco mesenquimais caprinas**

As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam maior plasticidade, dentre as linhagens de células-tronco somáticas (CTS), originando tecidos mesodermis e não mesodermis. A medula óssea é um dos principais sítios anatômicos para sua obtenção, embora possam ser obtidas de tecidos pós-natais. Em decorrência da multipotencialidade das CTM, sugere-se alto potencial para uso em terapia celular e gênica, assim, tem sido propostos co-cultivos com outras linhagens celulares. Para obter êxito em co-cultivos *in vitro* é necessário fornecer às células, geneticamente distintas, um meio de desenvolvimento composto que forneça condições de desenvolvimento para ambas linhagens. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre o meio de cultivo padrão para células-tronco e o meio de cultivo de folículos ovarianos, combinados em concentrações g1: 100%/0%, g2: 70%/30%, g3: 50%/50%, g4: 30%/70%, respectivamente, mediante avaliação da curva de crescimento e da capacidade de diferenciação celular. Para tanto, foi utilizado um caprino, macho, com idade de um ano, hígido como doador. O animal foi preparado cirurgicamente e a medula óssea foi coletada através do fêmur. O aspirado medular foi isolado por gradiente de densidade, avaliadas a viabilidade e morfologia celular e as CTM foram expandidas até a terceira passagem, sendo imediatamente criopreservadas. Após seis meses, as células foram descongeladas, expandidas, divididas em quatro grupos cultivados com diferentes meios e submetidas aos ensaios de unidade formadora de colônia fibroblastóide, diferenciação (osteogênica, adipogênica e condrogênica) e cinética celular por curva de crescimento por saturação. Em todos os tratamentos utilizados foi observada a capacidade de formar colônias. As diferenciações foram certificadas pela observação de alterações morfológicas e coloração característica semelhantes aos fenótipos de osteoblastos, adipócitos e condrócitos em todos os grupos. O desempenho das células em curva de crescimento, observado nos quatro grupos, revelou uma fase lag curta, seguida de um crescimento exponencial na fase log, ausência de plateau e finalizado pela fase de declínio ou morte. Onde os grupos 1, 2, 3 e 4 apresentaram curva de crescimento com média de  $83,1 \times 10^3 \pm 13,5$ ;  $98,2 \times 10^3 \pm 13,1$ ;  $72,4 \times 10^3 \pm 14,1$  e  $48,2 \times 10^3 \pm 13,0$  células/mL por poço, respectivamente, ao longo de 21 dias de cultivo. Os achados inferiram que o tratamento utilizado no grupo 2 apresentou o melhor resultado quanto à cinética de CTM caprinas. Além disso, as diferentes concentrações entre os dois meios foram capazes de manter a clonogenicidade das células, assim como a plasticidade celular, sendo a última demonstrada pelas diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais, meios de cultivo, folicular ovariano, cinética, plasticidade.

## ABSTRACT

### ***In vitro* interaction of the additive glutamine and ovarian follicular culture mediums on the kinetics and plasticity of mesenchymal stem cells of caprine bone marrow**

The mesenchymal stem cells (MSC) present greater plasticity, among somatic stem cells (STC) lineages, originating mesodermal and non-mesodermal tissues. Bone marrow is one of the major anatomical sites for its obtainment, although it can be obtained from postnatal tissues. Due to the multipotentiality of MSC, it is suggested a high potential for use in cell and gene therapy, thus, co-cultures with other cell lineages have been proposed. To succeed in *in vitro* co-cultures it is necessary to provide the cells, genetically distinct, a compound development medium which provides developmental conditions for both lineages. The objective of this work was to evaluate the interaction between the standard culture medium for stem cells and the culture medium of ovarian follicles, combined in concentrations g1: 100%/0%, g2: 70%/30%, g3: 50%/50%, g4: 30%/70%, respectively, by evaluation of growth curve and differentiation ability cell. Therefore, a goat, male, one year old, healthy, was used as donor. The animal was surgically prepared and the bone marrow was collected through the femur. The medullary aspirate was isolated by density gradient, cell viability and morphology were evaluated and the MSC were expanded until the third passage, being immediately cryopreserved. After six months, the cells were thawed, expanded, divided into four groups cultivated with different mediums and submitted to fibroblast colony forming unit assays, differentiation (osteogenic, adipogenic and chondrogenic) and kinetic cellular by saturation growth curve. In all used treatments the ability to form colonies was observed. Differentiations were certified by observation of morphological changes and characteristic coloration similar to osteoblast, adipocyte and chondrocyte phenotypes in all groups. The performance of cells in growth curve, observed in the four groups, revealed a short *lag* phase, followed by an exponential growth in the *log* phase, absence of *plateau* and ended by the decline or death phase. Where the groups 1, 2, 3 and 4 presented a growth curve with mean of  $83,1 \times 10^3 \pm 13,5$ ;  $98,2 \times 10^3 \pm 13,1$ ;  $72,4 \times 10^3 \pm 14,1$  and  $48,2 \times 10^3 \pm 13,0$  cells / mL per well, respectively, over 21 days of cultivation. The findings inferred that the treatment used in group 2 presented the best result regarding the kinetics of goat MSC. In addition, the different concentrations between the two media were able to maintain cell clonogenicity, as well as cellular plasticity, the latter being demonstrated by the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiations.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, culture medium, ovarian follicular, kinetics, plasticity.

## INTRODUÇÃO

A multipotencialidade e a capacidade de autorrenovação são características peculiares das células-tronco (CT). Os tecidos do animal adulto possuem reservas de células que apresentam capacidade de multiplicar-se e diferenciar-se, sem comprometer esse estoque (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008). Deste modo, contribuem com a manutenção da integridade do organismo (COVAS e ZAGO, 2004).

As CT são células indiferenciadas, definidas pela capacidade de originar outras células com características idênticas, habilidade para diferenciação em diversas linhagens celulares e reconstituição funcional de determinados tecidos (ALVES e MUOTRI, 2014). Estas particularidades permitem a sua reposição ativa e garante a regeneração e remodelação após injúria tecidual (BLAU, BRAZELTON e WEIMANN, 2001; FODOR, 2003).

Alguns tecidos como o hematopoiético, intestinal e cutâneo são caracterizados pela constante perda de células, sendo as CT responsáveis pela reposição celular e consequentemente homeostase tecidual (HUMPREYSE *et al.*, 2008). Além da reposição de células que sofrem apoptose, também podem proporcionar o restabelecimento de injúrias não fisiológicas decorrentes de traumas ou agentes patogênicos (NARDI, 2007).

Quanto ao potencial de diferenciação as CT podem ser divididas em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. São chamadas de totipotentes aquelas capazes de originar todos os tipos teciduais embrionários e extraembrionários; as pluripotentes podem diferenciar-se em todas as linhagens celulares, com exceção dos anexos embrionários e placenta; as multipotentes possuem potencial de diferenciação mais limitado, restringindo-se aos tipos celulares presentes no tecido do qual se originaram; e as unipotentes geram apenas um único tipo celular (BECK e BLANPAIN, 2012; KOŹLIK e WÓJCICKI, 2014).

As CT também podem ser classificadas com base na sua origem em células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco fetais (CTF), células-tronco somáticas (CTS) ou adultas (CTA) e células-tronco de pluripotência induzidas (iPS) (KOŹLIK e WÓJCICKI, 2014). As CTE são derivadas da massa interna do blastocisto e possuem capacidade de originar todos os tecidos do corpo de um indivíduo adulto (COVAS e ZAGOS, 2004; ROBINSON e DALEY, 2012). As CTF são provenientes de tecidos extraembrionários como placenta, córion e membrana amniótica, apresentam um crescimento rápido e boa plasticidade. Nos últimos anos, estas células têm recebido muita atenção como fontes alternativas de células

multipotentes (YEN *et al.*, 2005). As CTS estão presentes em tecidos especializados, após a formação dos três folhetos embrionários, com potencial de diferenciação multipotente, limitado aos tipos celulares do tecido do qual se originaram. As iPS são obtidas pela reprogramação genética de células somáticas diferenciadas com a finalidade de restaurar a pluripotência típica das CTE (BECK e BLANPAIN, 2012; KOŽLIK e WÓJCICKI, 2014).

As células-tronco mesenquimais (CTM), um tipo específico de CTS, foram inicialmente isoladas da medula óssea por Friedenstein e colaboradores (1973), sendo descritas como unidades formadoras de colônia de fibroblasto (CFU-F), devido à morfologia fibroblastóide, com elevada capacidade de adesão à superfície plástica (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1973; AFANASYEV *et al.*, 2010) e potencial para se diferenciar em linhagens derivadas do mesoderma como osteócitos, condrócitos e adipócitos (BASCIANO *et al.*, 2011).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular existem três critérios fundamentais para que uma determinada população de células seja classificada como CTM. O primeiro é aderência ao plástico de cultura, seguido pela expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, bem como ausência de expressão dos marcadores hematopoiéticos – CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR ao longo do cultivo. Por fim, capacidade de diferenciação em linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica, na presença de indutores específicos (DOMINICI *et al.*, 2006).

As CTM apresentam maior plasticidade, dentre as linhagens de CTS pesquisadas, originando tecidos mesodermis e não mesodermis (MEIRELLES, CHAGASTELLES e NARDI, 2006). A facilidade de aderência em superfícies plásticas ou vidro e a capacidade de diferenciar-se *in vitro* e *in vivo*, tem atraído pesquisadores (DING *et al.*, 2015). Na medicina veterinária, as CTM de diferentes sítios anatômicos tem sido isoladas com sucesso, em espécies domésticas e silvestres, da medula óssea, tecido adiposo, geleia de Warthon do cordão umbilical e polpa de dente de caprinos (SILVA FILHO *et al.*, 2014; COSTA, 2015; SILVA, 2016), cães (RUSSELL *et al.*, 2016), equino (PALL *et al.*, 2016), cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) (CABRAL *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015; ROCHA, 2015) e cateto (*Tayassu tajacu*) (PESSOA *et al.*, 2014; ARGÔLO NETO *et al.*, 2016).

A medula óssea é considerada um dos principais sítios para obtenção de CTM, devido à facilidade de coleta e isolamento; quando comparada com outras CTM, apresenta superior capacidade de diferenciação em tipos teciduais pertencentes ao sistema músculo-esquelético (FORTIER e TRAVIS, 2011); elevado potencial de desenvolvimento, além de facilidade de

adesão e expansão (MAYHALL, PAFFETT-LUGASSY e ZON 2004). É um tecido de consistência gelatinosa (BAIN, CLARK e WILKINS, 2011; SISON e BROWN, 2011) que ocupa e preenche a cavidade interna de diversos ossos, incluindo os espaços entre as trabéculas de osso esponjoso e os grandes espaços da cavidade medular no interior das diáfises dos ossos longos (PÉREZ-SERRANO *et al.*, 2012; SUGIYAMA e NAGASAWA, 2012). Ademais, é o local de produção de células do sistema imunológico e de todas as células sanguíneas (COLVILLE, 2011), sendo o maior órgão hematopoiético do corpo (LATIMER e ANDREASE, 2002).

Na década de 60, descobriu-se que a medula óssea é constituída por dois tipos de CT distintos: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as CTM. As primeiras são responsáveis por repor todas as células sanguíneas (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, hemácias e plaquetas). As outras pertencem a uma população multipotente progenitora de distintas linhagens (ARAÚJO, 2005), capazes de se diferenciarem em células de origem mesodérmica e não mesodérmicas (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Estudos demonstram que as células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) também tem um papel ativo no controle da diferenciação das CTH nos diferentes tipos de células sanguíneas (KUMAR, ASTER e ABBAS, 2015).

A facilidade de expansão em cultura evita estoque em banco de tecidos e também abre uma nova perspectiva na medicina reparadora (MOTA, SOARES e SANTOS, 2005). Além disso, as CTMMO também possuem como vantagem alto potencial para uso em terapia celular e gênica, podendo ser obtido do próprio paciente, o que minimiza a rejeição imunológica (BIANCO *et al.*, 2001). Embora estejam presentes em uma concentração muito baixa na medula óssea (0,001 a 0,01%) (TAYLOR e CLEGG, 2011), esta desvantagem pode ser compensada pela expansão *in vitro* por duas a quatro semanas (DAHLGREN, 2009). Estas células diferenciam-se de acordo com a sinalização do meio ambiente local e são atraídas por fatores da inflamação aguda (SOUZA *et al.*, 2005). As aplicações clínicas para a punção aspirativa de medula óssea costumavam incluir determinados distúrbios hematopoiéticos e linfoproliferativos (KATHLEEN, 2000). Todavia, as indicações foram ampliadas, tendo em vista o seu potencial terapêutico (BARREIRA *et al.*, 2008).

A multipotencialidade das CTM, em terapias clínicas e pré-clínicas, tem possibilitado inúmeros co-cultivos com outros grupos celulares, tais como CTM da granulosa, do *cumulus* e do ovário em suínos (WU *et al.*, 2002), camundongo (HAIDARI, SALEHNIA e VALOJERDI, 2008) e búfalos (RAMESH *et al.*, 2008). Protocolos de co-cultivos com CTM

têm sido desenvolvidos para melhorar o desenvolvimento *in vitro* de oócitos e embriões (MAO *et al.*, 2002), uma vez que as interações celulares entre a linha germinal ovariana e células somáticas são fundamentais para o amadurecimento e função folicular (NILSSON e SKINNER, 2001). A utilização de CTM em diferentes sistemas de co-cultura tem proporcionado efeitos benéficos sobre o desenvolvimento de oócitos. Há evidências que células somáticas usadas nos co-cultivos produzem fatores desconhecidos que promovem o desenvolvimento embrionário e excluem resíduos tóxicos de embriões a partir do meio de cultura (HAJIALIZADEH *et al.*, 2008).

Para garantir o sucesso de culturas *in vitro* é necessário proporcionar às células um meio de desenvolvimento que mimetize as condições encontradas *in vivo*. Portanto, os meios de cultivo devem oferecer condições adequadas de pH e osmolalidade, assim como prover as substâncias que estas células não podem produzir (MORAES, MENDONÇA e SUAZO, 2008; BRUNNER *et al.*, 2010). Nesta função, aparecem os meios de cultura, que devem ser ricos em nutrientes para suportar o crescimento e proliferação celular (ISAAC *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2016). Estudos têm demonstrado que estes interferem no potencial de diferenciação das células isoladas (WU *et al.*, 2002 ; LIMA *et al.*, 2012; RIBEIRO, MASSOCO e LACERDA NETO, 2013).

O meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) é tido como um meio ideal para cultivo de CT (LINDROOS, SUURONEN e MIETTINEN, 2011). Este é rico em aminoácidos, vitaminas, nitrato férrico, piruvato de sódio e alguns aminoácidos suplementares. Por ser um meio basal, não contém proteínas ou agente que promovam crescimento, sendo necessária sua suplementação (MONCLARO *et al.*, 2016).

O crescimento de certas linhagens celulares exige um meio completo ou rico em elementos adicionais que não estão presentes em meios basais. Assim, os suplementos ajudam a sustentar a proliferação e a manter o metabolismo celular normal (VAN DER VALK, *et al.*, 2010). O soro fetal bovino (SFB) é uma fonte rica de fatores de crescimento, sendo um dos componentes mais importantes do meio de cultivo celular e serve como fonte de aminoácidos, proteínas, vitaminas (particularmente lipossolúveis como A, D, E e K), carboidratos, lipídios, hormônios, fatores de crescimento, minerais e oligoelementos (BRUNNER *et al.*, 2010).

Os aminoácidos são os elementos de construção das proteínas, e por isso são ingredientes obrigatórios em todos os meios de cultivos conhecidos. São requeridos para proliferação celular, e sua concentração determina a densidade celular máxima alcançada. A

L-glutamina, um aminoácido essencial, é de particular importância, serve como uma fonte de energia secundária para o metabolismo (FRESHNEY, 2005). Aminoácidos não essenciais também podem ser agregados ao meio de cultivo para repor aqueles que foram consumidos durante o crescimento. Estes estimulam o crescimento e prolongam a viabilidade das células (VAN DER VALK *et al.*, 2010). A fim de se evitar possíveis contaminações, pode-se ainda, acrescentar antibióticos como penicilina e estreptomicina (BÜSCHER, DELGADO e GONZALEZ-REY, 2009).

A partir de 1950, foram elaborados meios de cultivo mais complexos com o propósito de excluir fluidos animais das formulações. Tais meios livres de soro devem suprir as necessidades nutricionais celulares, como: insulina, transferrina, metais pesados, hormônios, fatores de crescimento, dentre outros. A exigência desses elementos e a complexidade do meio dependem do tipo celular que será cultivado. Além disso, por ser altamente específico é necessário adaptação para cada tipo celular em alguns casos (ALVES e GUIMARÃES, 2010).

Particularmente, no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, a suplementação com elementos proteicos é essencial para o desenvolvimento folicular (ARUNAKUMARI, SHANMUGASUNDARAM e RAO, 2010). A albumina sérica bovina (BSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo (USTA *et al.*, 2014), sendo frequentemente empregada para substituir o soro nos meios de cultura (DEL COLLADO, 2014). A BSA tem importante função na redução do risco de estresse oxidativo, o que garante proteção aos oócitos (OTSUKI *et al.*, 2012).

A associação de insulina-transferrina-selênio (ITS) vem sendo utilizada como antioxidante em meios de cultivo celular diminuindo a produção de radicais livres e peroxidação de lipídios (LEE *et al.*, 2005). A insulina é um hormônio fundamental para a cultura celular e está envolvida no crescimento e desenvolvimento de uma ampla variedade de tipos celulares. A transferrina atua no estímulo da proliferação celular, participa como carreadora de ferro intracelular e ainda desempenha papel desintoxicante retirando metais tóxicos existentes no meio. Já o selênio é um elemento fundamental em selenoproteínas, composto químicos com propriedades antioxidantes (VAN DER VALK *et al.*, 2010).

O ácido ascórbico também é um importante antioxidante indicado para o cultivo *in vitro*, devido a capacidade de reagir com metais existentes no meio de cultura, impedindo a oxidação dos mesmos. Além disso, é fundamental na síntese de colágeno (MORAES *et al.*,

2008). E ainda favorece a viabilidade e o desenvolvimento folicular em caprinos (SILVA *et al.*, 2011) e contribui para a ativação folicular em bovinos (ANDRADE *et al.*, 2012).

Além de elementos antioxidantes, substratos energéticos são acrescentados ao meio, como a hipoxantina que conserva a taxa de folículos morfológicamente normais no cultivo (SILVA *et al.*, 2004). Esta substância produz SACK (suppression of asymmetric cell kinetics, supressão da cinética celular assimétrica), que resulta em divisões predominantemente simétricas de CT. Isso dá origem a uma geração de população de CTS *in vitro*, sem diferenciação (PARÉ e SHERLEY, 2011).

Dentre as perspectivas de pesquisa com meios enriquecidos, destaca-se o uso de CTM em co-cultivos (WU *et al.*, 2002; HAIDARI *et al.*, 2008; RAMESH *et al.*, 2008). Não obstante, faz-se mister a elucidação dos potenciais efeitos dos meios convencionais de cultivo de CTM com meios de cultivo folicular sobre a cinética e plasticidade destas células, a fim de mitigar as dúvidas persistentes sobre sua utilização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre os meios de cultivo celular de CTM e folicular ovariano, baseado na resposta celular quanto à cinética e plasticidade de CTM caprinas.

Este trabalho encontra-se estruturado com uma introdução, manuscrito científico desenvolvido conforme as normas do periódico “Ciência Rural” (ISSN: 1678-4596, Qualis Capes B1, na área de Zootecnia e Recursos Pesqueiros), considerações finais e referencial bibliográfico.

**MANUSCRITO**

**INTERAÇÃO *IN VITRO* DOS MEIOS DE CULTIVO GLUTAMINA ADITIVADO E FOLICULAR OVARIANO SOBRE A CINÉTICA E PLASTICIDADE DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CAPRINAS**

A ser submetido ao periódico *Ciência Rural*

ISSN: 1678-4596

Qualis B1

## **Interaction of the additive glutamine and ovarian follicular culture mediums on the kinetics and plasticity of mesenchymal stem cells of caprine bone marrow**

T.M.V.Santos<sup>1</sup>, N.M.ArgoloNeto<sup>2</sup>, M.A.M.Carvalho<sup>3</sup>

### **ABSTRACT**

The stem cells stand out for their great therapeutic potential, however the cultivation of stem cells in unconventional medium is little studied, this post, we aim to evaluate the interaction between the standard culture medium for stem cells and the culture medium of ovarian follicles, combined in concentrations g1: 100%/0%, g2: 70%/30%, g3: 50%/50%, g4: 30%/70%, respectively, by evaluation of growth curve and differentiation ability cell, we infer that the treatment used in group 2 presented the best result regarding the kinetics of goat MSC. In addition, the different concentrations between the two media were able to maintain cell clonogenicity, as well as cellular plasticity, the latter being demonstrated by the osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiations.

### **INTRODUÇÃO**

O potencial terapêutico das células tronco (CT) fomentam diversos estudos, principalmente na terapia de lesões, doenças degenerativas ou crônicas (DE SOUSA et al., 2016). As CT são precursoras de outros tipos celulares, caracterizando-se por autorrenovação, diferenciação e capacidade de originar diversos tecidos (DE VITA et al., 2013).

Dentre as células-tronco somáticas (CTS), as células-tronco mesenquimais (CTM) destacam-se pela facilidade de coleta, cultivo, elevada plasticidade, características imunomoduladoras e imunossupressoras (MONTEIRO et al., 2010). Essa população reside nos tecidos adultos de origem mesodérmica e é responsável pela manutenção da integridade tecidual (ELEOTERIO et al. 2016).

Na medicina veterinária, as CTM têm sido isoladas com sucesso de diferentes sítios anatômicos, como medula óssea (ARGÔLO NETO et al., 2016; CABRAL et al., 2012; RUSSELL et al., 2016; SILVA FILHO et al., 2014), tecido adiposo (PALL et al., 2016; PESSOA et al., 2014), polpa de dente (CARVALHO et al., 2015) e outros.

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil;

<sup>2</sup> Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil;

<sup>3</sup> Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brazil.

O cultivo *in vitro* devem promover condições ideais que simule as circunstâncias encontradas *in vivo*. Assim, além de pH e osmolaridade adequados, os meios de cultivo precisam oferecer as substâncias que estas células não são capazes de produzir (BRUNNER et al., 2010). Portanto, estes devem ser ricos em nutrientes para suportar o crescimento e proliferação celular (DIAS et al., 2016). Além disso, estudos indicam que os meios de cultivo interferem no potencial de diferenciação das células isoladas (RIBEIRO et al., 2013).

Diferentes métodos de isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) já foram empregados com sucesso, mas todos envolvem o uso de meios convencionais para cultivo de CTM. Logo, pouco se sabe sobre o desempenho das CTMMO quando cultivadas em meios não convencionais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação entre os meios de cultivo celular e folicular, baseado na resposta celular quanto à cinética e plasticidade de CTM caprinas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Coleta, isolamento e cultura celular*

Coletou-se o aspirado medular do fêmur de um caprino sob plano anestésico com 3mg/kg IV de propofol associado a 5µg/kg IV de fentanil, e mantido com isoflurano. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPI, sob o parecer nº 117/15.

Para isolamento e cultivo de CTM o aspirado medular foi separado por gradiente de densidade Ficoll-paque®. As células obtidas foram semeadas em placa de cultivo e incubadas em estufa a 37°C em 5% de CO<sup>2</sup> e umidade de 95%. A cada 72 horas foi realizada a troca de meio, observando-se a morfologia das células em cultura. Ao atingir a confluência de 80%, a cultura foi submetida a tripsinização, para isso, utilizou-se tripsina a 0,25% (Gibco) por 5 minutos em incubadora úmida a 37 °C, com posterior inativação com o dobro do volume de meio de cultivo, seguida de centrifugação a 300 g, por 10 minutos a 20°C. As células foram repicadas para o dobro da área de cultivo e mantidas em estufa a 37°C em 5% de CO<sup>2</sup> e umidade de 95% para expansão.

### *Criopreservação*

Após a expansão, as células foram tripsinizadas na terceira passagem, e ressuspensas em meio de congelamento (50% de meio DMEM F12, 40% de soro fetal bovino e 10% de meio de congelamento dimetil-sulfóxido- DMSO), na concentração de 10<sup>6</sup> células/mL,

transferidas para criotubos, mantidos em Mr. Frosty (Nalgene, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA), acondicionado em freezer a  $-86^{\circ}\text{C}$  *overnight* e posteriormente armazenados em nitrogênio líquido.

#### *Meios de cultivos e grupos experimentais*

Para avaliação das células em diferentes meios de cultivos, os meios foram preparados de acordo com a Tabela 1. Após o preparado, os meios foram associados em concentrações distintas: **Grupo 1:** CTMMO em 100% do MEIO 1 (controle); **Grupo 2:** CTMMO em 70% do MEIO 1 e 30% do MEIO 2; **Grupo 3:** CTMMO em 50% do MEIO 1 e 50% do MEIO 2; **Grupo 4:** CTMMO em 30% do MEIO 1 e 70% do MEIO 2.

**Tabela 1** - Meios de cultivo utilizados para avaliação da resposta celular quanto à cinética e plasticidade de CTMMO de caprinos.

MEIO 1 (Meio de cultivo de CTM)			MEIO 2 (Meio de cultivo folicular)	
Dulbecco's Medium/Nutrient GlutaMAX*	Modified Mixture	Eagle com F-12	Minimum Essential Medium Alpha Medium *	
20% de soro fetal bovino*			10 $\mu\text{l}$ de insulina-transferrina-selênio*	
1% de penicilina (100.000UI/mL) e estreptomicina (10.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*			0,0285g de hipoxantina**	
1% de L-glutamina (2 $\mu\text{M}$ )*			0,1250g de albumina do soro bovino**	
1% de aminoácidos não essenciais*				

\*Adquiridos da Gibco

\*\*Adquiridos da Sigma

#### *Ensaio de unidade formadora de colônia fibroblastóide (UFC-F)*

Células em quarta passagem foram separadas em grupos e cultivadas em placas na concentração de  $10^4$  células/mL, cada grupo recebeu o tratamento correspondente. As culturas foram monitoradas e expandidas, até a identificação de agrupamentos celulares de, no mínimo, 20 células aderentes, com morfologia homogênea fusiforme ou fibroblastóide. As células foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado, por 30 minutos e coradas com Giemsa.

### *Ensaio de diferenciação celular*

Para cada diferenciação as amostras foram cultivadas em placas de seis poços, ao atingirem 75% de confluência os meios de cultivos foram substituídos pelos meios de indução de diferenciação específicos seguindo-se as instruções dos fabricantes. Para a diferenciação adipogênica, empregou-se o StemPro Adipogenesis Kit (Gibco, USA). As trocas de meio foram realizadas a cada 72 horas por 14 dias, seguidas de avaliação da diferenciação após fixação das células em formol tamponado por 30 minutos, lavagens com PBS e água destilada, coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich,USA) por 50 minutos e novamente lavagens com água destilada. As gotículas de lipídeo intracitoplasmático, corados em vermelho foram visualizadas sob microscopia de luz invertida. Já para diferenciação osteogênica utilizou-se o StemPro Osteogenesis Kit (Gibco, USA). Foram realizadas trocas de meio a cada 72 horas por 21 dias. Para a avaliação da diferenciação, as células foram fixadas em formal tamponado por 30 minutos, lavadas com água destilada e cobertas com a coloração Alizarin Red 2% pH 4,2 (Sigma-Aldrich, USA) por 3 minutos, lavadas com água destilada e analisadas sob microscopia de luz invertida para observação de depósitos de matriz de cálcio, corados em vermelho.

Para a diferenciação condrogênica, substituiu-se o meio de cultivo pelo StemPro Chondrogenesis Kit (Gibco, USA), com trocas a cada 72 horas por 14 dias, e então as células foram fixadas em formol tamponado e corados com Alcian Blue e Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich,USA).

Os botões celulares formados durante os ensaios de diferenciação foram fixados e incluídos em parafina processados por técnica histológica de rotina e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE), visualizadas por microscopia de luz para avaliação da morfologia, presença de nódulos celulares entremeados por uma matriz extracelular de glicosaminoglicanos.

### *Ensaio de cinética celular sob curva de crescimento por saturação*

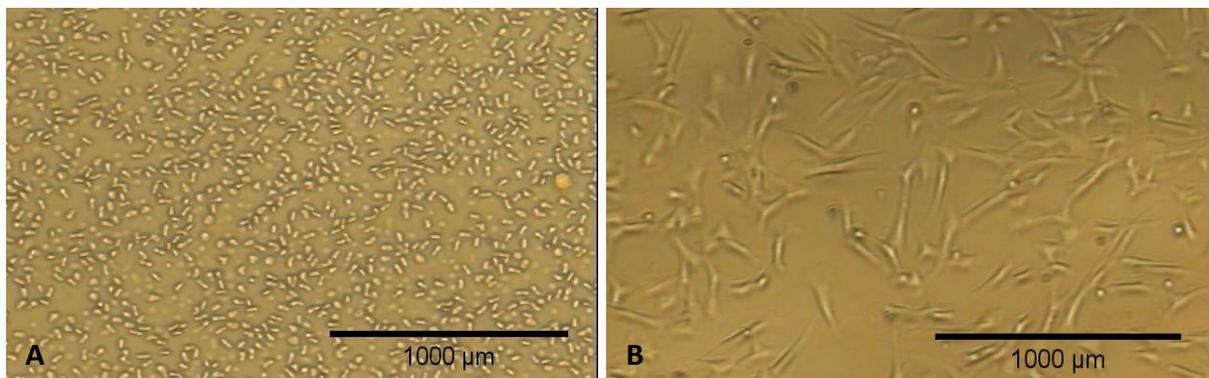
As células em quarta passagem, na concentração de  $3,5 \times 10^3$  células/poço foram semeadas em placas de 12 poços. A curva foi realizada no intervalo de 21, a cada 24 horas uma placa foi selecionada aleatoriamente, tripsinizada, contada e avaliada quanto a viabilidade pelo método do azul de tripan em câmara de Neubauer em microscópio óptico, conforme ARGOLO NETO et al. (2016).

### Análise estatística

Foi utilizado a análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. O programa Vassar Stats utilizado para a realização dos cálculos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos utilizados para isolamento, cultivo e expansão das CTMMO foram eficientes e permitiram a manutenção das culturas até a terceira passagem em garrafas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> com concentração média de 0,8x10<sup>6</sup> células/mL. Nas primeiras 24 horas, observou-se uma cultura heterogênea, composta por células mesenquimais aderidas, células mononucleares e hemácias em suspensão com ilustrado na Figura 1A. As células atingiram confluência de 80% após seis dias de cultivo. As CTMMO apresentaram morfologia alongada, fusiforme, semelhante à morfologia de fibroblastos como na Figura. 1B. A viabilidade celular média observada foi acima de 90%., a punção de 10 mL obtidos da medula óssea de um caprino foi suficiente para proporcionar uma boa expansão celular *in vitro*. Provavelmente, isso ocorreu pela capacidade clonogênica e de aderência a substrato plástico das CTM, observadas também por MONTEIRO et al. (2009) e ARGÔLO NETO et al. (2016).



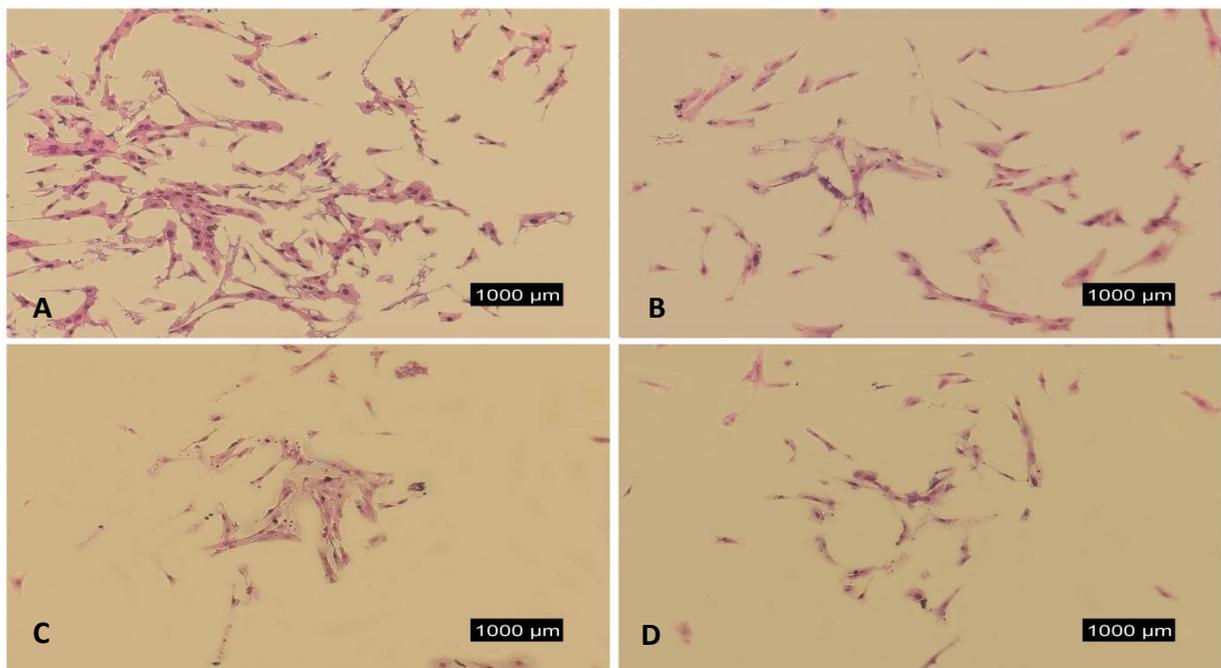
**Figura 1** - CTMMO de caprino. (A) Isolamento após 24h, poucas células mesenquimais aderidas e células mononucleares e hemácias em suspensão; (B) Células em formato fibroblastóide, com confluência celular de 65%.

O isolamento das CTMMO evidenciou um rendimento médio de 4,74 x 10<sup>6</sup> células/mL. A média celular obtida foi ligeiramente superior a 4,6x10<sup>6</sup> células/mL verificada por SILVA FILHO et al. (2014) para isolamento de CTMMO da tíbia de caprinos. Um estudo contemporâneo em catetos (ARGÔLO NETO et al., 2016) relatou concentração média similar, com 4,7x10<sup>6</sup> células/mL isoladas. Contudo, em felinos domésticos (MACIEL et al., 2014) e coelhos (ELEOTÉRIO et al., 2016) foram obtidas concentrações médias de 12,29x10<sup>6</sup>

e  $5,86 \times 10^6$  células/mL, respectivamente, após o isolamento. Tais observações suscitam a tese de que o peso e porte físico não são determinantes para a obtenção de grandes concentrações de CTM derivadas da medula óssea.

O ensaio de CFU-F é empregado para afirmar a clonogenicidade, capacidade de originar células-tronco iguais (SEDGLEY E BOTERO, 2012). Essa habilidade é resultado da divisão simétrica, na qual uma célula gera duas células-filhas idênticas à célula-mãe (YADLAPALLI e YAMASHITA, 2013).

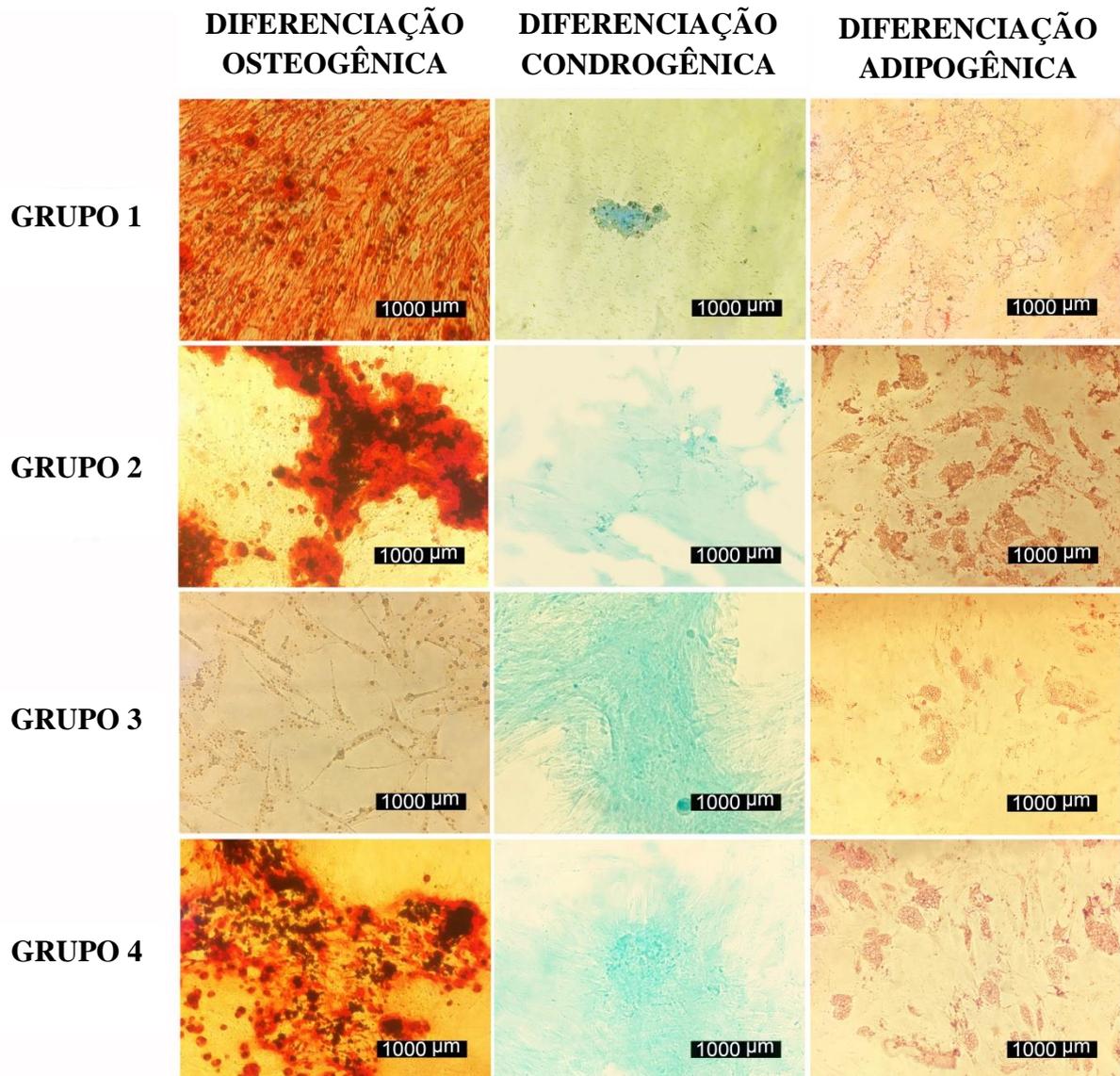
A capacidade de formar colônias foi observada nos quatro grupos. As células conservaram característica fibroblastóide e apresentaram crescimento radial, com tendência à coalescência entre as colônias e organização de monocamada celular ilustrado na Figura 2. Os grupos experimentais exibiram colônias heterogêneas quanto ao diâmetro e baixa densidade celular (menos de 50 células), compostas por células morfologicamente homogêneas.



**Figura 2** - Ensaio de unidade formadora de colônias fibroblastóides de CTMMO de caprino. (A) Grupo 1 (Controle); (B) Grupo 2 (CTMMO em 70% do MEIO 1 e 30% do MEIO 2); (C) Grupo 3 (CTMMO em 50% do MEIO 1 e 50% do MEIO 2); (D) Grupo 4 (CTMMO em 30% do MEIO 1 e 70% do MEIO 2).

Quanto à diferenciação osteogênica, observou-se, em todos os grupos, mudanças morfológicas progressivas a partir do 10º dia em cultivo, como maior relação núcleo: citoplasma, aspecto celular cuboide e núcleo central esférico. Após 18 dias de cultivo, as células adquiriram arquitetura análoga a osteoblastos, com bordas citoplasmáticas irregulares, formação de prolongamentos celulares e aparência achatada. A coloração com Alizarin Red

identificou a produção de cristais de cálcio no interior das células, corados em vermelho, núcleos em tonalidade vermelho e citoplasmas bem definidos e mais basofílicos demonstrado na Figura 3.

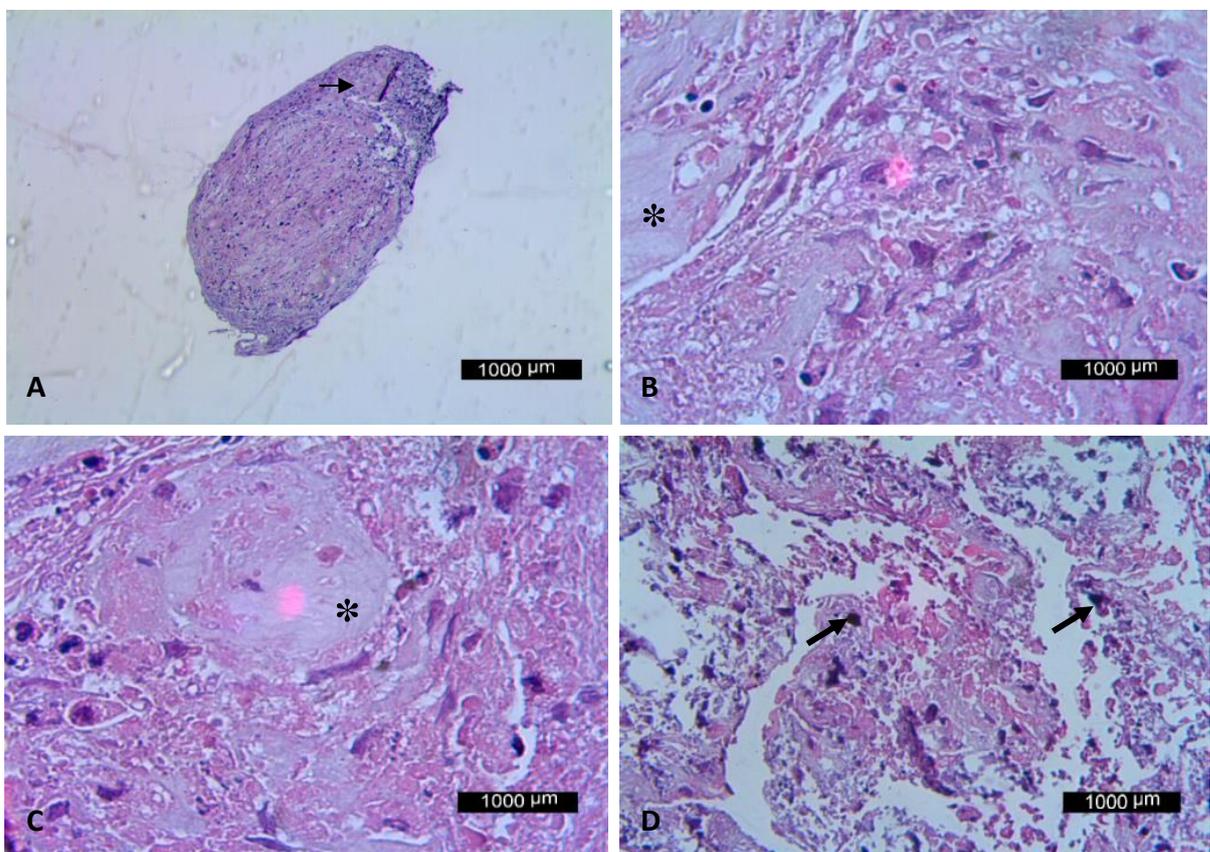


**Figura 3** - Ensaio de diferenciação celular de CTMMO de caprino. Diferenciação osteogênica avaliada com Alizarin Red, grupos 1, 2, 3 e 4. Diferenciação condrogênica comprovada com Alcian Blue, grupo 1, grupos 2, 3 e 4,. Diferenciação adipogênica evidenciada com Oil Red, grupos 1, 2, 3 e 4.

As culturas submetidas à diferenciação condrogênica, apresentaram transformações morfológicas gradativas a partir do sétimo dia em cultivo, com alteração para formato cuboide, em todos os grupos deste experimento. Após a coloração com Alcian Blue, observou-se células coradas em azul devido a presença de glicosaminoglicanos ilustrado na Figura 3.

Em todos os grupos celulares a diferenciação adipogênica indicou modificações a partir do nono dia de cultivo apresentando-se com formato hexagonal irregular e com grânulos citoplasmáticos birrefringentes. Quando coradas com Oil Red, identificou-se no citoplasma, aglomeração de gotículas lipídicas, de coloração vermelho-acastanhado (Figura 3).

Durante a realização do ensaio de diferenciação condrogênica, houve formação de botão celular nas culturas dos grupos 2, 3 e 4. A análise histológica evidenciou material amorfo fracamente basofílico sugestivo de matriz extracelular relacionada à cartilagem (Figuras 4A, B e C). O botão celular do grupo 3 foi dissolvido durante o processamento histológico.



**Figura 4.** Histologia dos botões celulares. Diferenciação condrogênica. (A) HE; (B e C) material amorfo fracamente basofílico sugestivo de matriz extracelular (\*). Diferenciação osteogênica. (D) material sugestivo de mineralização ( → HE).

No ensaio de diferenciação osteogênica também foi observado no grupo 3, formação de botão celular de formato esférico. O qual demonstrou material sugestivo de nódulos de mineralização na análise histológica, corados pela técnica de HE (Figura 4D).

Avaliando o comportamento das CTMMO nos diferentes meios de cultivo (Tabela 2), os grupos 1, 2, 3 e 4 apresentaram curva de crescimento com média de  $83,1 \times 10^3 \pm 13,5$ ;

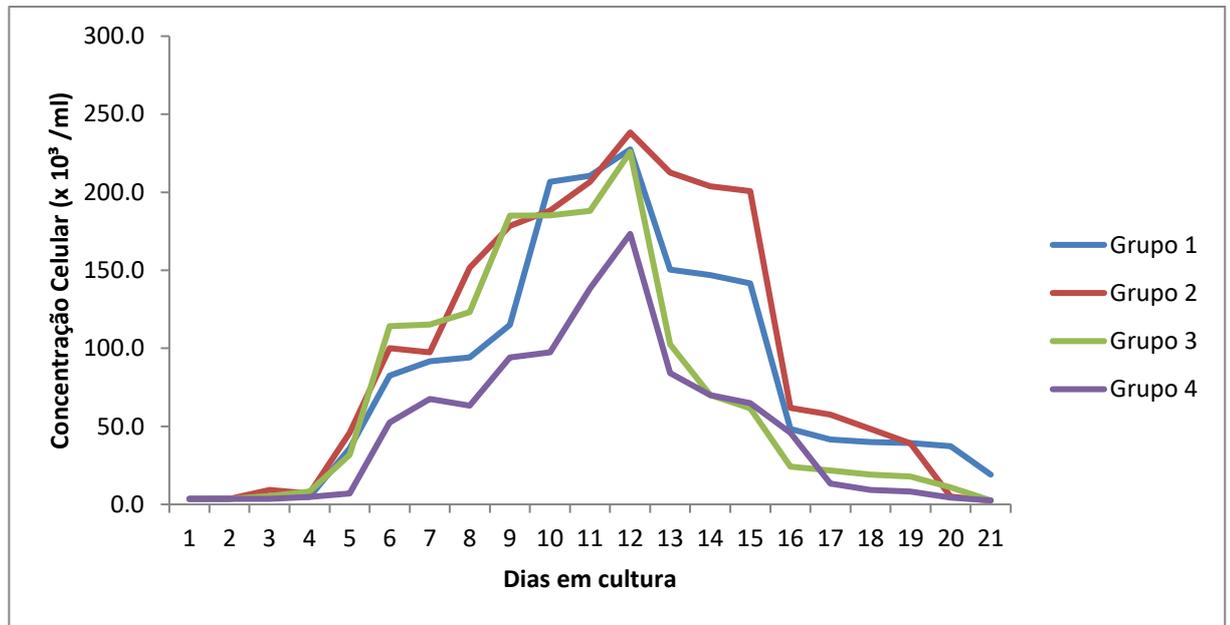
$98,2 \times 10^3 \pm 13,1$ ;  $72,4 \times 10^3 \pm 14,1$  e  $48,2 \times 10^3 \pm 13,0$  células/mL por poço, respectivamente, ao longo de 21 dias de cultivo (Tabela 2). Contudo, houve diferença estatística a 5% apenas para os tratamentos aplicados entre os grupos 1 e 4, 2 e 3, e 3 e 4.

**Tabela 2** Descrição do crescimento médio e desvio-padrão de CTMMO cultivadas em quatro diferentes meios, durante 21 dias, demonstrando, a média de crescimento celular e o desvio-padrão.

DIAS	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3		GRUPO 4	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
1	3,5	± 0,0	3,5	± 0,0	3,5	± 0,0	3,5	± 0,0
2	3,7	± 0,9	3,5	± 0,0	3,5	± 0,0	3,5	± 0,0
3	4,8	± 1,8	9,3	± 5,1	5,3	± 1,4	3,5	± 0,0
4	4,8	± 1,8	7,0	± 2,3	8,3	± 2,8	4,8	± 1,8
5	35,8	± 11,1	45,8	± 24,4	31,7	± 12,8	7,0	± 1,3
6	82,5	± 30,0	100,0	± 28,3	114,2	± 8,9	52,5	± 16,7
7	91,7	± 6,1	97,5	± 16,7	115,2	± 8,2	67,5	± 45,0
8	94,2	± 1,1	151,7	± 22,2	123,3	± 8,2	63,3	± 5,6
9	115,0	± 13,3	178,3	± 16,1	185,0	± 30,0	94,2	± 29,4
10	206,6	± 63,9	188,3	± 15,6	185,3	± 35,7	97,5	± 21,7
11	210,5	± 28,0	206,7	± 33,9	188,0	± 13,3	138,3	± 29,4
12	227,5	± 25,0	238,3	± 34,4	225,8	± 106,1	173,3	± 38,9
13	150,3	± 10,4	212,5	± 20,0	102,5	± 18,3	84,2	± 3,8
14	146,8	± 11,2	203,8	± 9,4	70,0	± 8,7	70,0	± 16,7
15	141,7	± 48,9	200,7	± 11,5	61,7	± 18,9	65,0	± 23,3
16	48,3	± 11,1	61,8	± 4,4	24,2	± 2,8	45,8	± 26,1
17	41,7	± 4,6	57,5	± 15,0	21,7	± 11,1	13,3	± 1,1
18	40,0	± 1,3	48,3	± 7,6	19,2	± 5,6	9,2	± 6,1
19	39,3	± 3,8	39,2	± 6,1	17,8	± 2,1	8,3	± 4,4
20	37,3	± 4,2	5,0	± 1,0	10,8	± 1,1	4,3	± 0,4
21	19,2	± 5,6	2,5	± 0,3	2,5	± 0,2	2,5	± 0,2
	83,1	13,5	98,2	13,1	72,4	14,1	48,2	13,0

As culturas ascenderam lentamente até o quarto dia de observação, quando as concentrações aumentaram progressivamente até o 12º dia. Antes de atingirem o ponto de saturação os grupos indicaram intervalos de crescimento mais acelerado: grupo 1 entre 4º e 6º dia e entre 9º e 10º dia, grupo 2 entre 4º e 6º dia com a ressalva de ponto de inflexão logo em

seguida, grupo 3 entre 4° e 6° dia, 8° e 9° dia e entre 11° e 12° dia, e grupo 4 entre 5° e 6° dia e entre 10° e 12° dia. Após saturação as concentrações celulares diminuíram de forma abrupta entre 12° e 13° dia e 15° e 16° dia no grupo 1, 15° e 16° dia no grupo 2, 12° e 13° dia no grupo 3 e 12° e 13° dia para o grupo 4, com diminuição gradual até o 21° dia (Figura 5).



**Figura 5** - Representação gráfica da cinética de crescimento de CTMMO de caprino cultivadas em quatro diferentes meios, durante 21 dias.

O desempenho das CTMMO em curva de crescimento, observado no presente estudo para os quatro grupos, revelou uma fase *lag* curta, seguida de um crescimento exponencial na fase *log* e finalizado pela fase de declínio ou morte (Figura 5). Este comportamento diverge da maioria dos perfis de curvas de crescimento celular, uma vez que não relata a fase estacionária ou *plateau*. Entretanto, corresponde ao descrito por SILVA FILHO et al. (2014) para medula óssea de caprino. Resultados similares também foram descritos em cutia (CARVALHO et al., 2015) e cateto (ARGÔLO NETO et al., 2016). Permanecem desconhecidas as causas de tais diferenças entre as espécies.

O intervalo de tempo para cada fase está diretamente relacionado com as condições de cultivo celular, como também pela habilidade de adaptação da célula (URIO et al., 2010). Estes princípios podem justificar a diferença quanto ao período de duração na fase *lag* apresentada pelo grupo 4 em relação aos demais. SUN et al. (2010) observou que esta fase também apresenta maior duração quando as culturas são iniciadas em baixas densidades celulares, o que é indesejável. A exaustão de nutrientes ou confluência da área de cultivo após a fase *log* pode ser a causa provável do declínio da curva.

Quando se comparou o crescimento celular médio nos diferentes grupos, constatou-se que este foi significativamente igual tanto quando utilizado 100% de meio de CTM, quando na redução para 70% do meio de cultivo de CTM com acréscimo de 30% de meio de cultivo folicular, tratamentos empregados nos grupos 1 e 2, respectivamente. O desempenho celular diminuiu com a associação de 50% de cada um dos meios, grupo 3 e foi menor com a associação de 30% do meio de cultivo de CTM a 70% de meio de cultivo folicular, grupo 4. O que permite supor que os tratamentos utilizados nos grupos 1 e 2 são os mais recomendáveis e os utilizados no 3 e 4 são desaconselháveis.

A aderência ao plástico, morfologia fusiforme ou fibroblastóide e capacidade de diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito *in vitro*, comprovaram a linhagem de indiferenciação e plasticidade destas células. Estes dados corroboram com os parâmetros definidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para classificação de populações de CTM (DOMINICI et al., 2006). Esses parâmetros também foram observados em estudos realizados na espécie equina (DE VITA et al., 2013) e caprinas (SILVA, 2016).

## CONCLUSÃO

Os achados determinaram que a associação entre o meio de cultivo padrão para células-tronco e o meio de cultivo de folículos ovarianos na concentração de 70%/30% foi a que proporcionou crescimento celular consideravelmente similar ao encontrado no cultivo com o controle. Assim, dentre os tratamentos testados o utilizado no grupo 2 apresentou o melhor resultado quanto à cinética de CTM caprinas. Além disso, as diferentes concentrações entre os dois meios foram capazes de manter a clonogenicidade das células, assim como a plasticidade celular, sendo a última demonstrada pelas diferenciações osteogênica, adipogênica e condrogênica.

## DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

We have no conflict of interest to declare.

## REFERÊNCIAS

ARGÔLO NETO et al., 2016. Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Scientiae Veterinariae*. v.44, n.1, p.1-11. Available from: <http://www.ufrgs.br/actavet/44/PUB%201341.pdf>. Accessed Jul 20, 2018.

BRUNNER, D. et al., 2010. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*. v.27, n.1, p.53-62. Available from: [http://www.altex.ch/resources/altex\\_2010\\_1\\_53\\_62\\_Brunner.pdf](http://www.altex.ch/resources/altex_2010_1_53_62_Brunner.pdf). Accessed Jul 20, 2018. doi: 10.14573/altex.2010.1.53.

CABRAL, R.M et al., 2012. Kidney injury and cell therapy: Preclinical study. **Microscopy Research and Technique**. v.75, p. 566-570. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jemt.21092>. Accessed: Jul 20, 2018. doi: [10.1002/jemt.21092](https://doi.org/10.1002/jemt.21092).

CARVALHO, Y.K.P et al., 2015. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.35, n.6, p.590-598. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v35n6/1678-5150-pvb-35-06-00590.pdf>. Accessed: Jul 20, 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2015000600018.

DE VITA et al., 2013. Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33 n.4 p.535-542. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33n4/v33n4a19.pdf>. Accessed: Jul 20, 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2013000400019.

DIAS, R.P. et al. 2016. Potential for in vitro mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 36, 79-88. Available from: < <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v36s1/1678-5150-pvb-36-s1-00079.pdf> >. Accessed: Jul 20, 2018. doi:10.1590/S0100-736X2016001300012.

DOMINICI, M.L et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotential mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**. v.8 n.4 p.315-317. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324906708817?via%3DIhub>. Accessed: Jun 18, 2018. doi: 10.1080/14653240600855905.

ELEOTÉRIO, R.B et al., 2016. Isolation, expansion and differentiation of mesenchymal stromal cells from rabbits' bone marrow. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.36, n.5, p.423-430. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v36n5/1678-5150-pvb-36-05-00423.pdf>. Accessed: May 25 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2016000500012.

MACIEL, B.B et al., 2014. Morphology and morphometry of feline bone marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.11, p.1127-1134. Available from <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v34n11/a16v34n11.pdf>. Accessed: May 25 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2014001100016.

MONTEIRO, B.S et al., 2010. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**. v.40, n.1, p.238-245. Available from <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v34n11/a16v34n11.pdf>. Accessed: May 17 2018. doi: 10.1590/S0103-84782010000100040.

PALL, E et al., 2016. Isolation and Functional Characterization of Equine Adipos Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**. 10, 412-416. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2210784316302765>. Accessed: May 17 2018. doi: 10.1016/j.aaspro.2016.09.083.

PESSOA, G.T et al., 2014. Isolation, culture and differentiation potencial of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells. **Acta Scientiae Veterinaria**. v.42, n.1, p.1-10. Available from < <http://www.ufrgs.br/actavet/42/PUB%201233.pdf>>. Accessed: May 17 2018.

RIBEIRO, G et al., 2013. Culture of equine bone marrow mononuclear fraction and adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells in different media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.33, n.1, p.20-24. Available from < <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33s1/04.pdf>>. Accessed: Jul 20 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2013001300004.

RUSSELL, K.A. et al., 2016. Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue-and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS One**. v.11, n.12, e.0167442. Available from < <http://www.scielo.br/pdf/pvb/v33s1/04.pdf>>. Accessed: jul 20 2018. doi: 10.1590/S0100-736X2013001300004.

SEDGLEY, C.M., BOTERO, T.M., 2012. Dental stems cell and their source. **Dental Clinic North America**. v.56, n.3, p.549-561. Available from < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011853212000365?via%3Dihub>>. Accessed: Jul 18 2018. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.004.

SILVA FILHO, et al., 2014. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. **Acta Cirúrgica Veterinária**. v.29, n.8, p.478-484. Available from <

<http://www.scielo.br/pdf/acb/v29n8/0102-8650-acb-29-08-00478.pdf> >. Accessed: jul 18 2018. doi: 10.1590/S0102-86502014000800001.

SILVA, G.C. **Células-tronco da geleia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (Capra hircus): Protocolos de isolamento e caracterização**. 2016. 49p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí.

SUN, L. et al., 2010. Cell proliferations of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potencial. **Cell Proliferation**. 43, 445-456. Available from < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2184.2010.00694.x>>. Accessed: Jul 20 2018. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00694.x.

URIO, M., MEZZALIRA, N.K.J.C., OHLWEILER, L.U., MEZZALIRA, A., 2010. Análise da curva de crescimento de fibroblastos com ou sem prévia exposição ao meio empregado no cultivo de embriões. Anais do Salão Internacional de Ensino, **Pesquisa e Extensão**, 2010. v. 2, n. 1. 2010.

YADLAPALLI, S., YAMASHITA, Y.M., 2013. Chromosome-specific nonrandom sister chromatid segregation during stem-cell division. **Nature**. Jun v.13, n.498, p.251-254. Available from <https://www.nature.com/articles/nature12106>. Accessed: Jul 12, 2018. doi: 10.1038/nature12106.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nossos achados inferem que as diferentes associações de meio de cultivo de CTM com meio folicular foram capazes de manter a clonogenicidade das células, assim como a plasticidade celular. Contudo, apesar da capacidade adaptativa das CTM caprinas ao co-cultivo com outra linhagem celular, há um limite da composição do meio específico para estas células que favorecem o seu desenvolvimento. Portanto, é necessário mais pesquisas e investimentos no desenvolvimento de meios de cultivos e suplementos, para ampliação da viabilidade e cinética celular em sistemas de co-cultivo.

## REFERÊNCIAS

- AFANASYEV, B. V. *et al.* AJ Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. **Cell Ther Transplant**, v. 1, p. 35-38, 2010.
- ALVES, A.; MUOTRI, A. R. **Simple assim: células-tronco**. São Paulo: Atheneu, 2014.
- ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v. 20, n. 04, p. 379-388, 2012.
- ARAÚJO, J. D. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 4, p.357-365, 2005.
- ARGÔLO NETO, N. M. *et al.* Isolation, expansion, differentiation and growth kinetics essay in mesenchymal stem cells culture from the bone marrow of collared peccaries (*Tayassu tajacu*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 884-894, 2010.
- BAIN, B. J; CLARK, D. M.; WILKINS, B. S. Chapter 1: The Normal Bone Marrow. In: John Wiley & Sons. **Bone Marrow Pathology**. 4 th Ed. 2011.
- BARREIRA, A. P. B. *et al.* Punção aspirativa de medula óssea em equinos adultos para obtenção de células-tronco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 56-59, 2008.
- BASCIANO, L. *et al.* Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC cell biology**, v. 12, n. 1, p. 12, 2011.
- BECK, B.; BLANPAIN, C. Mechanisms regulating epidermal stem cells. **The EMBO journal**, v. 31, n. 9, p. 2067-2075, 2012.
- BIANCO, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

- BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN J. M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell**, v. 105, n. 7, p.829-841, 2001.
- BRUNNER, D. *et al.* Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, n. 1, p. 53, 2010.
- BÜSCHER, D.; DELGADO, M.; GONZALEZ-REY, E. Uses of mesenchymal stem cells. U.S. Patent Application 13/057,467, 2009.
- BYDŁOWSKI, S. P. *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n. supl 1, p. 25-35, 2009.
- CABRAL, R. M. *et al.* Kidney injury and cell therapy: **Preclinical study. Microscopy Research and Technique (Print)**, v. 75, p. 566-570, 2012.
- CARVALHO, Y. K. P. *et al.* Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 590-598, 2015.
- COLVILLE, T. **Anatomia e fisiologia clínica para medicina veterinária**. Elsevier Health Sciences, 2011.
- COSTA, Clautina Ribeiro de Moraes da. **Ensaio Clínico com células-tronco derivadas do tecido adiposo na reparação da glândula mamária de caprinos com mastite**. Teresina, Piauí: 2015, 107p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí.
- COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. Pesquisa com células-tronco: aspectos científicos, éticos e sociais. **Instituto Fernando Henrique Cardoso**, São Paulo, nov, 2004.
- DAHLGREN, L. A. Stem cell therapy. In: ROBINSON, N. E.; SPRAYBERRY, K. A. **Current therapy in equine medicine**. 6<sup>a</sup> ed. St. Louis: Saunders; 2009. p. 908-11.
- DEL COLLADO, M. *et al.* Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação in vitro de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 689-694, 2014.
- DIAS, R. P. *et al.* Potential for in vitro mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 79-88, 2016.

DING, D. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. **Cell transplantation**, v. 24, n. 3, p. 339-347, 2015.

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

FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types**. John Wiley & Sons, Inc., 2005.

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Experimental hematology**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1973.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 102, 2003.

FORTIER, L. A; TRAVIS, A. J. As células-tronco na medicina veterinária. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 2, n. 9, p.1-5, 2011.

HADARI, K.; SALEHNIA, M.; VALOJERDI, M. R. The effect of leukemia inhibitory factor and coculture on the in vitro maturation and ultrastructure of vitrified and non-vitrified isolated mouse preantral follicles. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 6, p. 2389-2397, 2008.

HAIJALIZADEH, N. *et al.* The development of mouse early embryos in vitro in fibroblasts and cumulus cells co-cultures supplemented with retinoic acid. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2008.

HUMPHREYS, B. D. *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 284-291, 2008.

ISAAC, C. *et al.* Replacement of fetal calf serum by human serum as supplementation for human fibroblast culture. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 3, p. 379-384, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524 p.

KATHELEEN, P. F. Bone marrow evaluation. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Wiley-Blackwell, p. 29-32, 2000.

- KOŹLIK, M.; WÓJCICKI, P. The use of stem cells in plastic and reconstructive surgery. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1011-1017, 2014.
- KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 9 ed. Elsevier Brasil, 2015.
- LATIMER, K. S.; ANDREASE, C. B. Bone marrow. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2<sup>a</sup> ed. St. Louis: Mosby; 2002. p. 217-26.
- LEE, M. S. *et al.* The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 6, p. 1264-1268, 2005.
- LIMA, S. A. F. *et al.* Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 463-469, 2012.
- LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 2, p. 269-291, 2011.
- MAO, J. *et al.* Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1197-1203, 2002.
- MAYHALL, E. A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L. I. The clinical potential of stem cells. **Curr Opin Cell Biol**, v.16, n.6, p.713-720, 2004.
- MEIRELLES, L. S., CHAGASTELLES, P. C., NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.
- MONCLARO, A. V. *et al.* Meio de cultura celular: uma revisão. **Materials and Methods Ppt**, 2016.
- MORAES, A. M.; MENDONÇA, R. Z.; SUAZO, C. A. T. Meios de Cultura para Células Animais. In: MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos a terapia gênica**. 1 ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.

MOTA, A. C. A.; SOARES, M. P. B.; SANTOS, R. R. Uso de terapia regenerativa com células-tronco da medula óssea em doenças cardiovasculares - perspectiva do hematologista. **Rev. Bras. Hematol. Hemoterapia**, v.27, p.126-132, 2005.

NARDI, N. B. Células-tronco: fatos, ficção e futuro. **Genética na escola**, v. 2, p. 25-9, 2007.

NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, n. 1 suppl, p. S17-S20, 2001.

OTSUKI, J. *et al.* The influence of the redox state of follicular fluid albumin on the viability of aspirated human oocytes. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 58, n. 3, p. 149-153, 2012.

PALL, E. *et al.* Isolation and Functional Characterization of Equine Adipos Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 412-416, 2016.

PARÉ, J.; SHERLEY, J. L. Culture environment-induced pluripotency of SACK-expanded tissue stem cells. **Bio Med Research International**, 2011.

PEREZ-SERRANO, R. M. *et al.* Mesenchymal stem cells: biology, characterization and future applications to animal health and livestock production. Part I. **Agrociencia (Montecillo)**, v. 46, n. 4, p. 371-382, 2012.

PESSOA, G. T. *et al.* Isolation, culture and differentiation potencial of collared peccary (*Tayassu tajacu*) adipose-derived stem cells. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-10, 2014.

RAMESH, H. S. *et al.* **Reprod Domest Anim**; v. 43, n. 5, p. 520-524, 2008.

RIBEIRO, G.; MASSOCO, C. O.; LACERDA NETO, J. C. Culture of equine bone marrow mononuclear fraction and adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells in different media. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 20-24, 2013.

ROBINTON, D. A.; DALEY, G. Q. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 295, 2012.

ROCHA, Andressa Rêgo da. **Roedor silvestre como fonte de células-tronco: caracterização e multipotencialidade de células-tronco mesenquimais estromais e**

**adiposas de cutias (*Dasyprocta prymnolopha*)**. Teresina, Piauí: 2015, 88p. (Tese de Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.

RUSSELL, K. A. *et al.* Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue-and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. e0167442, 2016.

SILVA, Gustavo Cardoso da. **Células-tronco da geleia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (*Capra hircus*): Protocolos de isolamento e caracterização**. 40 Teresina, Piauí: 2016, 49p. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí.

SILVA, G. M. *et al.* Ascorbic acid improves the survival and in vitro growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, J. R. V. *et al.* Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **J. Endocrinol.** v. 183, p.405–415, 2004.

SILVA FILHO, O. F. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 478-484, 2014.

SISON, E. A. R.; BROWN, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. **Expert review of hematology**, v. 4, n. 3, p. 271-283, 2011.

SOUZA, L. C. G. *et al.* A comparação entre o transplante de células-tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Braz. J. Cardiovascular Surg.**, v.20, p.270-278, 2005.

SUGIYAMA, T.; NAGASAWA, T. Bone marrow niches for hematopoietic stem cells and immune cells. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v. 11, n. 3, p. 201-206, 2012.

TAYLOR, S. E.; CLEGG, P. D. Collection and propagation methods for mesenchymal stromal cells. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 27, p. 243-61, 2011.

USTA, S. N. *et al.* Chemically defined serum-free and xeno-free media for multiple cell lineages. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 10, 2014.

VAN DER VALK, J. *et al.* Optimization of chemically defined cell culture media—replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053-1063, 2010.

WU, M. F. *et al.* O efeito inibitório dependente do estágio de células foliculares porcinas no desenvolvimento de folículos pré-antrais. **Anim Reprod Sci**, v.73, (1-2), p. 73-88, 2002.

YEN, B. L. *et al.* Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.