



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

RONALDO PEREIRA DIAS

**CÉLULAS MULTIPOTENTES DA GELEIA DE WHARTON DE CORDÕES
UMBILICAIS OVINOS: UMA FERRAMENTA PARA O CULTIVO,
DIAGNÓSTICO, REPLICAÇÃO VIRAL E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE
LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.**

FORTALEZA - CEARÁ

2016

RONALDO PEREIRA DIAS

CÉLULAS MULTIPOTENTES DA GELEIA DE WHARTON DE CORDÕES
UMBILICAIS OVINOS: UMA FERRAMENTA PARA O CULTIVO,
DIAGNÓSTICO, REPLICAÇÃO VIRAL E PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE
LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e sanidade animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

FORTALEZA - CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Dias, Ronaldo Pereira.

Células multipotentes da geleia de Wharton de cordões umbilicais ovinos: uma ferramenta para o cultivo, diagnóstico, replicação viral e produção de antígenos de lentivírus de pequenos ruminantes. [recurso eletrônico] / Ronaldo Pereira Dias. - 2016. 1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 110 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2016. Área de concentração: Reprodução e sanidade animal. Orientação: Prof.^a Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira.

Coorientação: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

1. Cultivo de células. 2. Multipotente. 3. Permissividade. 4. Lentivírus. 5. Produção de Antígeno. I. Título.


RONALDO PEREIRA DIAS

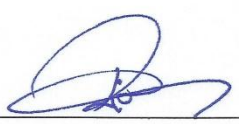
CÉLULAS MULTIPOTENTES DA GELEIA DE WHARTON DE
CORDÕES UMBILICAIS OVINOS: UMA FERRAMENTA PARA O
CULTIVO, DIAGNÓSTICO, REPLICAÇÃO VIRAL E PRODUÇÃO DE
ANTÍGENOS DE LENTIVÍRUS DE PEQUENOS RUMINANTES.

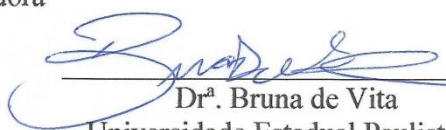
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

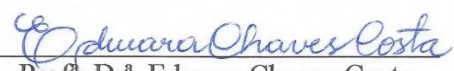
Aprovada em: 12/12/2016.

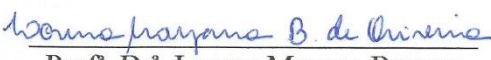
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Orientadora


Prof.^o Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Empresa Brasileira de Pesquisa
Agropecuária – EMBRAPA
Co-orientador


Dr.^a. Bruna de Vita
Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho - UNESP
Examinadora


Prof.^a. Dr.^a. Edmara Chaves Costa
Universidade da Integração Internacional
da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB
Examinadora


Prof.^a. Dr.^a. Lorena Mayana Beserra
Universidade Estadual do Ceará
- UECE
Examinadora

Dedico a minha família, em especial
minha esposa Élide e minha filha Lia,
minha motivação e razão em todos os
momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), da Faculdade de Veterinária (FAVET), da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pela disponibilização de suas instalações para a conclusão desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Maria Fátima da Silva Teixeira, por sempre fazer do ambiente de trabalho e convívio uma família, por me deixar voar nas asas da pesquisa sob o seu olhar atento, por me motivar sempre quando eu queria desistir diante dos fortes ventos, pela sua educação e atenção diários e pelo zelo e amor que me ensinou a ter em tudo o que faz.

Ao Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro, pesquisador da EMBRAPA, por ter acreditado em mim e aberto às portas para o mundo da virologia durante a graduação, por me fazer ousar sair do ninho no mestrado e por me receber de braços abertos e com a mesma empolgação de sempre no doutorado, ajudando-me a concluir este ciclo num momento de quase esgotamento.

Ao Prof^o Msc. Anderson Carvalho de Farias, pois através da sua amizade e verdadeira irmandade esteve solidariamente ao meu lado nas etapas iniciais deste trabalho, aguardando pacientemente comigo cada parto natural sob o sol escaldante ou mesmo transportando as amostras na moto enquanto eu guiava até o laboratório durante a noite e sob forte chuva.

À Prof^a. Dr^a. Edmara Chaves Costa, pela sua dedicação e disponibilidade em aceitar o desafio de engrandecer os resultados deste trabalho com a sua visão estatística.

Aos amigos nascidos em laboratório Dalva Alana (minha discípula), Ana Lúcia e Laninha, que com todo apoio engrandeceram este trabalho apresentando igual zelo, como se fossem uma só pessoa, nas etapas de processamento juntamente comigo.

Aos membros do Labovir, família escolhida por Deus para me ensinar tantas coisas, para me fazer viver quatro anos bastante intensos, para me ajudar a extrair o melhor de Deus em mim. Agradeço à Dávila, Gabrielle, Rebeca, Rosivaldo, Kelma, Bergson, Antoniel, Paloma, Mariana, Juliana, Lívia e Mayara, cada um com sua importância singular.

Aos funcionários da EMBRAPA Caprinos e Ovinos João Ricardo, Osmarilda, Jamille, Felipe, Nobrega e bolsistas Edgar, Davi e Vanderlan pela receptividade amigável de sempre e contribuições técnicas sempre que necessário.

À minha esposa Élide, pessoa mais preciosa de minha vida, casada comigo para sempre desde o primeiro ano de doutorado, suas marcas estão em cada linha e resultado. A primeira que sabia de cada avanço ao fim do dia, mesmo sem entender tanto do assunto. Aquela que me presenteou com uma linda filha, me dando assim mais um grande motivo para prosseguir, a Lia. Obrigado por estar ao meu lado com amor e paciência.

Aos meus pais, Carlos Alberto da Silva Dias e Maria do Socorro Pereira Dias, por serem tão presentes em minha vida, por me sustentarem com o seu amor e cuidado únicos de pai e de mãe, por serem meus exemplos de dedicação e persistência.

Aos meus discipuladores Ananias Vasconcelos e Camila Vasconcelos, por serem as ferramentas que Deus tem usado para me fazer viver toda a plenitude de Cristo. Somam-se as horas de desabafos, aconselhamentos, estudos da Palavra, orações, amizade, cultos, TADEIS, juntamente com toda família Frutificação. Não poderia terminar esse doutorado em uma família melhor.

A Deus por sempre abrir as portas que ninguém fecha, por me fazer ultrapassar meus limites, por me cercar de tantas pessoas maravilhosas e por me garantir a Sua orientação por toda a minha vida.

“E graças a Deus, que sempre nos faz triunfar em Cristo, e por meio de nós manifesta em todo o lugar a fragrância do seu conhecimento.”

Bíblia – 2 Coríntios 2:14

RESUMO

A Geleia de Wharton (GW) é um tecido conectivo mucoso constituído de células mesenquimais imersas em uma substância de base, localizada em torno dos vasos sanguíneos do cordão umbilical. Na primeira fase desse trabalho, foram investigadas as melhores condições de transporte e cultivo para o tecido e células da GW ovinas, caracterizando-as como células multipotentes. Na segunda fase, o trabalho descreveu a permissividade destas células aos lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR). Na terceira fase foram produzidos dois antígenos para o teste de imunodifusão em gel de agarose (IDGA) em células da GW de cordão umbilical ovino cultivadas em DMEM baixa glicose, infectadas *in vitro* com CAEV-Cork ou MVV-K1514, com análise da sensibilidade de detecção de anticorpos anti-CAEV. Para tanto, dez cordões umbilicais foram coletados de ovelhas híbridas por ocasião do parto natural. Foram realizadas culturas de explantes da GW e investigada a viabilidade em cada meio pelo método MTT, além da indução à diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*. A permissividade da infecção das células GW ovina foi testada frente às cepas CAEV-Cork e MVV-K1514 quanto ao efeito citopático. Foram obtidos quatro sobrenadantes contendo partículas virais CAEV-Cork e quatro MVV-K1514, provenientes do cultivo por 21 dias em meios distintos (MEM, DMEM baixa glicose, Meio 199 e RPMI), os quais foram destinados à *nested*-PCR e titulação viral. Destes, dois antígenos foram preparados a partir dos sobrenadantes virais CAEV-Cork e MVV-K-1514 cultivados em DMEM baixa glicose por concentração em AMICON e liofilização. Foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade, utilizando-se 199 soros caprinos analisados previamente por Western Blot e por um kit OPPV/CAEV comercial. As células apresentaram morfologia fibroblastóides. Os ensaios de MTT e diferenciação *in vitro*, revelaram que a escolha do meio de cultura influi na proliferação e manutenção da multipotência, destacando o DMEM baixa glicose como o mais efetivo. Foi demonstrada permissividade por meio da visualização de sincícios, detecção do DNA pró-viral e titulação em todos os tratamentos. A sensibilidade dos antígenos produzidos em DMEM foi de 75% tanto utilizando o CAEV como o MVV, sendo superiores ao Kit de IDGA comercial.

Palavras-chave: Cultivo. Multipotência. Permissividade. Lentivírus. Antígenos.

ABSTRACT

Wharton Jelly (WJ) is a mucosal connective tissue made up of mesenchymal cells immersed in a base substance, located around the umbilical cord blood vessels. In the first phase of this work, the best conditions of transport and culture for ovine WJ tissue and cells were investigated, characterizing them as multipotent cells. In the second phase, the work described the permissiveness of these cells to lentiviruses of small ruminants (SRLV). In the third phase two antigens were produced for the agarose gel immunodiffusion (AGID) test in ovine cord WJ cells cultured in low-glucose DMEM, infected in vitro with CAEV-Cork or MVV-K1514, with sensitivity analysis of Detection of anti-CAEV antibodies. Ten umbilical cords were collected from healthy sheep on the occasion of natural childbirth. Cultures of WJ explants were performed and viability was investigated in each medium by the MTT method, in addition to the induction to adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation in vitro. Permissiveness of ovine WJ cell infection was tested against CAEV-Cork and MVV-K1514 strains for cytopathic effect. Four supernatants containing CAEV-Cork and four MVV-K1514 viral particles were obtained from the culture for 21 days in different media (MEM, DMEM low glucose, Media 199 and RPMI), which were destined for nested PCR and viral titration. Of these, two antigens were prepared from CAEV-Cork and MVV K-1514 viral supernatants cultured in low-glucose DMEM by concentration in AMICON and lyophilization. Sensitivity and specificity were evaluated using 199 goat sera previously analyzed by Western Blot and by a commercial OPPV / CAEV kit. The cells presented fibroblast morphology. MTT assays and in vitro differentiation revealed that the choice of culture media influences the proliferation and maintenance of multipotency, highlighting low-glucose DMEM as the most effective. Permissiveness was demonstrated through visualization of syncytia, pro-viral DNA detection and titration in all treatments. The sensitivity of the antigens produced in DMEM was 75% both using the CAEV and the MVV, being superior to the commercial AGID Kit.

Keywords: Cultivation. Multipotency. Permissiveness. Lentivirus. Antigens.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figure 1 - Morphology of ovine WJUC cells at day 16 of culture in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), P0, 100x, Bars: 100µm..... 68**
- Figure 2 - Viability assessment with MTT test of ovine WJUC cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 during four days..... 69**
- Figure 3 - Adipogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the visualization of intracytoplasmic lipid drops stained in red (arrows). Isolated cells MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI (D) exposed to adipogenesis-inducing medium. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in MEM (E), low glucose DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H), P2, day 14, 400x. Stained with Oil Red O and counterstained with hematoxylin, Bars: 25µm..... 70**
- Figure 4 - Micromasses of ovine WJUC cells isolated in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), and exposed to chondrogenesis-inducing medium. Control wells with micromasses of ovine WJUC cells not induced to differentiation cultured in MEM (E), low glucose DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H), P2, day 16, 100x, Bars: 100µm..... 71**
- Figure 5 - Chondrogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the visualization of a blue coloration, which indicates proteoglycan synthesis by chondrocytes. Chondrogenic islands formed by cells isolated in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), and exposed to chondrogenesis-inducing medium, P2, day 16, 400x, Bars: 25µm. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in MEM (E), low glucose**

DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H). P2, day 16, 100x, Alcian Blue stain, Bars: 100µm..... 72

Figure 6 - Osteogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the red coloration, which indicates extracellular calcium deposits by osteocytes. Cells isolated in (A) MEM, (B) low glucose DMEM, (C) M199 and (D) RPMI 1640, and exposed to osteogenesis-inducing medium. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in (E) MEM, (F) low glucose DMEM and (G) M199. Control well with ovine WJUC cells presenting a not induced and, therefore, spontaneous differentiation in (H) RPMI 1640 medium. P2, day 21, 100x, Alizarin Red S stain, Bars: 100µm..... 73

CAPÍTULO 3

Figure 1 – Collection of sheep umbilical cord at natural parturition (A), transport (B), explantation (C) and culture of primary cells collected from sheep Wharton’s jelly of umbilical cord (white arrow: sheep WJUC explant border; black arrows: fusiform cells migrating to culture plate), P0, day 4, 100x..... 82

Figure 2 - Cytopathic effect of CAEV-Cork (A, B, C, D) and MVV-K1514 (E, F, G, H) in WJUC-derived sheep cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640. P2, 400x. Negative control of sheep cells from WJUC (I, J, L, M). P2, 100x, stained with May Grunwald Giemsa..... 83

Figure 3 - Cytopathic effect in WJUC-derived sheep cells cultured in RPMI-1640 after three days post infection. (A) Infection with CAEV-Cork generating intense lysis in monolayer. (B) Infection with MVV-K1514 in initial phase of lysis in monolayer of cells. Arrows: Syncytia. 100x. May Grunwald Giemsa..... 84

- Figure 4 - Amplification products of 187pb compatible with the targeted-sequence of CAEV proviral DNA in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. M (DNA ladder 100pb Marker); C- (negative control); C+ (positive control); 1, 2, 3 and 4 (positive samples from supernatant of umbilical cord sheep cells infected with CAEV-Cork and cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-16 respectively); 5, 6, 7 and 8 (positive samples from supernatant of umbilical cord sheep cells infected with MVV-K1514 and cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640, respectively)..... 84**
- Figure 5 - Cytopathic effect in GSM cells. Viral titration of CAEV-Cork (A, B, C, D) and MVV-1514 (E, F, G, H) replicated in sheep cells from WJUC in different media. Dilution 10^{-3} , 400x, Crystal Violet staining..... 86**

CAPÍTULO 4

- Figura 1 – Titulação de antígenos e padronização do tempo de leitura da IDGA. a. Desenho esquemático e foto de roseta demonstrando as diluições seriadas dos antígenos ao redor do Soro Positivo (SP), b. c. e d. Linha de precipitação do Ag CAEV nos tempos 24, 48 e 72 horas respectivamente, e. f. e g. Linha de precipitação do Ag MVV nos tempos 24, 48 e 72 horas respectivamente..... 101**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1. | Graus de potência das células-tronco..... | 38 |
|-----------|---|----|

CAPÍTULO 2

| | | |
|----------|--|----|
| Table 1. | Means and total score classification assigned to fibroblastic cell quantities around Wharton's jelly explants from ovine umbilical cords at day four of culture with samples transported in MEM, low glucose DMEM, RPMI 1640, M199, PBS and S..... | 74 |
| Table 2. | Growth analyzed by absorbance percentage of MTT test results performed in fibroblastic cells from ovine WJUC cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 during four days..... | 74 |

CAPÍTULO 3

| | | |
|----------|--|----|
| Table 1. | Titration of CAEV-Cork and MVV-K1514 replicated in umbilical cord sheep cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640..... | 85 |
| Table 2. | Titration of CAEV-Cork and MVV-K1514 replicated in GSM cells..... | 86 |

CAPÍTULO 4

| | | |
|-----------|---|-----|
| Tabela 1. | Sensibilidade, Especificidade e Índice Kappa de testes IDGA utilizando os antígenos experimentais CAEV e MVV, e o kit comercial CAEV/OPPV importado tendo o Western Blot como Padrão..... | 100 |
|-----------|---|-----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|--|
| Ags | Antígenos |
| CAEV | Vírus da artrite encefalite caprina |
| CTEs | Células-tronco embrionárias |
| CTs | Células-tronco |
| CTMs | Células-tronco mesenquimais |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FBS | Fetal bovine serum |
| GW | Geleia de Wharton |
| GWCU | Geleia de Wharton do cordão umbilical |
| IDGA | Imunodifusão em gel de agarose |
| LVPR | Lentivirus de pequenos ruminantes |
| MCI | Massa celular interna |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| MSCBM | Mesenchymal Stem Cell Basal Medium |
| MTT | Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] |
| MVV | Maedi Visna Vírus |
| M199 | Meio 199 |
| OIE | Organização mundial de saúde |

| | |
|---------------|---|
| OPPV | Ovine progressive pneumonia vírus |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| P/S | penicillin-streptomycin |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| S | Saline |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| STAP | <i>stimulus-triggered acquisition of pluripotency</i> |
| TCM-199 | Tissue Culture Medium-199 |
| TNCS | Transferência de Núcleos de Células Somáticas |
| UCCS | Ultra centrifugado em colchão de sacarose |
| UFC-F | Unidades formadoras de colônia fibroblástica |
| WB | Western Blot |
| WJ | Wharton's jelly |
| WJUC | Wharton's jelly of umbilical cord |
| α -MEM | α -Minimum Essential Medium |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 | Lentivirus de Pequenos Ruminantes..... | 22 |
| 2.2 | Avanços no conhecimento dos LVPR através de pesquisas <i>in vitro</i> | 24 |
| 2.3 | Células da geleia de Wharton..... | 28 |
| 3 | JUSTIFICATIVA | 31 |
| 4 | HIPÓTESES CIENTÍFICAS | 32 |
| 5 | OBJETIVOS | 33 |
| 5.1. | OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 5.2. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 6 | CAPÍTULO 1 | 34 |
| 7 | CAPÍTULO 2 | 57 |
| 8 | CAPÍTULO 3 | 76 |
| 9 | CAPÍTULO 4 | 90 |
| 10 | CONCLUSÕES | 103 |
| 11 | PERSPECTIVAS | 104 |
| | REFERÊNCIAS | 105 |

1 INTRODUÇÃO

Os lentivirus de pequenos ruminantes (LVPR) são um grupo heterogêneo de vírus que infectam ovinos e caprinos em todo o mundo, aumentando as taxas de reposição em rebanhos e afetando a saúde dos animais e a produção (LEROUX et al., 2010).

Cinco genótipos (A-E) foram descritos até agora, incluindo o genótipo A amplamente distribuído, protótipo do vírus Maedi Visna (MVV) e o genótipo B, que inclui os vírus semelhantes ao vírus da artrite encefalite caprina (CAEV). Os demais genótipos estão até agora restritos a áreas geográficas específicas. A transposição da barreira espécie-específica tem sido relatada em diferentes países, solidificando a ideia de que os LVPR infectam ovinos e caprinos (LEROUX et al., 2010).

A transmissão interespecie tem importantes implicações, tais como a possibilidade de haver recombinações de cepas selecionadas e adaptadas a diferentes hospedeiros, além da eventual aquisição de novas propriedades biológicas e o surgimento de cepas mais virulentas ou de mais fácil transmissão. Quanto ao controle é necessário aumentar o rigor das medidas, considerando ambas as espécies, do ponto de vista prático, como sendo susceptíveis e fontes de infecção de LVPR (CALLADO et al., 2001).

O sucesso no controle da disseminação desses lentivirus depende em grande parte do uso de ferramentas de diagnóstico apropriadas, mas a existência de uma alta variabilidade genético-antigênica entre esses vírus, os níveis flutuantes de anticorpos contra eles e as baixas cargas virais encontradas em indivíduos infectados dificultam a eficácia diagnóstica (RAMÍREZ et al., 2013).

A variabilidade antigênica pode afetar a sensibilidade de imunoenaios baseados em uma única de estirpe, de forma que ambos os genótipos de LVPR devem ser utilizados no desenvolvimento de futuros testes de diagnóstico, para evitar uma tensão de seleção viral durante programas de erradicação (GREGO et al., 2005).

Infecções por LVPR evoluem a depender do hospedeiro, havendo interações hospedeiro-vírus distintas em ovinos e caprinos, de tal forma que as ferramentas moleculares e sorológicas para o diagnóstico dessas infecções apresentam diferentes sensibilidades em ambas as espécies, independentemente da diversidade viral, sendo mais um aspecto a reforçar a importância de se considerar ambos os genótipos no diagnóstico (RACHID et al. 2013).

De notificação obrigatória, os ensaios mais utilizados para o diagnóstico sorológico dos LVPR são a imunodifusão em gel de agarose (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). A IDGA é específica, reprodutível e simples de executar, mas é necessária experiência para a leitura dos resultados. O ELISA é quantitativo e pode ser automatizado, tornando-o assim útil para rastreamento de grandes quantidades de soros. A sensibilidade e a especificidade tanto do ensaio de IDGA como do ELISA dependem da estirpe de vírus utilizada no ensaio, da preparação do antígeno viral e do padrão utilizado para comparação. As análises de Western blot e/ou radioimunoprecipitação são os padrões de comparação usados para a especificidade de novos testes IDGA e ELISA (OIE, 2008).

Estudos sorológico com ELISA têm relatado vantagens na detecção pela utilização da combinação de ensaios baseados em antígenos de LVPR de natureza e origem diferentes (TOLARI et al., 2013), e também na combinação de peptídeos (A e B) num único antígeno (SANJOSÉ et al., 2015), em rebanhos cuja composição genética e antigênica ainda não era caracterizada.

Em IDGA, no entanto, apesar sua ampla utilização como teste de triagem, não existem relatos que subsidiem a prática de testes em paralelo envolvendo antígenos distintos. Para esta técnica, os antígenos são necessariamente produzidos em cultivos de células permissivas, inoculando-as com cepas virais, colhendo e concentrando os sobrenadantes que contêm os vírus que replicados *in vitro*. Desta forma, a técnica de cultura de células é essencial, pois além de dar suporte à técnica IDGA, pode ser utilizada no diagnóstico direto por isolamento viral.

A cultura de células é uma extensão da técnica de cultura de tecidos, um termo genérico utilizado para incluir culturas *in vitro* de órgãos, tecidos e células. (FRESHNEY, 2005). Esta técnica é fundamental na elaboração de procedimentos experimentais através de um sistema *in vitro* constituído de nutrientes e fatores essenciais à sobrevivência, com condições de temperatura, pH e osmolaridade ideais e controladas (AMARAL & MACHADO-SANTELLI, 2011).

Atualmente, pesquisas com células multipotentes têm ganhado destaque devido seu potencial para a regeneração de tecidos danificados. Existem diversas fontes para a obtenção destas células, dentre elas, o cordão umbilical tem atraído atenção pela vantagem de sua coleta, e como forma de aproveitamento de um tecido rotineiramente descartado como resíduo clínico. A partir dele podem ser isoladas células do sangue do

cordão umbilical, da camada subendotelial da veia do cordão, do tecido conjuntivo (geleia de Wharton) e da perivasculatura (HOU et al., 2009).

Assim sendo, este trabalho buscou inserir as células multipotentes da geleia de Wharton do cordão umbilical de ovinos nos processos de produção antigênica. Primeiramente, foram realizados estudos na etapa de coleta e transporte, visando estabelecer as melhores condições que favorecem o início do cultivo *in vitro* destas células, seguido da análise da viabilidade destas células cultivadas em diferentes meios. Estas células foram induzidas à diferenciação mesodermal com o objetivo de caracterizá-las quanto à multipotência. A pesquisa quanto à permissividade às cepas CAEV-Cork e MVV-K1514, permitiu o passo seguinte que foi a produção de antígenos para a realização de IDGA, que por sua vez trouxeram um maior conhecimento sobre a influência de diferentes meios de cultivo no protocolo de produção antigênica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lentivírus de pequenos ruminantes

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e o vírus Maedi-Visna (MVV) fazem parte do gênero *Lentivirus* pertencentes à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae. Os retrovírus são caracterizados pela capacidade de transcrever inversamente o RNA viral para DNA de cadeia dupla através da ação da transcriptase reversa. O gênero *Lentivirus* inclui os vírus da imunodeficiência humana (HIV), imunodeficiência símia (SIV), imunodeficiência felina (FIV), imunodeficiência bovina (BIV), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e os lentivírus de pequenos ruminantes (MINGUIJÓN et al. 2015).

Os viriões LVPR têm um diâmetro de 80-100 nm e de dentro para fora compreendem nucleocapsídeo, cápside, matriz e envelope. Dentro do núcleo capsídeo estão o genoma (duas cadeias positivas de RNA de cadeia simples de 8,4-9,2 kb), quase 30 moléculas de transcriptase reversa com simetria helicoidal e as enzimas protease e integrase. O capsídeo que rodeia o núcleo capsídeo, tem uma morfologia icosaédrica de cerca de 60 nm em diâmetro e é cercada por matrix. Finalmente, o virião tem um envelope externo formado por uma bicamada lipídica de origem celular e as glicoproteínas de envelope, transmembranar e de superfície, projetando-se para fora (PÉTURSSON et al., 1992).

Em contraste com outros retrovírus, o DNA proviral de lentivírus é transcrito no núcleo celular onde os genomas virais são produzidos. As células infectadas contêm poucas (muitas vezes apenas uma) cópias de provírus integradas ao DNA da célula hospedeira (PÉTURSSON et al., 1992). O mecanismo de retrotranscrição parece ser propenso a erros e, portanto, a replicação de lentivírus envolve uma elevada frequência de mutações pontuais, muitas vezes inserções e deleções, todas as quais são estimadas numa gama de 0,1-2 mutações por ciclo de replicação do genoma (PÉTURSSON et al., 1992, MURPHY et al., 1999) .

A mutação leva a uma alta variabilidade de sequências mesmo dentro de um único indivíduo, formando conjuntamente uma quasispécie. O tipo de vírus que inicialmente infecta o animal persiste e coexiste com novas variantes, mas a progressão

da doença nem sempre está associada ao surgimento de novas variantes (MURPHY et al., 1999).

A infecção por LVPR é persistente, multisistêmica e, na maioria das vezes, assintomática. Devido à cronicidade da doença, o agravamento progressivo das lesões é lento, ocasionando perda de peso e debilidade até a morte. As apresentações clínicas da infecção por LVPR têm sido classificadas sob quatro formas básicas: nervosa, artrítica, respiratória e mamária. Apesar das diferentes frequências e intensidade dos sinais, as lesões apresentam basicamente as mesmas características tanto em caprinos como ovinos (NARAYAN & CORK 1985, DAWSON 1987, PERETZ et al. 1993).

Avanços nos estudos sobre LVPR ainda deixam questões importantes sobre sua biologia e interação com hospedeiros assintomáticos, porém têm permitido melhor fundamentação de algumas hipóteses sobre seu comportamento na natureza e implicações no seu controle (CALLADO et al, 2001). Existe um consenso no que se refere à infecção por LVPR quanto ao impacto significativo sobre o bem-estar animal, devido à diminuição da qualidade de vida dos animais clinicamente afetados, à dor e à incapacidade que ela ocasiona (PETERHANS et al, 2004).

Foram relatados também, prejuízos econômicos em decorrência da diminuição sobre o ganho de peso vivo, redução na produção e qualidade do leite, principalmente nos níveis de gordura do leite, sólidos totais do mesmo e aumento da contagem de células somáticas, além do comprometimento da rentabilidade da produção leiteira. Os custos com a aplicação de vermífugos, principalmente em cabras primíparas, são aumentados em animais doentes, além da diminuição nos parâmetros reprodutivos dos rebanhos, principalmente no que se refere à taxa de infertilidade, serviços por concepção e peso vivo das crias ao nascer (BRITO, 2009; CARNEIRO, 2011).

O diagnóstico precoce, tanto na monitorização do controle como na prevenção da infecção por LVPR é crucial, a fim de se retirar os animais infectados ou evitar a sua entrada, e, assim, impedir a transmissão horizontal, devendo ser feito essencialmente pela detecção de anticorpos ou vírus nos animais (REINA et al., 2009).

Existem vários métodos laboratoriais para o diagnóstico dos LVPR, sendo necessário avaliar vantagens e desvantagens decorrentes da sensibilidade diagnóstica e analítica, bem como a especificidade antes de serem adotadas em programas de controle

e erradicação. Os métodos podem ser denominados como testes de triagem (IDGA e ELISA) ou confirmatórios (Western blot, WB), havendo também a confirmação direta do agente por ensaios moleculares tais como reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção do DNA proviral, diretamente no material genético, ou associado a um passo de transcrição reversa a partir de RNA viral (ANDRÉS et al., 2005).

Como a infecção por LVPR é persistente, a detecção dos anticorpos séricos é uma ferramenta valiosa para a identificação de animais infectados. A maioria dos ensaios sorológicos para o diagnóstico indireto de CAE é realizada utilizando IDGA e/ou ELISA. Outras técnicas sorológicas como o WB têm um uso mais limitado devido ao custo, velocidade, conveniência ou disponibilidade (MUSSI et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) recomenda o uso do IDGA ou ELISA para o diagnóstico da infecção por LVPR (VAREA et al., 2001, OIE, 2008, REINA et al., 2009).

Além da sensibilidade e especificidade do ensaio, seu custo e, conseqüentemente, seu impacto financeiro devem ser considerados quando da implantação em programas de controle ou erradicação (MUSSI et al., 2015). Assim sendo, pesquisas devem direcionar seus esforços na elevação da sensibilidade e especificidade das técnicas de menor custo, como também desenvolver protocolos menos onerosos para as técnicas confirmatórias. O sucesso no controle dos LVPR depende do acesso aos testes diagnósticos por parte dos caprinovinocultores.

2.2 Avanços no conhecimento dos LVPRs através de pesquisas *in vitro*.

As técnicas de cultivo celular têm proporcionado avanços importantes em estudos virológicos devido ao fato dos vírus serem parasitas intracelulares obrigatórios e dependentes da célula para sua replicação.

Em se tratando dos LVPR, quando se deseja isolar cepas virais de campo, amostras de tecidos suspeitos podem ser coletadas, tais como pulmão, membranas sinoviais, úbere, etc., assepticamente, e explantadas em placa de Petri estéril. Os fragmentos individualizados (explantes) são então transferidos para frascos de 25 cm² e incubados a 37 °C numa atmosfera húmida de CO₂ a 5%. As células irão gradualmente crescer a partir dos fragmentos e quando existir suficiente crescimento de células, as culturas são tripsinizadas e dispersa para permitir o desenvolvimento de monocamadas

de células. Estas podem ser examinadas quanto a ocorrência de efeito citopático característico, e qualquer suspeita de crescimento do vírus é confirmada da mesma forma em co-cultivos (OIE, 2008).

As culturas de macrófagos aderentes são fáceis de estabelecer a partir de material de lavagem pulmonar (lavagem bronco-alveolar post-mortem) e podem ser testadas a sua produção viral por sorologia, microscopia eletrônica ou ensaio da transcriptase reversa dentro de 1-2 semanas. Os isolamentos dos vírus podem ser feitos por co-cultivo de macrófagos e células de plexo coróide ovinas ou membrana sinovial caprina (OIE, 2008).

O tropismo dos lentivírus de pequenos ruminantes depende das interações hospedeiro-vírus que ocorrem em diferentes níveis: celular (nos estágios de receptor/entrada, pré-integração, integração, pós-integração do genoma viral no DNA do hospedeiro), órgão/tecido ou indivíduo hospedeiro/raça/espécie) (MINGUIJÓN et al.2015).

In vivo, a infecção permanece latente até que o monócito, principal célula-alvo dos LVPRs, que atua como um "cavalo de Tróia" para espalhar o vírus no corpo, se diferencie em macrófago, desencadeando a transcrição viral. *In vitro*, diferenças claras na replicação dos vírus foram encontradas de acordo com a origem do tecido. Os vírus isolados das células do cérebro replicam mais rápido em células do plexo coróide de ovelha, em comparação com os isolados do pulmão (MINGUIJÓN et al.2015).

Diferenças na permissividade foram encontradas *in vitro* entre linhagens celulares heterólogas de várias espécies (galinha, hamster, humano, macaco, codorna), sendo permissivas ou não a infecção por LVPRs. Estes são altamente variáveis fenotipicamente em células de origem homóloga (de pequenos ruminantes) em relação à capacidade de replicação *in vitro* e a geração de efeito citopático. Frequentemente, os isolados ovinos são classificados fenotipicamente como “rápidos”, pois se replicam rapidamente, além de induzirem a formação de sincícios e/ou lise celulares, e quando cultivados, os sobrenadantes atingem títulos elevados; em contrapartida, os isolados de cabras geralmente são vírus lentos, crescendo lentamente e produzindo títulos baixos. Contudo, vírus do tipo MVV semelhantes ao fenótipo de CAEV intermediários foram isolados tanto de ovinos como de caprinos (MINGUIJÓN et al.2015).

As barreiras à replicação de vírus em células hospedeiras potenciais podem ocorrer em vários níveis. A falta de receptores adequados e funcionais na superfície da célula hospedeira, que impedem a entrada do vírus, é o motivo mais frequente de não infecção, desde que não seja possível explorar a via de entrada alternativa (por exemplo, pinocitose, adsorção dependente de anticorpos). Outras barreiras podem intervir em estágios posteriores do ciclo de vida do vírus, como restrições à transcrição do genoma viral, tradução incorreta e processamento pós-traducional de proteínas virais, montagem viral ineficiente e liberação ou indução inicial eficiente de apoptose na célula infectada. Em células de origem humana foi demonstrado que o CAEV não conseguiu infectá-las, muito embora a barreira tenha sido superada experimentalmente pela transfecção de uma nova construção do CAEV infeccioso pseudotipado com uma proteína do vírus da estomatite vesicular, resultando em infecção produtiva eficiente. Esses resultados demonstram que o principal obstáculo à infecção de células humanas por CAEV está na entrada viral (MSELLI-LAKHAL ET AL. 2000).

Noutro experimento, análises de titulação viral, biossíntese de proteínas virais e processamento das proteínas virais, do CAEV e MVV, após inoculação em macrófagos primários e células da membrana sinovial caprina não apresentaram diferenças substanciais. No entanto, ao contrário do MVV, o CAEV não conseguiu replicar produtivamente em fibroblastos do plexo coróide de ovelhas (CHEBLOUNE et al., 1996).

Devido a erros na etapa de transcrição, a variabilidade da sequência de repetição terminal longa (LTR) é comum em isolados derivados de cultura de tecidos infectadas com o MVV além de outros lentivírus. A amplificação das regiões LTR por PCR de um isolado de MVV revelou duas sequências de tamanhos diferentes, sendo a maior portadora de uma duplicação de uma sequência de 53 pb. Vírus que contem apenas uma cópia desta sequência de 53 pb crescem mais lentamente em células ovinas do plexo coróide, fibroblastos e membrana sinovial do que vírus que possuam a sequência de 53 pb duplicada. Este fato indica que as regiões LTR determinam a extensão do tropismo celular do MVV. Em macrófagos, ambos os vírus crescem igualmente bem (AGNARSDÓTTIR et al., 2000).

Em macrófagos, o efeito citopático do CAEV *in vitro* foi caracterizado pela formação de células gigantes e morte celular, desenvolvendo-se concomitantemente

com o aumento da replicação viral (KLEVJER-ANDERSON P.; ANDERSON L.W., 1982). Uma investigação sobre o mecanismo de fusão celular induzido pelo CAEV demonstrou que a fusão de células da membrana sinovial infectadas com CAEV concentrado *in vitro*, ocorreu antes da produção da descendência infecciosa do vírus. O tempo de detecção inicial da fusão celular dependia da multiplicidade de infecção e não foi detectado até 5 horas após a infecção. Os resultados indicaram que a fusão por CAEV era uma resposta lenta à interação direta da entrada do vírus nas células (fusão de entrada) independente da replicação do vírus (ELLIS et al., 1985).

O MVV pode ser capaz de usar múltiplos receptores ou um receptor multicomponente, assim como o HIV e o SIV. Foi demonstrado que nem CD4 e nem o CXCR4 são essenciais para a infecção por MVV, contudo, a sua presença aumentou significativamente a fusão celular induzida por MVV. Uma vez que a formação de sincício é uma consequência das interações vírus-receptor, o CD4 e CXCR4 podem atuar como componentes auxiliares opcionais de um receptor MVV (ou um receptor complexo) que pode influenciar o tropismo ao nível da entrada do vírus facilitando eventos de fusão da membrana mediada por MVV (HOVDEN; SOMMERFELT, 2002).

HOTZEL e CHEEVERS (2002) demonstraram, através de um estudo de infecção em células de membrana sinovial ovina e caprina, que o CAEV utiliza um receptor comum (receptor A dos LVPRs), enquanto que o MVV-K1514 utiliza um receptor diferente (receptor B dos LVPRs), de forma que o tropismo entre as espécies de LVPRs é determinado pelo uso do receptor.

A produção de lentivírus de pequenos ruminantes pequenos pode ser conseguida *in vitro* em macrófagos e em células de membrana sinovial fibro-epiteliais e células de plexo coróide de cabras ou ovelhas (GLARIA et al., 2009). Outros tipos de células permissivas para a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes são as células da microglia (ADEBAYO et al., 2008), células dendríticas (RYAN et al., 2000), células epiteliais de pulmão (CARROZZA et al., 2003), glândula mamária (BOLEA et al., 2006), terceira pálpebra (CAPUCCHIO Et al., 2003), rim (ANGELOPOULOU et al., 2006), útero e epidídimo (ALI AL AHMAD et al., 2012, LAMARA et al., 2013), endotélio, miócitos lisos (LEROUX et al. 1995), células de granulosa (LAMARA et al., 2001) e células do parênquima do fígado ou do coração (BRELLOU et al., 2007).

Estudos também permitiram elucidações a respeito da apoptose de células infectadas. Verificou-se que mesmo em uma infecção a uma baixa multiplicidade de infecção, ou transfecção com CAEV, resulta em aumento da apoptose em várias células caprinas incluindo as células epiteliais de leite, membrana sinovial, fibroblastos de embriões caprinos imortalizados e macrófagos caprinos primários isolados do sangue. Demonstrou-se que a taxa de apoptose pós-infecção com CAEV é aproximadamente de 2 a 2,5 mais elevada que em células não infectadas. Estes resultados têm importantes implicações para a nossa compreensão da apoptose induzida por CAEV, considerando que a apoptose após a infecção viral é uma tentativa celular de limitar a replicação viral, e em alguns casos, pode ser um requisito para uma eficiente montagem ou liberação eficaz do vírus (REA-BOUOTROIS et al, 2008).

Estudos envolvendo a ação de drogas antivirais (inibidores de protease e da transcriptase reversa) e fitoextratos (*Azadirachta indica* A.) contra a replicação dos LVPRs foram realizados em membrana sinovial caprina. A replicação dos vírus só não foi completamente bloqueada pelos inibidores de protease atazanavir e lopinavir/r enquanto os demais apresentaram eficácia antiviral significativa em diferentes concentrações. Os inibidores de protease juntamente com o efavirenz, não mostraram atividade antiviral quando foram avaliados pela técnica de redução do MTT. Fármacos inibidores da transcriptase reversa lamivudina, didanosina, estavudina e zidovudina foram eficazes na inibição *in vitro* dos lentivírus de pequenos ruminantes (ARAÚJO et al. 2010). Extratos hexânico, acetato de etila e etanólico de *Azadirachta indica* A. inibiram eficazmente tanto o CAEV-Cork quanto o MVV K1514, enquanto que o extrato clorofórmico não demonstrou ação antiviral (MOURA et al. 2010).

Os conhecimentos gerados por meio desses estudos têm em comum a utilização de ensaios *in vitro* utilizando a técnica de cultivo de células para trazer diversos esclarecimentos sobre os LVPR. Seguindo o curso das pesquisas com células tronco dos últimos anos, uma tendência à utilização de novas fontes de células tem surgido, no sentido de se evitar danos aos animais, fontes destas células, e se esquivar de embates éticos. Os anexos fetais, em especial o cordão umbilical, carece ainda de pesquisas no campo da virologia, como possível fonte de células permissivas à infecção viral.

2.3 Células da geleia de Wharton.

O cordão umbilical forma uma conexão entre a placenta e o feto. Contém uma veia e duas artérias rodeadas pela geléia de Wharton (GW) e cobertas por um epitélio amniótico simples. A GW é formada por tecido conjuntivo mucoso, constituído por células mesenquimais imersas em uma substância fundamental. A matriz extracelular da geleia de Wharton é muito abundante e contém quantidades significativas de ácido hialurônico e alguns glicosaminoglicanos sulfatados imobilizados em uma rede insolúvel de fibras de colágeno (BANKOWSKI, 1999).

Primeiramente observada por Thomas Wharton em 1656, esta substância gelatinosa é composta de proteoglicanos e várias isoformas de colágeno. O papel principal da geleia de Wharton é evitar a compressão, torção e flexão dos vasos umbilicais que proporcionam o fluxo bidirecional de oxigênio, glicose e aminoácidos para o feto em desenvolvimento, ao mesmo tempo em que esgotam o feto e a placenta de dióxido de carbono e outros resíduos (TAGHIZADEH et al. 2011).

As células encontradas na GW são células tronco mesenquimais primitivas, provavelmente presas na matriz de tecido conjuntivo à medida que migraram para a região aorta-gônada-mesonefros através do cordão em desenvolvimento, durante a embriogênese (WANG et al., 2008).

Estas células-tronco mesenquimais foram isoladas de três regiões relativamente indistintas: a zona perivascular, a zona intravascular e a área sub amniótica (KITA et al., 2010). A possibilidade de isolamento de células a partir dessa fonte motivou pesquisadores veterinários a direcionarem seus estudos a fim de obter um número relevante de células e minimizar os riscos para os doadores e receptores em terapias celulares (MARCUS-SEKURA et al., 2011). Em 2006, pela primeira vez na medicina veterinária, a geleia de Wharton foi obtida a partir do cordão umbilical porcino (CARLIN et al. 2006).

Devido ao elevado potencial destas células serem subcultivadas e diferenciadas *in vitro*, têm-se crescido o interesse no seu uso em terapia celular, genética, clonagem, estudos virológicos e biotecnológicos (HARTMANN et al., 2010).

O cordão umbilical é rotineiramente descartado ao parto e sua natureza extracorpórea facilita o isolamento, o que excluem a necessidade de procedimentos de

coleta invasivos e que causem desconforto, bem como os riscos que os pacientes se expõem quando do isolamento de células-tronco adultas de outras fontes. Ademais, o volume relativamente grande do cordão umbilical e a facilidade de sua manipulação, teoricamente aumentam o número de células estaminais que podem ser extraídas, tornando assim, possível obter um número substancial de células em várias passagens, sem a necessidade de cultivo de longos prazos e de extensa expansão *ex vivo* (IACONO et al. 2015), sendo uma solução viável na obtenção de células-tronco para a medicina veterinária.

Embora não existam ensaios clínicos em curso com células-tronco da geleia de Wharton, vários ensaios pré-clínicos foram realizados para sugerir os possíveis benefícios clínicos desta fonte celular. Várias indicações foram investigadas em animais, incluindo a reconstituição hematopoiética, Parkinson, diabetes, degeneração macular e lesões da medula espinhal. Antes que as células da GW possam ser utilizadas com segurança em ensaios com humanos, deve-se completar a investigação e caracterização em animais para garantir sua segurança e eficácia. As células da GW são imuno-privilegiadas, imunossupressoras, têm capacidade de diferenciação multipotente/pluripotente e estão prontamente disponíveis como uma fonte de células, podendo ser uma importante fonte de terapia celular com indicações específicas no futuro próximo para tratar várias doenças e melhorar a qualidade de vida em muitos pacientes (TAGHIZADEH et al. 2011).

Este elevado potencial, têm gerado também o interesse de utilizar estas células em estudos biotecnológicos e virológicos (CARDOSO et al., 2012a), havendo sido demonstrado, em bovinos, a sua permissividade à infecção pelo herpesvirus bovino tipo 5 (CARDOSO et al., 2012b).

3 JUSTIFICATIVA

Embora no Brasil existam pesquisas em andamento e laboratórios capazes de realizar diversas técnicas sorológicas, o diagnóstico dos lentivirus de pequenos ruminantes conta somente com um Kit de IDGA comercialmente disponível (LIMA et al, 2012), de menor custo e mais acessível ao produtor, de forma que ainda se mantém como uma importante técnica aplicada em programas de controle nacionais.

O processo de produção de antígenos virais para a IDGA consiste na replicação *in vitro* destes lentivirus, que dependem de células permissivas e que, até o presente momento, são obtidas do tecido da membrana sinovial caprina, membrana nictitante e córnea, sendo, para isto, necessário microcirurgias ou o sacrifício de fetos para sua obtenção (ARRUDA et al, 2011).

Pesquisas têm-se voltado para células oriundas da geleia de Wharton de cordão umbilical, como uma fonte de células promissora para estudos de engenharia tecidual e infecções virais *in vitro* (HOU et al., 2009; CARDOSO et al. 2012). Seguindo este caminho, nesta tese, várias técnicas foram aplicadas com o intuito de se conhecer os potenciais das células da geleia de Wharton do cordão umbilical da espécie ovina quanto à multipotência e permissividade aos LVPRs, bem como propor sua utilização na produção de antígenos de forma a apoiar a caprino/ovinocultura no diagnóstico das lentivirose. Desta maneira, espera-se agregar valor ao cordão umbilical ovino, tecido este rotineiramente descartado, tendo em vista o seu potencial para substituir outras fontes de células em que ocorreria sacrifício animal.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- Células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino são células multipotentes capazes de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos.
- Diferentes meios de transporte e cultivo têm influência sobre o surgimento de células primárias e sobre a manutenção ou não da multipotência de células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino.
- A permissividade à infecção por lentivirus de pequenos ruminantes possibilita a utilização de células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino para a produção de antígenos de lentivirus de pequenos ruminantes.

5 OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a permissividade de células multipotentes da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino visando dispor de uma nova ferramenta para produção de antígenos para o diagnóstico dos lentivirus de pequenos ruminantes, utilizando-se de uma fonte de células de colheita não invasiva, evitando-se o sacrifício de fetos e animais jovens.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Definir o melhor meio de transporte (MEM, DMEM baixa glicose, M199, RPMI-1640, PBS e Soro Fisiológico) analisando a velocidade do surgimento de células em cultivo.

2 – Comparar a viabilidade celular e crescimento resultante do cultivo de células da geleia de Wharton ovina em quatro meios de cultura diferentes (MEM, DMEM baixa glicose, M199, RPMI-1640).

3 – Investigar diferenças no potencial de diferenciação adipogênico, condrogênico e osteogênico *in vitro* de células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino cultivada em diferentes meios de cultura (MEM, DMEM baixa glicose, M199 e RPMI-1640).

4 – Comprovar a permissividade das células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino aos lentivirus de pequenos ruminantes CAEV-Cork e MVV-K1514.

5 – Utilizar as células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino na produção antígenos para imunodifusão utilizando as cepas virais CAEV-Cork e MVV-K1514, em definindo sensibilidade e especificidade resultante de diferentes protocolos.

6 CAPÍTULO 1

Células-tronco: Uma corrida em busca da terapia utilizando modelos animais.

Stem cells: A race for therapy using animal models.

Resumo

As pesquisas com células-tronco datam da década de 60, por meio de estudos pioneiros com o transplante de medula em camundongos. Com a demonstração de sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, a comunidade científica despertou para o grande potencial destas células para pesquisas na área da saúde. Novos paradigmas são estabelecidos a cada avanço. O fato, é que as células-tronco têm se tornado a grande esperança no tratamento de enfermidades e desenvolvimento de terapias regenerativas, tanto na área humana quanto veterinária, sendo um valioso achado da comunidade científica. Nesse contexto, a proposta dessa revisão é abordar de forma concisa os conceitos, avanços e perspectivas das pesquisas com células-tronco.

Células-tronco: Uma corrida em busca da terapia utilizando modelos animais.

Stem cells: A race for therapy using animal models.

Ronaldo Pereira Dias ^{1*}, Maria Fátima da Silva Teixeira², Anderson Carvalho de Farias³, Gabrielle Rosembli Martins⁴, Tereza D'ávila de Freitas Aguiar⁵, Antoniel de Oliveira Alves⁶, Paloma Fagundes Silva⁷, Ana Raquel Almeida Pinheiro⁸

^{1 3 4 5} Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE), email: ronaldodias01@yahoo.com.br, anderson_medvet@yahoo.com.br, rmgabrielle@hotmail.com, davilavet@gmail.com.

² Doutora responsável pelo Laboratório de Virologia do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE), orientadora, email: mfteixeira@hotmail.com, Médica Veterinária.

^{6 7 8} Alunos de iniciação científica do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará (UECE), email: antonieldeoliveiraalves@gmail.com, palomafagundessilva@hotmail.com, kel_almeida92@hotmail.com, curso: Medicina Veterinária.

Resumo

As pesquisas com células-tronco datam da década de 60, por meio de estudos pioneiros com o transplante de medula em camundongos. Com a demonstração de sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, a comunidade científica despertou para o grande potencial destas células para pesquisas na área da saúde. Novos paradigmas são estabelecidos a cada avanço. O fato, é que as células-tronco têm se tornado a grande esperança no tratamento de enfermidades e desenvolvimento de terapias regenerativas, tanto na área humana quanto veterinária, sendo um valioso achado da comunidade científica. Nesse contexto, a proposta dessa revisão é abordar de forma concisa os conceitos, avanços e perspectivas das pesquisas com células-tronco.

Termos para indexação: Células-tronco, Terapêutica, Biotecnologia.

Abstract

Research on stem cells dating from the 1960s through pioneering studies with bone marrow transplantation in mice. With the demonstration of its ability to self-renewal

and differentiation, the scientific community has woken up to the great potential of these cells for research in healthcare. New paradigms are established at each advance. The fact is that the stem cells have become the great hope for the treatment of diseases and development of regenerative therapies, both in human to veterinary area as being a valuable finding of the scientific community. In this context, the purpose of this review is to address concisely the concepts, progress and prospects of research on stem cells.

Index terms: Stem cells, Therapy, Biotechnology.

Introdução

O conceito de células-tronco (CTs) surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 60 por Ernest Cullloch e James Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco (Till, 1964).

Outros estudos, realizados nas décadas de 70 e 80 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein com células-tronco mesenquimais (CTMs), demonstraram sua capacidade de autorrenovação e diferenciação (Drzewiecki et al., 2010). Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F) (Torres, 2009). Nas décadas seguintes, extensas pesquisas foram desenvolvidas para desvendar o potencial terapêutico das CTMs (Drzewiecki et al., 2010).

Em 1998 as primeiras linhagens de células-tronco embrionárias (CTEs) humanas foram estabelecidas, sendo, no ano seguinte, eleitas como o avanço científico do ano pela revista *Science* (Vogel, 1999). Naquele ano, foi demonstrado que células-tronco de tecidos adultos mantinham a capacidade de se diferenciar em outros tipos de tecidos.

Desde então, o número de artigos científicos sobre esse tipo celular cresceu exponencialmente, gerando novos paradigmas a serem estabelecidos (Pereira, 2008).

As CTs são células primitivas e indiferenciadas, sem distinção quanto ao aspecto de sua morfologia, sendo encontradas durante todo estágio do desenvolvimento embrionário bem como em muitos tecidos no adulto. São definidas primariamente pela sua habilidade de se autorrenovar ou de produzir células filhas idênticas, possuindo também a capacidade de se diferenciar em múltiplos tipos celulares do corpo (Vats et al., 2002; Gargett, 2004). Além disso, as CTs podem retornar ao estado indiferenciado e se rediferenciar em outra via, ou seja, células hematopoiéticas de ratos que normalmente se tornariam células sanguíneas, podem, sob certas condições, produzir células de fígado, de músculo ou de pulmão (Largeault, 2004).

Diante do potencial terapêutico destas células tanto em animais quanto em humanos e da vasta possibilidade do seu uso em estudos laboratoriais, propôs-se nesta revisão abordar e esclarecer conceitos, relatar os avanços nas pesquisas, além de evidenciar o cenário nacional dos estudos com células-tronco.

Potencialidade das células-tronco

As CTs podem ser classificadas segundo sua potencialidade em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As chamadas de totipotentes, como o zigoto e as células formadas na primeira clivagem do blastômero, são capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários; as pluripotentes podem originar todas as células formadoras do embrião e são provenientes da massa celular interna do blastocisto (CTEs); já a classificação como multipotente refere-se às células capazes de originar apenas um subgrupo de linhagens celulares, como por exemplo, as células-tronco mesenquimais (CTMs). Existem ainda células classificadas como oligopotentes,

capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem do que as multipotentes, bem como as unipotentes, que originam apenas um único tipo celular maduro. Estas duas últimas devem ser consideradas células progenitoras e não células-tronco (Wagers & Weissman, 2004; Schwindt et al., 2005).

Por se tratar de um tema relativamente novo, é comum ocorrer confusão de conceitos e uso impróprio das definições acima, por isso destacamos uma tabela conceituando as células-tronco segundo suas potencialidades (Tabela 1).

Tabela I. Graus de potência das células-tronco

| Potência | Capacidade de desenvolvimento celular |
|--|---|
| Totipotentes | Capazes de se dividir e produzir todas as células diferenciadas no organismo, incluindo os tecidos extraembrionários. |
| Pluripotentes | Conseguem se diferenciar em todos os tecidos adultos, exceto a placenta e os anexos embrionários. |
| Pluripotentes induzidas ou Reprogramadas | Células-tronco somáticas que têm sua potência aumentada através de reprogramação molecular. |
| Multipotentes | Capazes de formar vários tipos de células da linhagem mesodermal. |

Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Pode-se ainda classificar esses tipos celulares de acordo com o seu local de origem, sendo definidas como células-tronco embrionárias ou células-tronco adultas. As CTEs são derivadas da massa celular interna do blastocisto cinco dias após fertilização (em humanos) e podem ser expandidas em cultura. As células-tronco adultas, no

entanto, são obtidas após a fase embrionária (de blastocisto), sejam elas provenientes de organismo adulto, recém-nascido ou do próprio feto (Torres, 2009).

Células-tronco mesenquimais

As CTMs são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas que estão presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o periósteo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (Meirelles et al., 2008; Mambelli et al., 2009). A medula óssea constitui um dos principais sítios doadores dessas células, assim como de células-tronco hematopoiéticas e endoteliais (Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2000).

Além da medula óssea, vários trabalhos relataram a ocorrência de CTMs em vários órgãos e no sangue periférico de fetos jovens (Campagnoli et al., 2001), no endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical (Covas et al., 2003), no sangue do cordão umbilical (Secco et al., 2009), na geléia de Wharton (Aejaz et al., 2007), no sangue menstrual (Meng et al., 2007), na placenta (In't Anker et al., 2004) no fluido amniótico no segundo trimestre de gestação (Tsai et al., 2004), e em vários tecidos adultos, como tecido adiposo, tecido conectivo do músculo esquelético e derme (Young et al. 2001; Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002), de onde já foram isoladas e expandidas em cultura.

Friedenstein et al. (1974) foram os primeiros a estabelecer um conceito para as CTMs, ao observarem o desenvolvimento de uma rara população de células aderidas ao plástico com morfologia fibroblastóide ao cultivarem *in vitro* células de medula óssea, sendo então chamadas de Unidades Formadoras de Colônia semelhantes a Fibroblastos (UFC-F). Após sua expansão *in vitro*, culturas clonais derivadas dessas UFC-F

individuais puderam ser introduzidas em modelos experimentais, onde foi observada a formação de osso, cartilagem e elementos estromais (Castro-Malaspina et al., 1980).

Nos dias atuais, o cultivo de CTMs continua com a mesma etapa inicial, na qual é realizada a seleção das células que possuem a característica de se aderir ao plástico, enquanto as células que permanecem em suspensão são facilmente removidas. Outros tipos celulares chamados “contaminantes” (como macrófagos e linfócitos) são eliminados após determinado número de passagens (Javazon et al., 2004). Embora o sangue periférico e o de cordão umbilical sejam fontes de CTMs, apresentam pouca quantidade desse tipo celular comparado com a medula óssea (Wexler et al., 2003).

Por serem células multipotentes, as CTMs são capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, cardíacas, dentre outras (Pittenger et al., 1999). Este grau de plasticidade sugere que esse tipo celular seja o responsável pela manutenção de todos os tecidos do organismo (Caplan, 2009), tornando-as foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo por fornecer perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular.

As CTs estão presentes em praticamente todos os tecidos de um organismo adulto, não se tratando apenas de progenitores comprometidos, mas células com capacidade de se diferenciar em tipos celulares não relacionados ao tecido de origem. Sendo assim, era de se esperar que estas células de elevada potencialidade regenerassem completamente todos os tecidos em caso de lesão aguda ou mesmo em situação de desgaste natural ou envelhecimento. Isto não ocorre provavelmente pelo motivo de as CTs mais potentes em um organismo adulto permanecerem indiferenciadas desde seu estágio inicial de desenvolvimento, controladas por microambientes que sinalizam para uma especificidade celular de acordo com o contexto tecidual. (Schwindt et al., 2005)

Em condições de cultura, entretanto, tais células são estimuladas por diversos fatores que não existem em seu ambiente de origem e que alteram o seu comportamento. Assim sendo, muitos experimentos realizados *in vitro* não podem ser extrapolados para modelos *in vivo* (Schwindt et al., 2005). Já houve relato que estas células puderam ser expandidas *in vitro* por mais de 40 gerações, mantendo sua característica multipotente, embora reduzam as taxas de mitoses e haja uma grande probabilidade de acúmulo de mutações, tornando desaconselhável seu uso clínico nestas condições (Deans & Moseley, 2000).

A análise do perfil citogenético também demonstrou que as células-tronco mesenquimais primárias cultivadas, apresentam instabilidade genética acarretando alterações citogenéticas após várias passagens. Houve também mudança no perfil proteômico das culturas após aquisição da anomalia cromossômica, indicando que o cultivo de CTMs necessita de maior rigor no controle e qualidade das preparações para fins clínicos. Sendo assim, recomenda-se que as culturas de CTMs devam ser submetidas a poucos subcultivos *ex vivo* e passem por controle citogenético prévio à infusão destas células para fins terapêuticos (Lazarotto-Silva, 2009).

Células-tronco embrionárias

As CTEs podem permanecer indiferenciadas, em condições apropriadas, se multiplicando indefinidamente *in vitro* e mantendo sua capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular adulto. Elas foram derivadas pela primeira vez por Evans & Kaufman (1981), a partir de embriões de camundongos, e têm como característica principal sua pluripotência, ou seja, quando reintroduzidas em um embrião, as CTEs possuem a capacidade de retomar o desenvolvimento normal colonizando diferentes

tecidos do embrião, demonstrando de forma contundente sua ampla plasticidade (Pereira, 2008).

Cada uma das células do embrião na fase de duas células tem o potencial de se diferenciar em qualquer tipo celular do embrião ou de tecidos extraembrionários (totipotência). Já no estágio de blastocisto, as células do trofocotoderma estão irreversivelmente impossibilitadas de se diferenciar em linhagens extraembrionárias. Nesse estágio, somente as células da massa celular interna (MCI) ainda mantêm o potencial de se diferenciar em todos os tecidos do embrião (Gilbert, 2010). Essas células derivadas da MCI satisfazem aos critérios de células-tronco, ou seja, são células com proliferação prolongada, capazes de se autorrenovar, e aptas à diferenciação clonal em diferentes linhagens.

Um estudo demonstrou *in vivo* a pluripotência das CTEs por meio da injeção dessas células não diferenciadas em camundongos imunodeficientes. Nestes animais, na presença de diversos estímulos *in vivo*, as CTEs injetadas multiplicaram-se e diferenciaram-se de forma desorganizada, dando origem a teratomas, onde foram encontrados tecidos derivados dos três folhetos embrionários (Nussbaum et al., 2007).

Sendo assim, as pesquisas envolvendo o uso destas células para fins terapêuticos devem ser realizadas com cautela, pelo fato de não se conhecer todo mecanismo biológico destas células *in vivo*, tornando impossível sua utilização. Estudos *in vitro* devem prosseguir, a fim de fornecerem conhecimentos básicos que contribuirão com benefícios significativos na área da saúde.

Células-tronco pluripotentes induzidas

Em 2006, a equipe de Shinya Yamanaka criou um método para obter CTs pluripotentes a partir de células diferenciadas adultas de rato e, em 2007, utilizou o

mesmo método com células humanas, o que lhe valeu o Prêmio Nobel de Medicina em 2012 – as células mais famosas da atualidade chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (Takahashi & Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).

Antes da obtenção destas células, o recurso mais promissor para o tratamento de doenças degenerativas e genéticas eram as CTEs (Lerou et al., 2005). No entanto, a terapia baseada em CTEs apresentava complicações pela rejeição imunológica devido a incompatibilidade imunológica entre as células dos pacientes e dos doadores. Sendo assim, buscou-se como alternativa, derivar geneticamente CTEs-like idênticas "personalizadas" através da técnica de Transferência de Núcleos de Células Somáticas (TNCS), que foi desenvolvida utilizando uma célula doada a partir do paciente (Jaenisch, 2004). Por meio desta estratégia, era esperado eliminar a exigência da supressão imunológica (Rideout III et al., 2002), mas as complexidades técnicas e éticas da TNCS impediram a realização prática da "clonagem terapêutica" (Weissman, 2006).

Em uma série de estudos, fibroblastos de ratos e humanos foram reprogramados *in vitro* em células semelhantes a células-tronco pluripotentes (do inglês "*induced pluripotent stem cells*," ou iPS) através de transdução retroviral contendo combinações de fatores de transcrição (Maherali et al., 2007; Takahashi et al. 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007; Yu et al., 2007).

Isto foi possível através da seleção de células reprogramadas pela reativação dos genes Oct4 ou Nanog, marcadores endógenos de pluripotência, ou por subclonagem de colônias com base em critérios morfológicos (Maherali et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Takahashi & Yamanaka, 2006; Wernig, 2007; Yu et al., 2007; Bluelloch et al., 2007; Meissner et al., 2007).

As Células iPS derivadas de fibroblastos de ratos e humanos são muito semelhantes a CTEs por suas características genéticas, epigenéticas, e pelas suas características de desenvolvimento. Estas células oferecem o mesmo potencial regenerativo das células embrionárias, mas sem algumas preocupações éticas. Entretanto, a utilização de sistemas de vetores virais para sua obtenção ainda tornava qualquer possibilidade de aplicação dessas células em humanos impraticável, por conta do risco do desenvolvimento de tumores, pela ativação de genes endógenos devido à mutagênese insercional e porque os vírus, por serem estáveis, não são eliminados do genoma com o tempo (Hanna et al., 2007; Cyranoski, 2014b).

Contudo, o primeiro passo em direção a medicina regenerativa utilizando células iPS já foi dado. Uma mulher japonesa, com cerca de 70 anos, portadora de uma doença ocular grave denominada degeneração macular relacionada à idade, foi a primeira paciente a submeter-se ao tratamento com estas células em 12 de setembro de 2014, quatro dias após uma comissão do Ministério da Saúde autorizar o teste em humanos (Cyranoski, 2014c). Artigos experimentais com macacos e ratos foram previamente publicados demonstrando que o tratamento com células iPS geradas a partir das próprias células dos destinatários não provocaram nenhuma reação por parte do sistema imunitário, evitando que as células fossem rejeitadas pelo organismo (Kamao et al., 2014), além de não levar ao crescimento de tumores (Kanemura et al., 2014).

Em uma das tentativas mais recentes de se induzir pluripotência em células por meio de uma metodologia mais simples, a equipe japonesa de Haruko Obokata relatou um fenômeno de reprogramação celular exclusivo chamado STAP (do inglês *stimulus-triggered acquisition of pluripotency*), que não exige nem transferência nuclear nem a introdução de fatores de transcrição. Esta técnica consiste em reprogramar células somáticas de mamíferos por meio de um forte estímulo externo, tal como um período de

exposição em meio de baixo pH, resultando na geração de células pluripotentes. Os autores afirmaram que a injeção destas células STAP em blastocisto contribuiu eficazmente para a produção de embriões quiméricos (Obokata et al., 2014a; Obokata et al., 2014b). Estes resultados seriam promissores não fossem os problemas com os artigos, incluindo acusações de que Obokata tinha plagiado trechos de textos e usado imagens duplicadas, logo após a publicação. Além disso, outros grupos disseram que eles foram incapazes de reproduzir os resultados publicados (Cyranoski, 2014a).

Células-tronco no Brasil: Pesquisas e avanços

Em todo o mundo vários países avançam suas pesquisas enfocando as células-tronco, e o Brasil também tem se destacado neste seletto grupo. Segundo a Iniciativa Nacional de Inovação em Biotecnologia (INI – Biotecnologia, 2008), em uma pesquisa sobre a evolução mundial do número de artigos científicos com células-tronco revelou que entre os anos de 1998 e 2007 foram localizados 14.984 artigos e 2.521 patentes que continham o termo “stem cell” segundo a busca delimitada pelos campos “title” e “publication year” junto à base de dados Web of Science. Desses 14.984 artigos os EUA lideram o ranking com 5.748 artigos, seguido de Japão, Alemanha, Inglaterra e Itália com 1.869, 1.570, 1.032 e 882 artigos, respectivamente. Ao se ampliar o critério de seleção para “top 50”, verifica-se que o Brasil ocupa a 29ª posição no ranking mundial em publicações científicas nesta área, com 63 artigos publicados no período de 1998 a 2007. Com relação às patentes desenvolvidas no Brasil, a área de células-tronco encontra-se na lista entre os de maior número no período 1998-2007.

Podem-se destacar como marcos brasileiros, nos últimos anos, dois avanços ocorridos em 2008: a produção da primeira linhagem de células tronco embrionárias humanas no Brasil (batizada de BR- 1) e a produção da primeira linhagem de CT

obtidas sem o uso de embriões - CT pluripotentes induzidas ou células iPS (Leite, 2009).

Foram também desenvolvidas duas linhagens denominadas Rio-1 (gerada a partir de fibroblastos da pele de camundongos) e a iPS293 (gerada pela reprogramação de células de uma linhagem celular de rim de embrião humano), inserindo o Brasil num seleto grupo, sendo o quinto país do mundo a dominar esta técnica (Del Carlo et al, 2009; Aragão & Bezerra, 2012).

Considerações finais

As células-tronco apresentaram potencial promissor desde os primórdios das pesquisas devido a sua capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares, destacando a ampla plasticidade das células-tronco embrionárias. No entanto, devido a questões éticas na sua obtenção, a terapia celular a partir destas células, ficou por muitos anos impedida de acontecer. Com o avanço das pesquisas, conseguiu-se então contornar essa questão reprogramando células adultas a um estado pluripotente, gerando assim amplas possibilidades de tratamento. Estas células representam uma grande promessa na área da medicina, apresentando uma capacidade de se diferenciar em qualquer tecido de um organismo adulto, fornecendo esperança para que no futuro se torne possível a reconstrução de tecidos ou órgãos e ainda auxilie no desenvolvimento de novos tratamentos.

Apesar desse grande avanço, a terapia com células pluripotentes induzidas (iPS), em humanos, encontra-se em fase inicial de testes, sendo os resultados ansiosamente aguardados por toda comunidade científica mundial e apontado como um importante momento histórico na área da biotecnologia.

Referências bibliográficas

AEJAZ, H. M.; ALEEM, A.K.; PARVEEN, N.; KHAJA, M. N.; NARUSU, M.L.; HABIBULLAH, C. M. Stem cell therapy-present status. Transplantation Proceedings, New York, v.39, p.694–699, 2007.

ARAGÃO, M. A. C.; BEZERRA, F. T. G. Brasil e as pesquisas com células-tronco: visão geral. Revista da Biologia, São Paulo, v.9, n.1, p.12 - 15, 2012.

BLELLOCH, R.; VENERE, M.; YEN, J.; RAMALHO-SANTOS, M. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Drug Selection. Cell Stem Cell, San Francisco, v.1, n.3, p.245 – 247, 2007.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow, Blood, London, v.98, n.8, p. 2396 - 2402, 2001.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. Journal of Pathology, Cleveland, v.217, n.2, p.318 - 324, 2009.

CASTRO-MALASPINA, H.; GAY, R. E.; RESNICK, G.; KAPOOR, N.; MEYERS, P.; CHIARIERI, D.; MCKENZIE, S.; BROXMEYER, H. E.; MOORE, M. A. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. Blood, Washington, v.56, n.2, p.289 - 301, 1980.

CYRANOSKI, D. Biologist defiant over stem-cell method. In Focus News Nature, v.508, p.299, 2014a.

CYRANOSKI, D. Next-generation stem cells cleared for human trial. News/Nature. 2014b. Disponível em: <http://www.nature.com/news/next-generation-stem-cells-cleared-for-human-trial-1.15897>. Acesso em: 21 out. 2014.

CYRANOSKI, D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells. News/Nature. 2014c. Disponível em: <http://www.nature.com/news/japanese-woman-is-first-recipient-of-next-generation-stem-cells-1.15915>. Acesso em 21 out. 2014.

COVAS, D. T.; SIUFI, J. I. C.; SILVA, A. R. L.; ORELLANA, M. D. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v.36, n.9, p.1179 - 1183, 2003.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potencial clinical uses. Experimental Hematology, USA, v.28, p.875 - 884, 2000.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; ARGOLO NETO, N. M. Avanços no estudo de células-tronco no Brasil e suas implicações. Revista Ceres, v.56, p.446 - 450, 2009.

DRZEWIECKI, B. A., THOMAS, J. C., TANAKA, S. T. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. Stem Cells International, USA, v.2010, 2010.

EVANS, M.; KAUFMAN, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, Cambridge, n.292, p.154 - 156. 1981.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATSINIK, N. V.; PANASYUK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation, v.17, n.4, p. 331 – 340, 1974.

GARGETT, C. E. Stem cells in gynaecology. Australian and Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology, Australia, v.44, p.380 – 386, 2004

GILBERT, S. F (Ed.). Developmental biology. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 711p.

HANNA, J.; WERNIG, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, CW.; MEISSNER, A.; CASSADY, J. P.; BEARD, C.; BRAMBRINK, T.; WU, LC.; TOWNES, T. M.; JAENISCH, R. Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science, USA*, v.318, n. 5858, p.1920 – 1923, 2007.

IN 'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells, Leiden*, v.22, p.1338 - 1345, 2004.

INI-Biotecnologia - Panorama da Biotecnologia no Mundo e no Brasil. 2008. Disponível em <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20Setorial%20Biotecnologia.pdf> . Acesso em: 29 set. 2014.

JAENISCH, R. Human cloning - the science and ethics of nuclear transplantation. *The New England Journal of Medicine, Massachusetts*, v.351, n.27, p.2787 - 2791, 2004.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology, Philadelphia*, v.32, p.414 - 425, 2004.

KAMAO, H.; MANDAI, M.; OKAMOTO, S.; SAKAI, N.; SUGA, A.; SUGITA, S.; KIRYU, J.; TAKAHASHI, M. Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports, Japan*, v.2, p.205–218, 2014.

KANEMURA, H.; GO, M. J.; SHIKAMURA, M.; NISHISHITA, N.; SAKAI, N.; KAMAO, H.; MANDAI, M.; MORINAGA, C.; TAKAHASHI, M.; KAWAMATA, S. Tumorigenicity Studies of Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Retinal Pigment Epithelium (RPE) for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Plos One, Japan*, v.9, n.1, 2014.

LARGEAULT, A. F. Embriões, células-tronco e terapias celulares: questões filosóficas e Antropológicas. *Estudos Avançados, São Paulo*, v.18 n.51, p.227 - 245, 2004.

LAZZAROTTO-SILVA, C. Estudos Moleculares de Células-Tronco Mesenquimais Cultivadas In Vitro. 2009. 159f. Tese (Doutorado em Oncologia). Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2009.

LEITE, M. Overcoming Opposition, Brazil Banks on Stem Cells. *Science, São Paulo*, v.324, n.5923, p.26, 2009.

LEROU, P. H.; DALEY, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews, Boston*, v.19, n.6, p.321 – 331, 2005.

MAHERALI, N.; SRIDHARAN, R.; XIE, W.; UTIKAL, J.; EMINLI, S.; ARNOLD, K.; STADTFELD, M.; YACHECHKO, R.; TCHIEU, J.; JAENISCH, R.; PLATH, K.; HOCHEDLINGER, K. Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell, USA*, v.1, p.55-70, 2007.

MAMBELLI, L. I.; SANTOS, E. J.; FRAZÃO, P. J.; CHAPARRO, M. B.; KERKIS, A.; ZOPPA, A. L.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering, São Paulo*, v.15, n.1, p.87 - 94, 2009.

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, Porto Alegre, v.26, p.2287 - 2299, 2008.

MEISSNER, A.; WERNIG, M.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, Cambridge, v.25, p.1177 – 1181, 2007.

MENG, X., ICHIM, T. E.; ZHONG, J.; ROGERS, A.; YIN, Z.; JACKSON, J.; WANG, H.; GE, W.; BOGIN, V.; CHAN, K. W.; THÉBAUD, B.; RIORDAN, N. H. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of translational medicine*, USA, v. 5, n. 1, p. 57, 2007.

MINGUELL, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Santiago, v.33, n.8, p.881 - 887, 2000.

NUSSBAUM, J.; MINAMI, E.; LAFLAMME, M. A.; VIRAG, J. A. I.; WARE, C. B.; MASINO, A.; MUSKHELI, V.; PABON, L.; REINECKE, H.; MURRY, C. E. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *The FASEB Journal*., Seattle, v.21, n.7, p.1345 - 1357, 2007.

OBOOKATA, H.; SASAI, Y.; NIWA, H.; KADOTA, M.; ANDRABI, M.; TAKATA, N.; TOKORO, M.; TERASHITA, Y.; YONEMURA, S.; VACANTI, C.A.; WAKAYAMA, T. Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature*, Japan, n.505, p.676–680, 2014a.

OBOOKATA, H.; WAKAYAMA, T.; SASAI, Y.; KOJIMA, K.; VACANTI, M. P.; NIWA, H.; YAMATO, M.; VACANTI, C. A. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature, Japan*, v.30, p.641 – 647, 2014b.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, São Paulo, v.13, n.1, p.7 - 14, 2008.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, Baltimore, v.284, n.5411, p.143 - 147, 1999.

RIDEOUT 3rd, W. M.; HOCHEDLINGER, K.; KYBA, M.; DALEY, G. Q.; JAENISCH, R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*, Cambridge, v.109, p.17 - 27, 2002.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. – Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, São Paulo, v.16, n.1, p.13 - 19, 2005.

SECCO, M.; MOREIRA, Y. B.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M.; JAZEDJE, T.; MUOTRI, A. R.; OKAMOTO, O. K.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; ZATZ, M. Gene Expression Profile of Mesenchymal Stem Cells from Paired Umbilical Cord Units: Cord is Different from Blood. *Stem Cell Reviews and Reports*, Brasil, v.5, p.387-401, 2009.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, Japan, v.126, n.4, p.663 - 676, 2006.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell, Japan*, v.131, n.5, p.861 - 872, 2007.

TILL, J. E.; MC CULLOCH, E. A.; SIMINOVITCH, L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Toronto*, v.51, n.1, p.29 - 36, 1964.

TORRES FC. Panículo adiposo inter escapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco. 2009. Tese (Doutorado em Ciências – Área de Clínica Cirúrgica) São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

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

VATS, A.; TOLLEY, N. S.; POLAK, J. M.; BUTTERY, L. D. K. Stem cells: sources and applications. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences*, v.27, n.4, p.227 - 234, 2002.

VOGEL G. Capturing the promise of youth. *Science*, v.286, n.5448, p.2238 - 2243, 1999.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell, Califórnia*, v.116, p.639 - 648, 2004.

WEISSMAN, I. L. Medicine: Politic stem cells. *Nature, California*, v.439, p.145 - 147, 2006.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, v.448, p.318 – 324, 2007.

WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br. J. Haematol., Bristol*, v.121, n.2, p.368-374, 2003.

YOUNG, H. E.; STEELE, T. A.; BRAY, R. A.; HUDSON, J.; FLOYD, J. A.; HAWKINS, K.; THOMAS, K.; AUSTIN, T.; EDWARDS, C.; CUZZOURT, J.; DUENZL, M.; LUCAS, P. A.; BLACK JR., A.C. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record, Georgia*, v.264, n.1, p.51 - 62, 2001.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, v.318, n.5858, p.1917 - 1920, 2007.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering, Los Angeles*, v.7, n.2, p.211 - 228, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human

adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, Los Angeles, v.13, n.12, p.4279 - 4295, 2002.

7 CAPITULO 2**Potential for *in vitro* mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media**

Potencial de diferenciação mesodermal *in vitro* de células da geleia de Wharton de cordão umbilical ovino mantidas em diferentes meios de cultivo

RESUMO

A geleia de Wharton do cordão umbilical (GWCU) de mamíferos é uma fonte promissora de células multipotentes, sendo vantajosa por aspectos éticos, facilidade de coleta e não causar teratomas em ensaios pré-clínicos. Em ovinos, células multipotentes já foram isoladas de vários tecidos, no entanto, não existem relatos do isolamento a partir do cordão umbilical nesta espécie. O objetivo do presente estudo foi investigar o melhor meio para o transporte do cordão umbilical, isolar e manter as células da GWCU ovino em diferentes meios e comparar a proliferação e o potencial de diferenciação mesodermal *in vitro*. Oito cordões umbilicais foram obtidos, por ocasião do parto natural, seccionados e transportados em seis diferentes meios que consistiram em MEM, DMEM baixa glicose, M199, RPMI 1640, PBS e soro fisiológico. Para cada meio de transporte foram utilizados quatro meios de cultivo, sendo o tecido explantado em placas de 24 poços e cultivados em MEM, DMEM baixa glicose, M199 e RPMI 1640, todos com 10% SFB. Todo o experimento foi realizado em baixa passagem (P2) investigando viabilidade pelo MTT por quatro dias além da indução à diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica *in vitro*. O meio de transporte mais efetivo ($P < 0,10$) foi o DMEM baixa glicose. Não houve contaminações bacterianas ou fúngicas decorrentes da coleta. Células oriundas da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino colhido por ocasião do parto natural possuem morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Os ensaios de MTT e diferenciação *in vitro*, revelaram que o meio de cultura celular modula o comportamento destas células, sendo um fator importante tanto para a proliferação como para a manutenção da multipotência, destacando o DMEM baixa glicose como o meio mais adequado para o transporte e isolamento de células da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino.

Potential for *in vitro* mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media¹

Ronaldo P. Dias^{2*}, Maria F. S. Teixeira^{2,3}, Edmara C. Costa⁴, Anderson C. Farias², Dalva A. A. Azevedo², Tereza D. F. Aguiar², Mariana A. Pinheiro⁵

ABSTRACT.- Ronaldo P. Dias^{2*}, Maria F. S. Teixeira^{2,3}, Edmara C. Costa⁴, Anderson C. Farias², Dalva A. A. Azevedo², Tereza D. F. Aguiar², Mariana A. Pinheiro⁵. [**Potential for *in vitro* mesoderm differentiation of Wharton's jelly cells from ovine umbilical cord isolated in different culture media**] Potencial de diferenciação *in vitro* de células provenientes da geleia de Wharton de cordões umbilicais ovinos isolados em diferentes meios de cultivo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Silas Munguba, 1700, Fortaleza – CE, CEP 60.740-000, Brasil. E-mail: ronaldodias01@yahoo.com.br¹

The mammalian Wharton's jelly of umbilical cord (WJUC) is a promising source of multipotent cells, providing advantages due to ethical implications, ease of collection and the absence of teratomas in pre-clinical trials. Ovine multipotent cells have already been isolated from various tissues, however there are no reports using umbilical cords in this species. This study aimed to investigate the best medium to transport the umbilical cord, to isolate and maintain ovine WJUC cells and to compare *in vitro* growth and mesodermal differentiation potential. Eight ovine umbilical cords were obtained during parturition, sectioned and transported in six different media: MEM, low glucose DMEM, M199, RPMI 1640, PBS and saline. For each transportation medium, four culture media were used and the tissue was explanted in 24-well plates and cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640, all with 10% FBS. Every experiment was conducted with low-passage (P2), investigating MTT viability during four days and adipogenic, chondrogenic and osteogenesis differentiation was induced *in vitro*. The most effective transport medium (p<0.1) was low glucose DMEM. There was no bacterial or fungal contamination from collection. Cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cords collected at natural birth possess fibroblastic morphology and the capacity for *in vitro* differentiation into adipogenic, chondrogenic and osteogenic cell lines. MTT tests and *in vitro* differentiation experiments revealed that cell culture medium modulates the behavior of cells and is an important factor for proliferation and maintenance of multipotency. Low glucose DMEM was the most suitable medium for the isolation of cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cord.

INDEX TERMS: Sheep umbilical cord matrix, Multipotent cells, Adipogenesis, Chondrogenesis, Osteogenesis.

¹ Received on.....

Accepted for publication on.....

² Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Silas Munguba, 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60.740-000, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio CAPES. *Autor para correspondência: ronaldodias01@yahoo.com.br; demais e-mails: maria.teixeira@uece.br anderson_medvet@yahoo.com.br, dalvaazevedo@outlook.com, davilavet@gmail.com

³ Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq.

⁴ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Avenida da Abolição, 3, Centro, Redenção, CE 62.790-000, Brasil. E-mail: edmaracosta@unilab.edu.br.

⁵ Bolsista de iniciação científica (FUNCAP), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Silas Munguba, 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60.740-000, Brasil. E-mail: marianandrioli@gmail.com.

INTRODUCTION

In recent years, fetal membranes such as the placenta, placental membranes, umbilical cord, and amniotic fluid have been recognized as an unexplored resource for the field of regenerative medicine. These tissues have been shown to be a rich source of cells with elevated multipotency and potent immunosuppressive properties that demonstrate how these cells are exciting promising new tool for the treatment of diseases (Murphy & Atala 2013). In addition, the absence of ethical conflicts implied in collection and of teratogenic effects involved in the application are considerable advantages when compared to embryogenic stem cells and pluripotent-induced cells (Condic & Rao 2010).

Fetal membranes are a rich, non-invasive and easy to collect source of these cells, which present great capacity to proliferate and differentiate (De Vita et al. 2012). Umbilical cord is one example of tissue with promising results in research to provide new tools to treating several diseases. This fetal membrane is covered by amniotic epithelium that protects a gelatinous and elastic matrix composed by mucopolysaccharides (hyaluronic acid and chondroitin sulfate) referred as Wharton's jelly (WJ), named after Thomas Wharton in 1856 (Forraz & McGuckin 2010).

Umbilical cord is routinely discarded after parturition and cell isolation is facilitated due to the location outside the fetal body. This excludes the necessity of invasive collection procedures, which often occurs when adult cells are isolated from other sources, possibly causing discomfort and risk to patients. Furthermore, the relatively large volume of umbilical cord and easy manipulation theoretically enhances the number of cells that may be extracted. This favors a substantial number of cells in several passages, avoiding long culture procedures and extended *ex vivo* expansion (Iacono et al. 2015), which becomes a viable solution for obtaining cells to veterinary practice.

The ability of multipotent cells to differentiate into a variety of connective tissue cell types has rendered them an ideal candidate cell source for clinical tissue regeneration strategies (Baksh et al. 2004). WJ cells are immuno-privileged, immunosuppressive, have a multipotent differentiation capacity and are readily available as a cell source (Taghizadeh et al. 2011). In addition, the capacity of human cells derived from Wharton's jelly to proliferate and differentiate have been demonstrated and are similar to bone marrow cells (Baksh et al. 2007).

In humans, a simple method for obtaining cells from Wharton's jelly of umbilical cord (WJUC) have been described without enzymatic digestion, but simply culturing the tissue explants (Hendijani et al. 2014). With goats, the beneficial effect of cells from WJUC in cutaneous cicatrization have already been demonstrated (Azari et al. 2011). In another study, caprine cells from WJUC also enhanced the healing potential through xenotransplant in cutaneous wounds of rabbits, demonstrating improvement in the formation of epithelium and collagen with vascularization (Pratheesh et al. 2014).

With sheep, cells isolated from different sources have demonstrated *in vitro* capacity to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, such as periodontal ligament (Gronthos et al. 2006), bone marrow (McCarty et al. 2009), adipose tissue, umbilical cord blood (Fadel et al. 2011), peripheral blood (Lyahyai et al. 2012), amniotic liquid (Colosimo et al. 2013) and dermal skin (Jahroomishirazi et al. 2015). However, there are no studies reporting the isolation and *in vitro* mesoderm differentiation of cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cord.

Sheep are an ideal model for studies in bone tissue engineering (Guo et al. 2004), and have also been proposed as an animal model for several applications in biomedical research with illnesses such as respiratory diseases (Scheerlinck 2008), cardiomyopathies (Psaltis et al. 2010, Sill et al. 2011) and neurological disorders (Fauza et al. 2008). In addition, the use of these animals in orthopedic investigations have improved due to their similarities with humans in weight, size, common structures and regenerative bone/cartilage processes, leading to a potential in regenerative processes that have also been studied.

An important factor that must be considered in the culture of primary cells is the medium used. Studies have shown that it interferes in the differentiation potential of isolated cells (Wu et al. 2009, Lima et al. 2012, Ribeiro et al. 2013). In order to achieve success in tissues or organs engineering, it is imperative to provide a culture microenvironment to the cells that supports their proliferation and maintains their differentiation capacity.

Therefore, this study aimed to isolate ovine WJUC cells obtained during birth, to determine the best transport conditions for this tissue, to assess growth and morphologic aspects in different culture media and their influence in the capacity for *in vitro* mesoderm differentiation.

MATERIAL AND METHODS

Collection and transportation of sheep umbilical cords. Ovine umbilical cords (n=8) were collected during parturition of healthy mixed breed sheep from two farms located in Guaiuba city territory, in Ceará State. Before rupture, each umbilical cord was pinched with sterile hemostatic scissors and cut in a section of 6 to 10cm. Then, the entire fragment was washed with sterile PBS added 2% of penicillin-streptomycin (P/S) (Gibco™, Cat N^o. 15140-122, 10,000 U/ml) for disinfection and blood removal. Each cord was immediately sectioned on a sterile petri dish in six fragments of 1cm², which were then placed in falcon tubes (TPP, Cat N^o. 91015), each containing a different transport solution. Media used for transportation were: MEM (Gibco™, Cat N^o. 61100-061), low glucose DMEM (Gibco™, Cat N^o. 31600-034), Medium 199 (M199) (Gibco™, Cat N^o. 11150-067), RPMI 1640 (Gibco™, Cat N^o. 31800-022), phosphate buffered saline (PBS) and saline 0.9% (S); to all of which 4% P/S and 1% amphotericin B were added. Tubes were placed in isothermal box containing recyclable ice (4°C) and sent to laboratory of Virology from State University of Ceará for the remaining procedure. This experiment was performed according to the current law and ethical principles for animal experimentation approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of the State University of Ceará protocol number 12776979-0.

Transport media selection. In a 24-well plate (Kasvi, Cat. K12-024), fibroblast development was assessed in each cord fragment transported in each of the six different media. Every fragment from each cord originated explants, which were submitted to culture with four different cellular culture media, displaced in simple arrange (A_{6x4}). Culture media used were: MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640, and to all of these 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™, Cat N^o. 10270-098), 2% P/S and 1% amphotericin B were added. In each well, three explants were placed, cultivated for 30minutes for plate adherence in incubator at 37°C with humid atmosphere and 5% CO₂, then 0.5mL of culture medium was added. Plates were observed daily in inverted microscope for fibroblast visualization around the explants. At day four, when the first cells were observed, scores were attributed according to the presence and quantity of fibroblasts around the explants: zero cells (score 0), one to five cells (score 1), six to twenty cells (score 2) and uncountable number of cells (score 3). Results were then compared and the best transport medium for cord tissue was selected.

Cord cell culture in different media. After confluence, cells were trypsinized in 24-well plates (Kasvi, Cat. K12-024) and expanded in culture flasks of 25 cm² (Kasvi, Cat. K11-2050), each containing one culture medium, MEM, low glucose DMEM, M199 or RPMI 1640, added 10% FBS, 2% P/S and 1% amphotericin B during the entire experiment. Cell counting in all experiments with plates was performed with Neubauer chambers.

MTT assay for cell viability evaluation (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide). Growth of second passage (P2) ovine umbilical cord cells was assessed with a method that measures the activity of mitochondrial dehydrogenase enzyme, which when active is capable of metabolizing the MTT reagent resulting in a colored compound named formazan. Therefore, 100µL aliquots of cell suspension in culture medium (MEM, low glucose DMEM, M199 or RPMI 1640) added 10% FBS, 2% P/S and 1% amphotericin B, in a concentration of 1x10⁵ cells/mL were placed in 96-well microplates (Kasvi, Cat. K12-096). For each culture medium, four repetitions in triplicate were used, resulting in 12-wells/day. After every 24h of incubation, the culture medium in the well was replaced by 100µL of the same medium added MTT (Sigma, Cat. M2003) in a 0.5mg/mL concentration. Microplates were incubated for 4h at 37°C to allow MTT permeation and formation of formazan crystals. Then, media containing MTT were removed and formazan crystals were solubilized with 100µL of DMSO under stirring for 5 minutes. Spectrophotometry analysis was performed with microplate reader (Metertech model Σ 960) with an absorbance of 600nm. Readings were performed with 24, 48, 72 and 96 hours of culture.

Differentiation in mesoderm cell line. Wharton's jelly cells cultured in second passage in four distinct media were used to identify their potential for *in vitro* differentiation into osteocytes, adipocytes and chondrocytes.

Osteogenic differentiation. Osteogenesis was performed using a differentiation kit (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco, Cat. N^o A10072-01). Cells were trypsinized and placed in 24-well plates (Kasvi, Cat. K12-024) in a 5x10³ cells/cm² density with culture medium added 10% FBS, antibiotics and antifungal, all incubated in humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

After 24 hours, each medium was replaced by the osteogenesis-inducing medium in the wells of the differentiation experiment, while control wells remained with maintenance media MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640. Differentiation as well as maintenance media were replaced every two to three days. After 21 days, cells were fixated in 4% buffered formalin for 30

minutes and then washed with distilled water. Alizarin Red S 2% solution (pH 4.2) (Sigma-Aldrich, Cat. A5533) was added to each well for three minutes and then three washings were performed with distilled water.

Adipogenic differentiation. Adipogenesis was performed using a differentiation kit (StemPro Adipogenesis Kit, Gibco, Cat. N° A10070-01). Cells were trypsinized and placed in 24-well plates (Kasvi, Cat. K12-024) in a 1×10^4 cells/cm² density in culture media added 10% FBS, antibiotics and antifungal in humid atmosphere with 5% CO₂ at 37° C.

After 24 hours, media were replaced by adipogenesis-inducing medium in the wells of the differentiation experiment, while control remained with maintenance media. Differentiation and maintenance media were replaced every two to three days.

After 14 days, cells were fixated with 10% buffered formalin for 10 minutes, followed by two washings with PBS. Oil Red O solution (Sigma, Cat. O1391) was added to the cells for 15 minutes and then washed twice with distilled water. Counter coloration was performed with Mayer's hematoxylin (Sigma, Cat. MHS16) for three minutes.

Chondrogenic differentiation. Chondrogenesis was induced using micromass technique in 24-well plates (Kasvi, Cat. K12-024) with a chondrogenesis-inducing kit (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco, Cat N° A10071-01). Cells were trypsinized and a suspension of 1.6×10^7 cells/mL was prepared. Three micromass cultures were prepared in each well, using three 5 μ l drops of the cell suspension. After two hours, chondrogenesis-inducing medium was added to wells and replaced every two to three days. Control cells were submitted to the same protocol, however after two hours the same maintenance media in which they were cultured were added. After 16 days, media were removed from the wells, which were washed with PBS and micromasses were fixated in 4% formalin for 30 minutes. Following, washing with PBS was performed and Alcian Blue solution (Sigma, Cat. B8438) in 3% acetic acid was added for 30 minutes for coloration. Then, three washings in wells were performed with 3% acetic acid and then distilled water was added to neutralize the acidity.

Statistical Analysis. Statistical analysis was performed with Wilcoxon rank-sum test for transportation media data, which were expressed as scores and the difference between means was determined by Kruskal-Wallis test. Significance level was set at $p < 0.10$. ANOVA parametric test for inequality of population means, Bartlett's test for inequality of population variances and Mann-Whitney/Wilcoxon two-sample test were applied for multiple comparisons. In order to detect statistical differences in MTT assay, a $p < 0.05$ significance level was considered by Epi Info 7 processing.

RESULTS

Transport and isolation

Cells were isolated from Wharton's jelly of ovine umbilical cord at natural birth using an explant culture protocol without enzymatic digestion. All samples presented adhesion to the plastic surface of the culture plates and fibroblastic morphology. For each transport medium, four culture media were tested. Cells initiated migration from the edge of the tissue fragments of Wharton's jelly and first fibroblastic cells were observed after four days of culture. Scores of 0-3 were assigned to each treatment (Table 1) and the best results were observed in the wells with explants transported with low glucose DMEM ($p < 0.10$) with an intermediate classification (19.6), followed by RPMI 1640 (17.0), MEM (12.2), M199 (11.5), SF (7.6) and PBS (7.0). Cells obtained from transportation with low glucose DMEM were selected to continue the experiment. After 16 days, single layers cultured in four different media achieved 100% confluence (Fig.1) and then were transferred to tissue culture flasks.

MTT essay for cell viability

Culture with MEM provided more viable cells after trypsinization (day 1) with an average optical density of 0.344, followed by M199 with 0.276, low glucose DMEM with 0.275 and RPMI 1640 with 0.197 (Fig. 2). Growth was analyzed every 24 hours, and low glucose DMEM maintained growth, with the lowest decrease in optical density percentage during the four days, followed by RPMI 1640, M199 and MEM (Table 2). Optical density was significantly different ($p < 0.05$) among media in all days of the experiment.

Adipogenic differentiation

After 14 days of adipogenic induction, cells isolated in MEM, low glucose DMEM and M199 presented adipogenic differentiation capacity, however cells isolated in RPMI 1640 did not. Differences were observed in the adipogenic differentiation capacity of cells due to the formation of

intracytoplasmic lipid drops, which were stained by Oil Red O solution. Cells isolated in low glucose DMEM presented the highest concentration of these drops, followed by M199 and MEM isolated cells. All adipogenesis-induced cells presented morphological alterations of polygonal shape (Fig. 3 A, B, C, D) and control group cells remained with fusiform fibroblastic morphology (Fig. 3 E, F, G). However, cells from RPMI 1640 control presented an irregular and less stretched morphology (Fig. 3 H). Adipogenic differentiation did not occur in any of the control wells.

Chondrogenic differentiation

In 13 hours after the addition of chondrogenesis-inducing medium, drops in cells isolated in low glucose DMEM aggregated into micromasses, followed by MEM isolated cells in 19 hours and M199 along with RPMI 1640 only in 34 hours (Fig. 4 A, B C, D).

Drops in cells from control wells also agglutinated, however a single layer of fibroblasts grew from them, while micromass cells detached along the experiment (Fig. 4 E, F, G, H). After 16 days of differentiation, Alcian blue coloration was performed directly onto the plates, which allowed the visualization of intense blue coloration indicative of proteoglycan synthesis by chondrocytes in cells isolated and maintained in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 (Fig. 5 A, B, C, D). In control wells, the blue color was discreet or absent (Fig. 5 E, F, G, H).

Osteogenic differentiation

After 22 days of osteogenesis induction, all isolated cells presented the capacity to differentiate (Fig. 6 A, B, C, D), however a superior quantity of extracellular calcium deposition was observed, stained red in cells isolated and maintained with low glucose DMEM, indicating that these cells differentiated into functional osteoblasts in higher proportion. Cells isolated in MEM presented the lowest quantities of calcium deposition among treatments. Cells isolated in RPMI 1640 showed a dispersed calcium deposition in comparison to other groups (Fig. 6 D). There was no calcium deposition in control groups (Fig. 6 E, F, G), except in cells cultured in RPMI 1640, which presented extracellular calcium deposition (Fig. 6 H).

DISCUSSION

Multipotent cells have a lot of potential for several cell-dependent therapies and the current isolation techniques provide low quantities of these cells, which may be improved with *in vitro* expansion. However, the potential to expand is limited by *in vitro* aging, which leads to a loss of multipotency and replicative senescence. Stress induced by culture conditions is probably one of the main factors that affect these phenomena, which may be reduced through improvement of culture techniques (Stolzing et al. 2006). This study describes collection, isolation and *in vitro* mesodermal differentiation of cells from ovine Wharton's jelly maintained in different culture media that have different concentrations of amino acids, vitamins, ions and calories.

Caloric restriction is the only method established for slowing down aging and extending cellular lifespan and it has been proven that reducing glucose concentrations lead to an apoptosis reduction and improvement of cellular proliferation (Stolzing et al. 2006). In addition, calcium and phosphate concentrations also influence growth and differentiation, and optimal concentrations for calcium ion of 1.8mM and for phosphate ion 0.09mM have been established. Changes in these concentrations may lead to inhibition in growth and/or differentiation capacity in these cells (Liu et al. 2009).

Several culture media have been used in studies with cells from Wharton's jelly of mammalian umbilical cords, among which are α -MEM, MSCBM (Passeri et al. 2009), DMEM/TCM199 (Iacono et al. 2012), high glucose DMEM (Hendijani et al. 2014) and DMEM (Sreekumar et al. 2014). The media used in the present study, which are MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640, are usually used due to their capacity of supporting growth of different types of cells. However, there are differences in the compositions of these culture media, which may influence proliferation, viability and *in vitro* cellular differentiation (Wu et al. 2009).

Choosing an adequate culture medium is an important step for success in cell culture (Wu et al. 2009), therefore, this study aimed to investigate which medium is ideal for *in vitro* culture of ovine umbilical cord. MEM is the most commonly used medium among others in cellular culture and is considered to have a low concentration of phosphate (1mM) and glucose (1g/L) and high calcium concentration (1.8mM) (Lopez-Cazaux et al. 2006). Low glucose DMEM is unique among other media due to the elevated amino acid and vitamins concentrations, which are four times higher than MEM, while possessing the same levels of glucose, calcium and phosphate. M199 has the same levels of glucose, calcium and phosphate then MEM and low glucose DMEM; however, it possesses additional exclusive components, which are adenine, adenosine, hypoxanthine, thymine

and additional vitamins (Morgan & Morton 1956). RPMI 1640 medium contains biotin, vitamin B12 and PABA, which are not found in other media, and has nutritional values similar to MEM, but different ionic concentrations. This medium has a low calcium concentration (0.8mM) and high phosphate concentration (5mM), however with twice the glucose concentration (2g/L) when compared to MEM, low glucose DMEM and M199 (Lopez-Cazaux et al. 2006).

Iacono et al. (2012) reported problems with bacterial and yeast contamination in the culture of equine Wharton's jelly cells by the microbiota in the birth canal and environmental conditions of collection, even with immersion of umbilical cords for 10 minutes in 70% alcohol. Passeri et al. (2009) tested three transportation and isolation protocols of equine umbilical cords to avoid fungal and bacterial contaminations, and the best results were obtained with immersion of the umbilical cords overnight in the transport medium containing 5% P/S and 2% amphotericin B.

In this study, contamination did not occur at collection, since umbilical cords were collected before rupture, using sterile equipment, without contact with soil and were immediately washed with PBS added 2% P/S and immersed in transport solutions containing 4% P/S and 1% amphotericin B.

The long distances between the locations in which animals are housed and the laboratory demand ideal transport conditions. Therefore, the study was performed to assess the effects of transport media in the development of first cells with *in vitro* culture as a strategy to improve collections, and low glucose DMEM was significantly superior ($p < 0.10$). Explants from umbilical cords that were transported in low glucose DMEM produced more primary cells after four days of culture when compared to other media used in transportation, which were RPMI 1640, MEM, M199, PBS and S, as shown in Table 1. Sigalas et al. (2004) reported that the culture medium DMEM preserved better the cells from human periodontal ligament stored at room-temperature and in ice for one hour, after which superior viability was observed in 0, 24 and 48 hours of culture and these results corroborate with the present study.

The isolation method used in this study was efficient, simple and consistent, producing great quantities of homogeneous fibroblastic cell populations in the four media studied, without visible morphological differences (Fig. 1). However, in second passage, morphological differences were observed. Cells cultured in low glucose DMEM presented a narrow and stretched aspect, while cells cultured in MEM and M199 revealed a discreet cytoplasm enlargement close to the nucleus position, and cells isolated in RPMI 1640 presented a disorganized morphology, with a round and irregular conformation when confluent (Fig. 3 E, F, G, H). These findings corroborate with other studies that demonstrated that the number of passages (Maciel et al. 2014) and the culture medium (Fong et al. 2007, Ribeiro et al. 2013) influence the morphology of cells during culture.

No difference in the duration necessary to obtain confluence was observed and in day 16, primary cells (P0) of Wharton's jelly cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 achieved 100% of confluence, when were trypsinized and transferred to culture flasks of 25cm².

Metabolic assessment by MTT test demonstrated that cells presented a higher proliferation ($p < 0.05$) when cultured in low glucose DMEM, followed by RPMI 1640, M199 and MEM, due to the minor decrease in growth percentage during culture, maintaining 14.36% of growth at day four, while MEM, M199 and RPMI 1640 grew 1.99%, -0.33% and 9.18%, respectively at the same day (Table 2). However, culture with medium RPMI 1640 revealed that after trypsinizations, many cells remained in suspension, indicating cellular death, which was confirmed with a minor absorbance in MTT test with 24 hours. In this day, optical density obtained with RPMI 1640 medium was the lowest, with an average of 0.197 when compared to low glucose DMEM, which was 0.275, while M199 was 0.276 and the higher was MEM with 0.344, which presented the best support to trypsinization process (Fig. 2 and Table 2).

Multipotent cells tend to decrease their multipotency over culture duration (Liu et al. 2004). Therefore, a differentiation assay with three mesodermal cell lines was performed in low passage (P2) in order to solely verify the effects of culture media on cell isolation and maintenance of multipotency.

In adipogenesis induction, only the cells cultured in RPMI 1640 did not differentiate, not presenting intracytoplasmic lipid drops stained red by Oil Red O (Fig. 3 D). Low glucose DMEM and M199 allowed cells to respond better to this induction, with a discreet but visible superiority when compared to MEM (Fig. 3 B, C). These data corroborate with the methodology proposed by Carswell et al. (2012), which indicate both DMEM and M199 as the ideal media for isolation and culture of adipocytes. Janderová et al. (2003) report a superior differentiation in human mesenchymal stem cells into adipocytes provided by M199 added with adipogenic factors, when compared to high glucose DMEM. There was no adipogenic differentiation in any of the negative controls.

The best method for *in vitro* chondrogenic studies is micromass culture (Zhang et al. 2010). Although there are no studies correlating the formation speed of cellular aggregates with a chondrogenic differentiation potential of multipotent cells, in this study there was difference in this behavior specifically concerning time. After 13 hours with the chondrogenesis-inducing medium, cells isolated in low glucose DMEM coalesced forming micromasses, followed by MEM cells, after 19 hours, and M199 and RPMI 1640 cells after 34 hours.

Miura e Shiota (2000) studying micromasses *in vitro* demonstrated that cells from bone marrow of rat fetuses presented different cellular motility during migration for chondrogenic islands formation, depending if they were cultured in liquid medium or gel (agarose or collagen), reporting the occurrence of chondrogenic islands in 24 hours of culture. In addition, Awad et al. (2000), observed that contraction kinetics vary according to the initial cellular density of the culture, demonstrating a shorter time to the formation of chondrogenic aggregates, when cells are seeded in high density.

Chondrogenic aggregates are a consequence of the separation of chondrogenic cells from a heterogeneous population (Cottrill et al. 1987a). The presence of myofibroblasts may affect *in vitro* morphogenesis of cartilage and micromass behavior reflects the interactions with a different cell population (Cottrill et al. 1987b). This possible cellular heterogeneity is reinforced by the fact that tissue from Wharton's jelly of umbilical cords have stromal cells that, during pregnancy, acquire specific characteristics of myofibroblasts with the objective of protecting umbilical veins from compressions, but also serving as a niche for mesenchymal stem cells (Kobayashi et al. 1998).

Therefore, different times in which cells coalesce may have resulted from a cellular heterogeneity, in a greater or minor proportion, caused by different culture medium compositions in which the ovine WJUC cells were isolated and maintained. At the end of 16 days, positive intense marking with Alcian blue was observed confirming chondrogenesis in all four treatments (Fig. 5 A, B, C, D).

About osteogenesis, extracellular quantities were clearly different, even if subjectively, among ovine Wharton's jelly cells from ovine cord, showing that culture medium in which cells are isolated and maintained affects, maintaining or not, the capacity for *in vitro* osteogenic differentiation. The visualization in red of the extracellular calcium by alizarin red demonstrated the superiority of low glucose DMEM in the isolation and maintenance of the osteogenic differentiation capacity of ovine WJUC cells.

The data from this study corroborate with the findings of Wu et al. 2009, which reported in canine periosteum cells the superiority of low glucose DMEM for cellular differentiation when compared to RPMI 1640. In addition, these authors reported that mineralized nodules from culture with RPMI 1640 were distributed in a more dispersed pattern. This behavior was also demonstrated in this study, in which extracellular calcium deposition occurred in a less concentrated and more dispersed manner on the single layer of cells isolated in this medium (Fig. 6 D).

Osteogenic differentiation in cells isolated and maintained with M199 presented inferior quantities of extracellular calcium deposition when compared to DMEM and RPMI, followed by MEM maintained cells, which demonstrated the least effective capacity of osteoblast differentiation among the four tested media (Fig. A, B, C, D). These findings disagree with the results from Lopez-Cazaux et al. (2006), who reported the superiority of MEM in comparison with RPMI in proliferation and differentiation into odontoblast-like cells from human dental pulp. Possibly, cells from different origins have distinct nutritional requirements, which reflect in a behavioral variation when using the same culture medium.

In the control group negative for osteogenic differentiation, extracellular calcium deposition did not occur, except in cells cultured in RPMI, which presented positive red markings (Fig. 6 H), however these cells were not exposed to the osteogenesis-inducing medium. Spontaneous mineralization *in vitro* and without induction with β -glycerophosphate or dexamethasone have been reported in cellular culture of human dental pulp (Alliot-Licht et al 2001) and canine periosteum (Wu et al, 2009), both cultured in RPMI 1640 medium. The hypothesis created by one of the authors for this phenomenon is the presence of pericytes or myofibroblasts that incorporate calcium phosphate from nodule formation that appear when cells remain in a long period at 100% of confluence. Also, spontaneous mineralization is cell-density dependent and our study demonstrated that culture medium is an important factor as well, since there was no calcium deposition in the control group of other treatments.

Low glucose DMEM is a medium with caloric restriction, only 1g/L of glucose, and ideal concentrations of phosphate and calcium for multipotent cells culture, however it is also unique for possessing four times the quantity of amino acids and vitamins. When compared to MEM and M199, which has the same glucose, phosphate and calcium concentrations, low glucose DMEM was superior in this study, demonstrating the positive effect caused by the superior concentration of amino acids and vitamins in maintaining cellular multipotency. RPMI 1640 induced a spontaneous osteogenic differentiation, which probably hindered the adipogenic differentiation in cells isolated in this medium, and therefore does not preserve multipotency of cells from ovine Wharton's jelly.

Based on our findings, cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cord present different potentials for *in vitro* differentiation depending on the culture medium used in isolation and maintenance. Low glucose DMEM was the most adequate medium for culture, providing the most intense cellular proliferation and best results in adipogenic, chondrogenic and osteogenic *in vitro* differentiations.

CONCLUSIONS

Cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cords collected at natural birth possess fibroblastic morphology and the capacity for *in vitro* differentiation into adipogenic, chondrogenic and osteogenic cell lines.

Cellular culture medium modulates behavior of these cells and is a major factor for proliferation and maintenance of multipotency, for which low glucose DMEM is the most adequate for transportation and culture of cells from Wharton's jelly of ovine umbilical cords.

Acknowledgments- The authors would like to thank CNPq (Universal proc. 487425/2012-0) and AUXPE-PROEX 533/2014 for the financial support, and to CAPES for granting the doctoral scholarship.

Conflict of interest statement.- The authors have no competing interests.

REFERENCES

- Alliot-Licht B., Hurtrel D. & Gregoire M. 2001. Characterization of α -smooth muscle actin positive cells in mineralized human dental pulp cultures. *Arch. Oral Biol.* 46:221-228.
- Awad H.A., Butler D.L., Harris M.T., Ibrahim R.E., Wu Y., Young R.G., Kadiyala S. & Boivin G.P. 2000. In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: Effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J. Biomed. Mater. Res.* 51:233-240.
- Azari O., Babaei H., Derakhshanfar A., Nematollahi-Mahani S.N., Poursahebi R. & Moshrefi M. 2011. Effects of transplanted mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly of caprine umbilical cord on cutaneous wound healing; histopathological evaluation. *Vet. Res. Commun.* 35(4):211-22.
- Baksh D., Yao, R., & Tuan, R.S. 2007. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25(6):1384-1392.
- Baksh D., Song L. & Tuan R. S. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 8(03):301-316.
- Carswell K.A., Lee M., & Fried S.K. 2012. Culture of isolated human adipocytes and isolated adipose tissue. *Methods Mol. Biol.* 806:203-214.
- Colosimo A., Russo V., Mauro A., Curini V., Marchisio M., Bernabò N., Alfonsi M., Mattioli M. & Barboni B. 2013. Prolonged *in vitro* expansion partially affects phenotypic features and osteogenic potential of ovine amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* 15(8):930-950.
- Condic M.L. & Rao M. 2010. Alternative sources of pluripotent stem cells: Ethical and scientific issues revisited. *Stem Cells Dev.* 19(8):1121-1129.
- Cottrill, C.P., Archer, C.W., Hornbruch, A., Wolpert, L. 1987. The differentiation of normal and muscle-free distal chick limb bud mesenchyme in micromass culture. *Dev. Biol.* 119:143-15b.
- Cottrill, C.P., Archer, C.W. & Wolpert, L. 1987. Cell sorting and chondrogenic aggregate formation in micromass culture. *Dev. Bio.* 122:503-515a.

- De Vita B., Campos L.L., Listoni A.J., Maia L., Freitas N.P.P., Alvarenga F.L. & Prestes N.C. 2012. Anexos fetais: Uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. *Vet. e Zootec.* 19(1):008-022.
- Fadel L., Viana B.R., Feitosa M.L., Ercolin A.C., Roballo K.C., Casals J.B., Pieri N.C., Meirelles F.V., Martins D.S., Miglino M.A. & Ambrosio C.E. 2011. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. *Acta Cir. Bras.* 26:267-273.
- Fauza D.O., Jennings R.W., Teng Y.D. & Snyder E.Y. 2008. Neural stem cell delivery to the spinal cord in an ovine model of fetal surgery for spina bifida. *Surgery*, 144:367-373.
- Fong C.Y., Richards M., Manasi N., Biswas A. & Bongso A. 2007. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. *Reprod. BioMedicine Online* 15(6):708-718.
- Forraz N. & McGuckin C.P. 2010. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.* 44(1):60-69.
- Guo X., Wang C., Duan C., Descamps M., Zhao Q., Dong L., Lu S., Anselme K., Lu J. & Song Y.Q. 2004. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng.* 10:1830-1840.
- Gronthos S., Mrozik K., Shi S. & Bartold P. M. 2006. Ovine periodontal ligament stem cells: Isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif. Tissue Int.* 79:310-317.
- Hendijani F., Sadeghi-Aliabadi H. & Javanmard S.H. 2014. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank* 15:555-565.
- Iacono E., Brunori L., Pirrone A., Pagliaro P.P., Ricci F., Tazzari P.L. & Merlo B. 2012. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reprod.* 143:455-468.
- Iacono E., Rossi B. & Merlo B. 2015. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: An update on their features and clinical application. *Reprod. Dom. Anim.* 50:353-364.
- Jahroomishirazi R., Bader A., Ebert S., Schmidt C., Sedaghati B., Schulz-Siegmund M. & Zscharnack M. 2015. Isolation and characterization of cd271⁺ stem cells derived from sheep dermal skin. *Cells Tissues Organs.* 200(2):141-152.
- Janderová L., McNeil M., Murrell A.N., Mynatt R.L. & Smith S.R. 2003. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res.* 11:65-74.
- Kobayashi K., Kubota T. & Aso T. 1998. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly Expression and localization of α -smooth muscle actin. *Early Human Develop.* 51:223-233.
- Lima S.A.F., Wodewotzky T., Lima-Neto J.F., Beltrão-Braga P.C.B. 3 & Alvarenga F.C.L. 2012. Diferenciação in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães em precursores osteogênicos. *Pesq. Vet. Bras.* 32(5):463-469.
- Liu L., DiGirolamo C.M., Navarro P.A.A.S., Blasco M.A. & Keefe D.L. 2004. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 294(1):1-8.
- Liu Y.K., Lu Q.Z., Pei R., Ji H.J., Zhou G.S., Zhao X.L., Tang R.K. & Zhang M. 2009. The effect of extracellular calcium and inorganic phosphate on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro: implication for bone tissue engineering. *Biomed. Mater.* 4:1-8.
- Lopez-Cazaux S., Bluteau G., Magne D., Lieubeau B., Guicheux J. & Alliot-Licht B. 2006. Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp derived cells: Technical Note. *Euro. Cells and Mater.* 11:35-42.
- Lyahyai J., Mediano D.R., Ranera B., Sanz A., Remacha A.R., Bolea R., Zaragoza P., Rodellar C. & Martín-Burriel I. 2012. Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet. Res.* 8:169.
- Maciel B.B., Rebelatto C.L.K., Brofman P.R.S., Brito H.F.V., Patricio L.F.L., Cruz M.A. & Locatelli-Dittrich R. 2014. Morphology and morphometry of feline bone marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. *Pesq. Vet. Bras.* 34(11):1127-1134.
- Miura T. & Shiota K. 2000. Extracellular matrix environment influences chondrogenic pattern formation in limb bud micromass culture: Experimental verification of theoretical models. *The Anat. Rec.* 258:100-107.
- Mccarty R.C., Gronthos S., Zannettino A.C., Foster B.K. & Xian C.J. 2009. characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 219: 324-333.

- Morgan J.F. & Morton H.J. 1956. The nutrition of animal tissues cultivated in vitro. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.* 3(2).
- Murphy S.V. & Atala A. 2013. Amniotic Fluid and Placental Membranes: Unexpected Sources of Highly Multipotent Cells. *Semin. Reprod. Med.* 31(01):62-68.
- Passeri S., Nocchi F., Lamanna R., Lapi S., Miragliotta V., Giannessi E., Abramo F., Stornelli M.R., Matarazzo M., Plenteda D., Urciuoli P., Scatena F., Coli A. 2009. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Biol. Int.* 33:100-105.
- Pratheesh M.D., Gade N.E., Dubey P.K., Nath A., Sivanarayanan T.B., Madhu D.N., Sharma., Amarpal, Saikumar G. & Sharma G.T. 2014. Molecular characterization and xenogenic application of Wharton's jelly derived caprine mesenchymal stem cells. *Vet. Res. Commun.* 38:139-148.
- Psaltis P.J., Carbone A., Nelson A.J., Lau D.H., Jantzen T., Manavis J., Williams K., Itescu S., Sanders P., Gronthos S., Zannettino A.C. & Worthley S.G. 2010. Reparative effects of allogeneic mesenchymal precursor cells delivered transendocardially in experimental nonischemic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc. Interv.* 3:974-983.
- Ribeiro G., Massoco C.O. & Lacerda Neto J.C. 2013. Culture of equine bone marrow mononuclear fraction and adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells in different media. *Pesq. Vet. Bras.* 33(1):20-24.
- Scheerlinck J.P., Snibson K.J., Bowles V.M. & Sutton P. 2008. Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends Biotechnol.* 26:259-266.
- Sigalas E., Regan J.D., Kramer P.R., Witherspoon D.E. & Opperman L.A. 2004. Survival of human periodontal ligament cells in media proposed for transport of avulsed teeth. *Dent. Traumatol.* 20: 21-28.
- Sill B., Roy N., Hammer P.E., Triedman J.K., Sigg D.C., Kelly M.F., Nedder A., Dunning P.S. & Cowan D.B. 2011. Development of an ovine model of pediatric complete heart block. *J. Surg. Res.* 166: 103-108.
- Sreekumar T.R., Ansari M.M., Chandra V. & Sharma G. T. 2014. Isolation and characterization of buffalo Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells. *J. Stem Cell Res.* 4:207.
- Stolzing A., Coleman N. & Scutt A. 2006. Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuv. Res.* 9(1):31-35.
- Taghizadeh R.R., Cetrulo K.J. & Cetrulo C.L. 2011. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta* 32:311-315.
- Wu X., Lin M., Li Y., Zhao X. & Yan F. 2009. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells *Cytotechnology* 59:103-111.
- Zhang L., Su P., Xu C., Yang J., Yu W. & Huang D. 2010. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol. Lett.* 32:1339-1346.

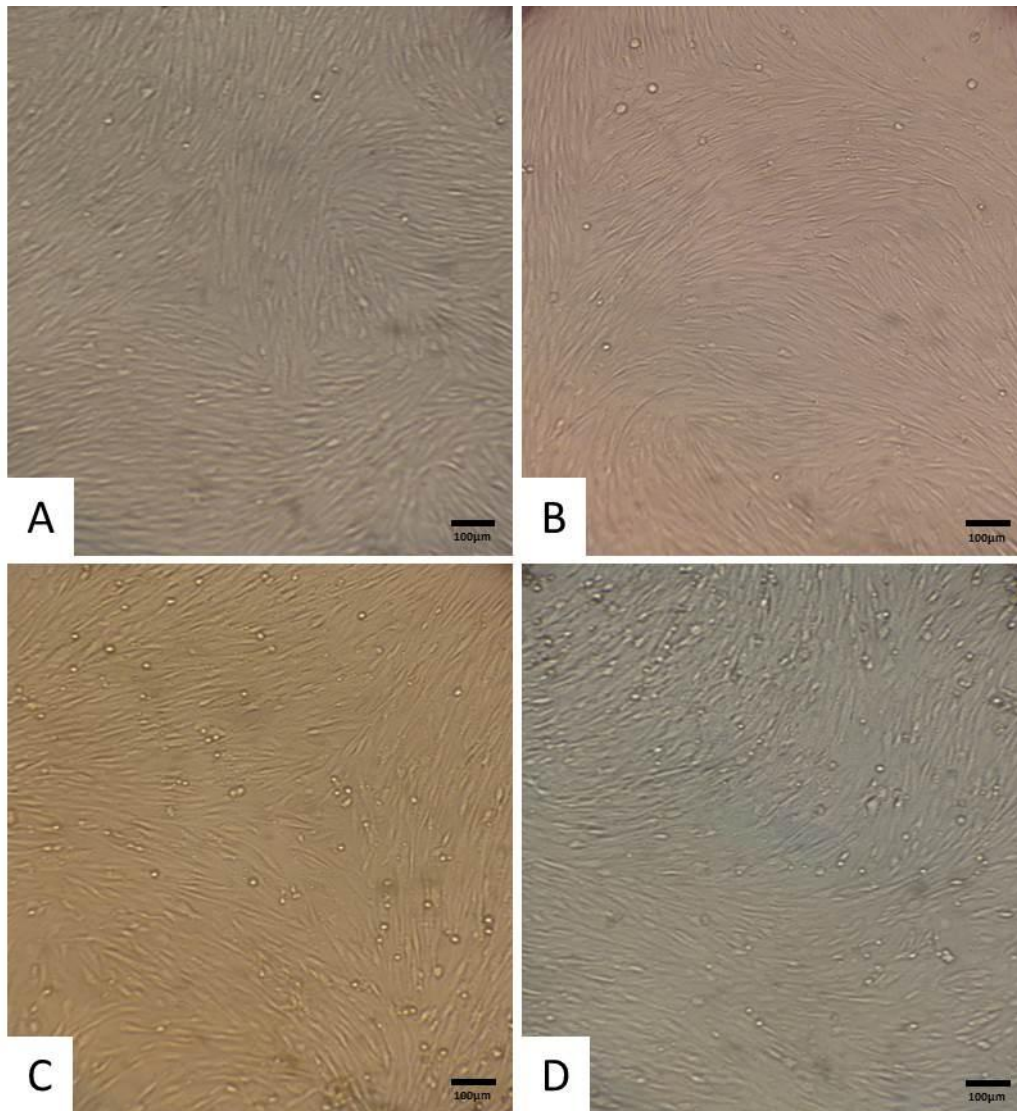


Fig.1. Morphology of ovine WJUC cells at day 16 of culture in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), P0, 100x, Bars: 100µm.

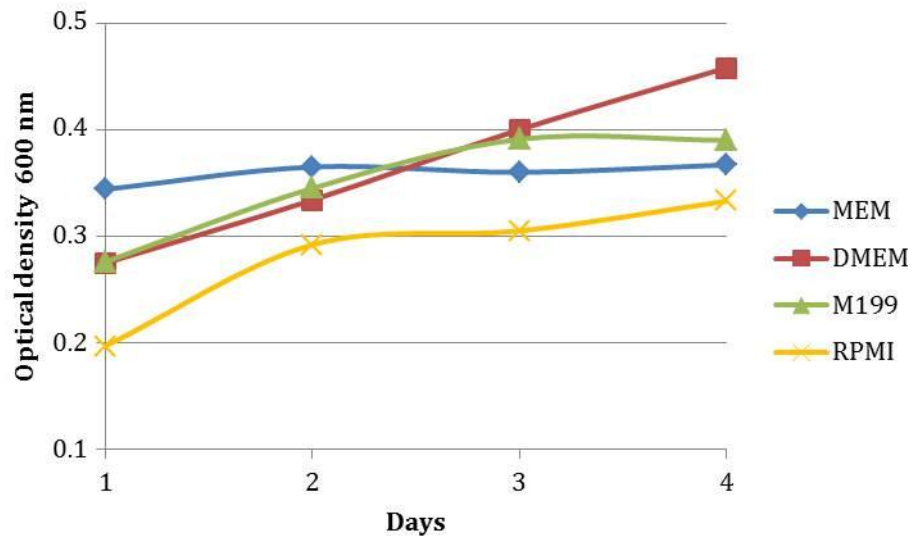


Fig.2. Viability assessment with MTT test of ovine WJUC cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 during four days.

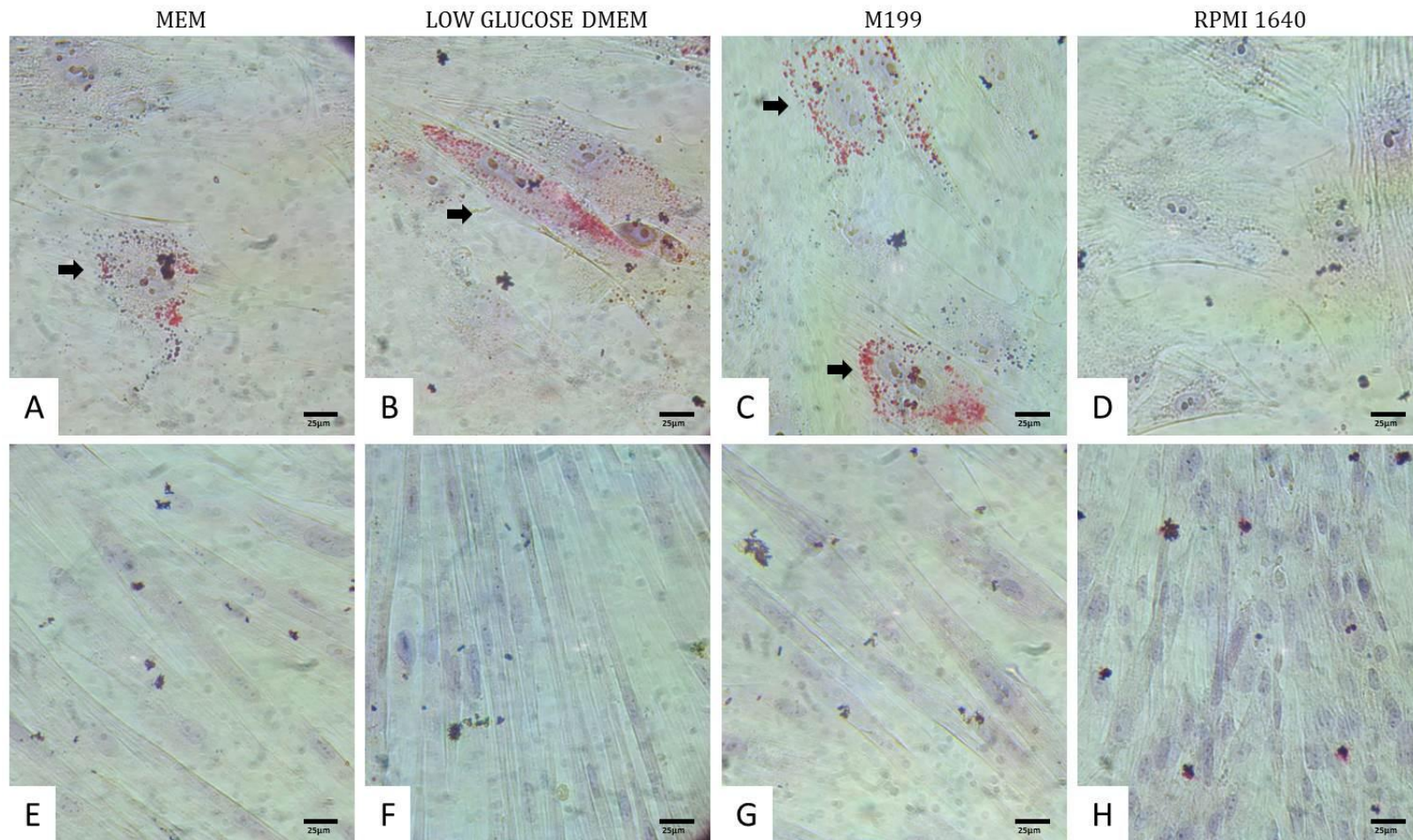


Fig.3. Adipogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the visualization of intracytoplasmic lipid drops stained in red (arrows). Isolated cells MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI (D) exposed to adipogenesis-inducing medium. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in MEM (E), low glucose DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H), P2, day 14, 400x. Stained with Oil Red O and counterstained with hematoxylin, Bars: 25µm.

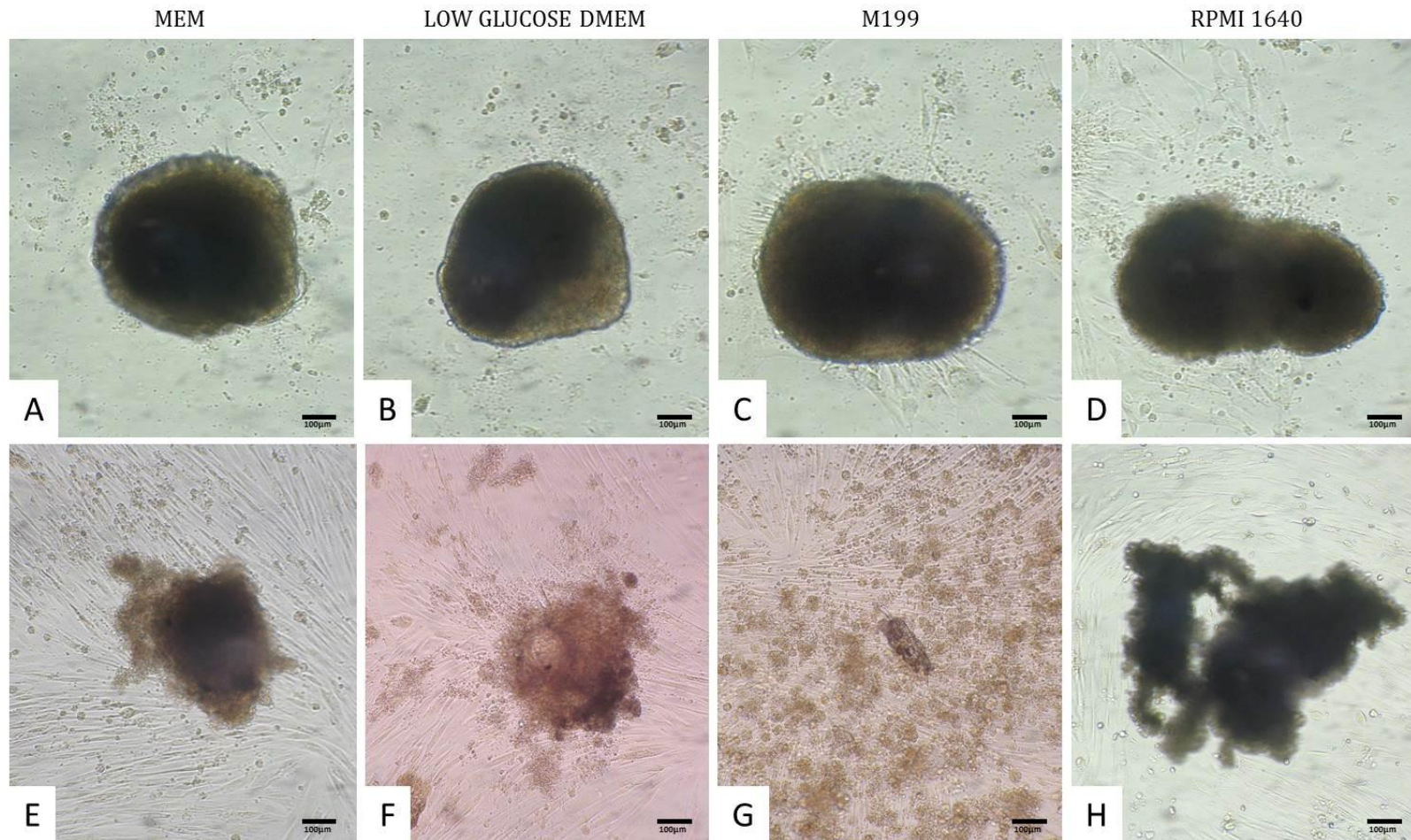


Fig.4. Micromasses of ovine WJUC cells isolated in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), and exposed to chondrogenesis-inducing medium. Control wells with micromasses of ovine WJUC cells not induced to differentiation cultured in MEM (E), low glucose DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H), P2, day 16, 100x, Bars: 100µm.

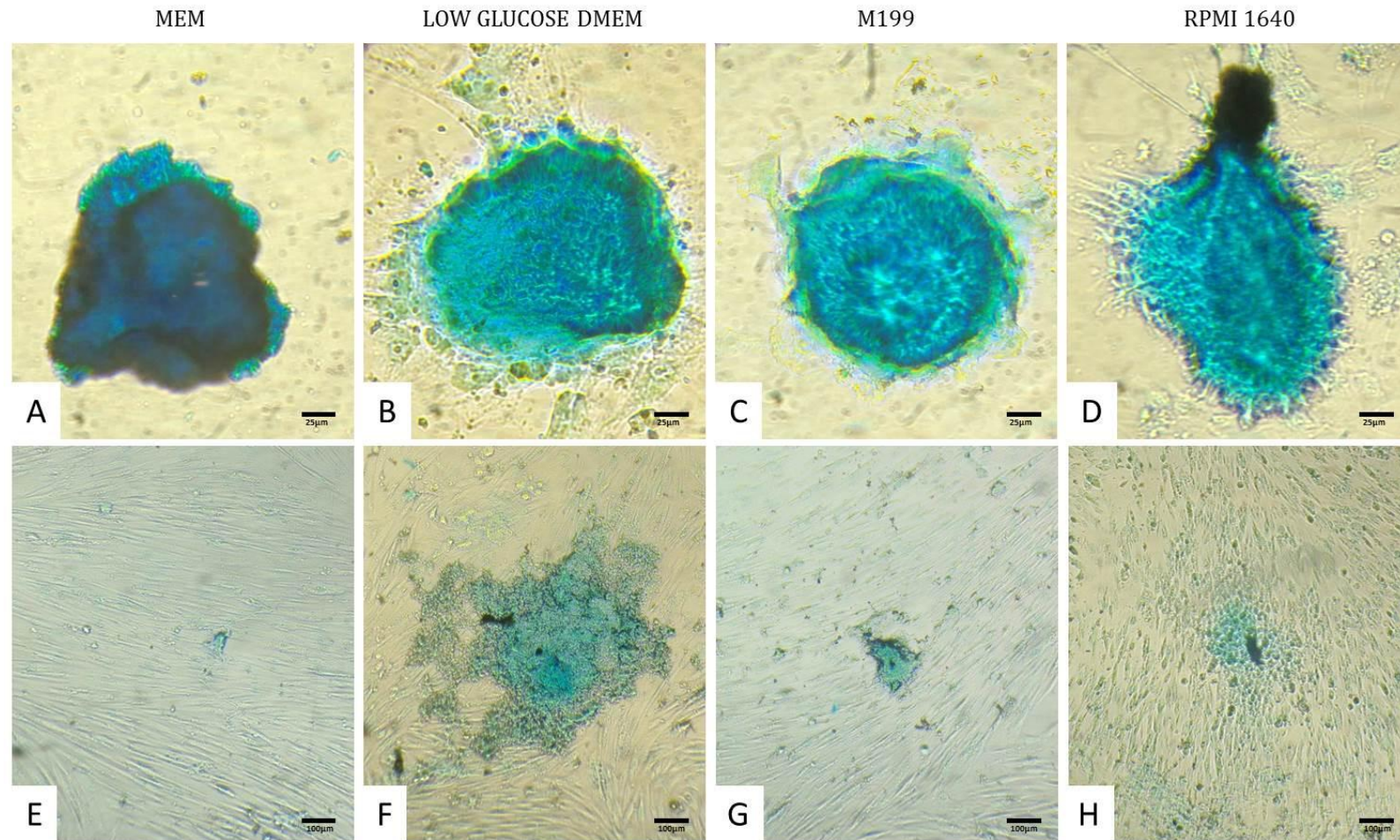


Fig.5. Chondrogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the visualization of a blue coloration, which indicates proteoglycan synthesis by chondrocytes. Chondrogenic islands formed by cells isolated in MEM (A), low glucose DMEM (B), M199 (C) and RPMI 1640 (D), and exposed to chondrogenesis-inducing medium, P2, day 16, 400x, Bars: 25µm. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in MEM (E), low glucose DMEM (F), M199 (G) and RPMI 1640 (H). P2, day 16, 100x, Alcian Blue stain, Bars: 100µm.

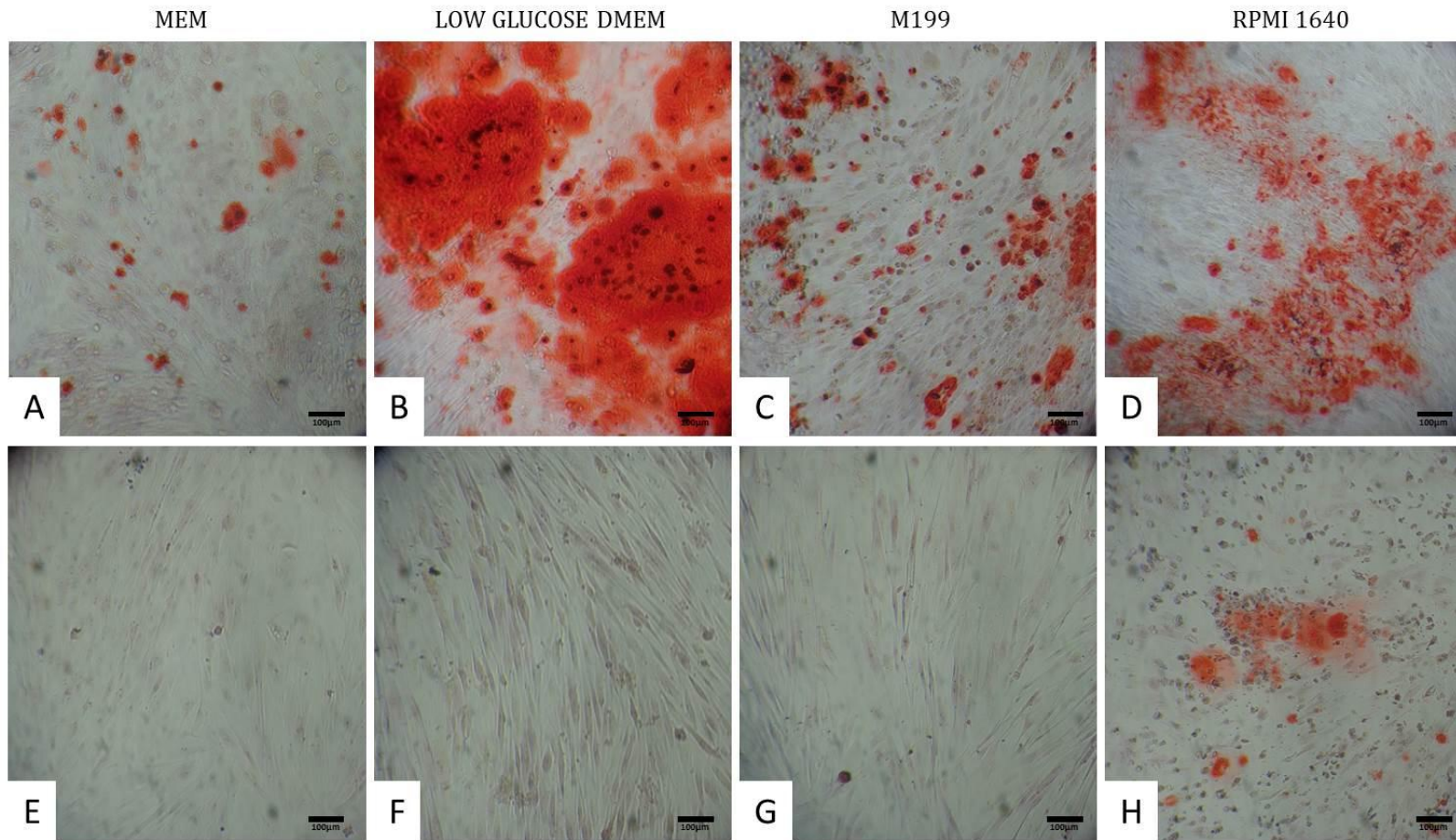


Fig.6. Osteogenic differentiation of ovine WJUC cells confirmed by the red coloration, which indicates extracellular calcium deposits by osteocytes. Cells isolated in (A) MEM, (B) low glucose DMEM, (C) M199 and (D) RPMI 1640, and exposed to osteogenesis-inducing medium. Control wells with ovine WJUC cells not induced to differentiation and cultured in (E) MEM, (F) low glucose DMEM and (G) M199. Control well with ovine WJUC cells presenting a not induced and, therefore, spontaneous differentiation in (H) RPMI 1640 medium. P2, day 21, 100x, Alizarin Red S stain, Bars: 100µm.

Table 1. Means and total score classification assigned to fibroblastic cell quantities around Wharton's jelly explants from ovine umbilical cords at day four of culture with samples transported in MEM, low glucose DMEM, RPMI 1640, M199, PBS and S

| Transport media | Culture media | | | | Classification | |
|-----------------|---------------------------|------|------|------|----------------|-------|
| | Individual classification | | | | TOTAL | MEANS |
| | MEM | DMEM | M199 | RPMI | | |
| MEM | 8 | 11.5 | 21.5 | 8 | 49 | 12.2 |
| DMEM | 14 | 19.5 | 21.5 | 23.5 | 78.5* | 19.6* |
| RPMI | 11.5 | 16.5 | 23.5 | 16.5 | 68 | 17.0 |
| M199 | 16.7 | 5 | 19.5 | 5 | 46.2 | 11.5 |
| PBS | 8 | 16.5 | 1 | 2.5 | 28 | 7.0 |
| S | 11.5 | 11.5 | 5 | 2.5 | 30.5 | 7.6 |

*Statistically different. (p<0.10)

Table 2. Growth analyzed by absorbance percentage of MTT test results performed in fibroblastic cells from ovine WJUC cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI 1640 during four days

| Day | MEM | | Low Glucose DMEM | | M199 | | RPMI | |
|-----|-----------|--------------------|------------------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| | ABS means | Growth % | ABS means | Growth % | ABS means | Growth % | ABS means | Growth % |
| 01 | 0.344 | - | 0.275 | - | 0.276 | - | 0.197 | - |
| 02 | 0.365 | 5.87 ^a | 0.334 | 21.37 ^a | 0.345 | 25.00 ^a | 0.262 | 33.08 ^a |
| 03 | 0.360 | -1.35 ^b | 0.400 | 19.67 ^b | 0.391 | 13.14 ^b | 0.305 | 16.34 ^b |
| 04 | 0.367 | 1.99 ^c | 0.458 | 14.36 ^b | 0.390 | -0.33 ^c | 0.333 | 9.18 ^c |

ABS = Absorbance

* Distinct letters in sequence within columns mark statistical difference. (p<0.05)

8 CAPITULO 3

Wharton's jelly cells from sheep umbilical cord maintained with different culture media are permissive to *in vitro* infection by Small Ruminant Lentiviruses

Células da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino mantidas em diferentes meios de cultivo são permissivas à infecção *in vitro* por Lentivirus de Pequenos Ruminantes

Periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.68, n.5, p.1292-

1300, 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar células da geleia de Wharton do cordão umbilical (GWCU) ovino coletado por ocasião do parto natural, utilizando diferentes meios de cultivo, além de relatar, pela primeira vez, sua permissividade à infecção *in vitro* por Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPRs). Dez cordões umbilicais foram coletados de ovelhas híginas e soronegativas para LVPRs pelo teste de Imunodifusão em gel de agarose (IDGA). De cada cordão, explantes foram cultivados em quatro meios distintos que consistiram em MEM, DMEM baixa glicose, meio 199 e RPMI-1640, todos acrescidos de 10% de soro fetal bovino em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂ a 37 °C. A permissividade de infecção das células GWCU ovino foi testada frente às cepas CAEV-Cork e MVV-K1514, inoculando-se 0,1 MOI de cada cepa viral e corando as monocamadas com May Grunwald Giemsa para visualização do efeito citopático. Foram obtidos quatro sobrenadantes CAEV-Cork e quatro MVV-K1514, provenientes do cultivo de células GWCU ovino infectadas por 21 dias em meios distintos, dos quais foram realizadas titulação em membrana sinovial caprina e a extração do DNA pró-viral para realização de *nested*-PCR e eletroforese em gel de agarose a 2%. Os resultados demonstraram a presença de efeito citopático na infecção *in vitro* tanto por CAEV-Cork como por MVV-K1514 em todos os meios de cultivo, sendo visualizados sincícios e lise celular em microscópio invertido. A *nested*-PCR detectou o DNA pró-viral tanto do CAEV-Cork como do MVV-K1514 em todos os sobrenadantes. Os sobrenadantes contendo o vírus CAEV-Cork apresentaram títulos em TCID₅₀/mL de 10^{5,5} em MEM, 10^{4,0} em DMEM baixa glicose, 10^{5,0} em meio 199 e 10^{5,7} em RPMI-1640. Os sobrenadantes contendo o vírus MVV-K1514 apresentaram título em TCID₅₀/mL de 10^{4,3} em MEM, 10^{3,5} em DMEM baixa glicose, 10^{4,7} em meio 199 e 10^{3,5} em RPMI-1640. Células GWCU ovinas são permissivas à infecção *in vitro* pelos Lentivírus de Pequenos Ruminantes CAEV-Cork e MVV-K1514.

Palavras-chave: CAEV-Cork, MVV-K1514, permissividade, infecção *in vitro*

Wharton's jelly cells from sheep umbilical cord maintained with different culture media are permissive to *in vitro* infection by Small Ruminant Lentiviruses

[*Células da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino mantidas em diferentes meios de cultivo são permissivas à infecção in vitro por Lentivirus de Pequenos Ruminantes*]

R.P. Dias¹, R.R. Pinheiro², A. Andrioli², A.C. Farias³, A.L.M. Sousa⁴, D.A.A. Azevedo¹, J.F. Araújo⁴, T.D'A.F. Aguiar¹, M.F.S. Teixeira^{1,5}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - Universidade Estadual do Ceará – Fortaleza, Ceará

²Embrapa Caprinos e Ovinos – Sobral, Ceará

³Faculdades Integradas do Tapajós – Santarém, Pará

⁴Universidade Estadual Vale do Acaraú – Sobral, Ceará

⁵Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

ABSTRACT

This study aimed to isolate cells from the Wharton's jelly of umbilical cord (WJUC) of sheep collected during natural parturition using different culture media, in addition to reporting for the first time the permissiveness of these cells to *in vitro* infection by small ruminant lentiviruses. Ten umbilical cords were collected from healthy sheep. Each cord explants were grown in different media consisting of MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640. The permissiveness of infection of sheep cells from WJUC was tested with CAEV-Cork and MVV-K1514 strains, inoculating 0.1 MOI of each viral strain. Four supernatants from each strain were obtained from WJUC sheep cell cultures infected in different media. The results demonstrated the presence of cytopathic effect after the *in vitro* infection by CAEV-Cork and MVV-K1514 with all of the tested culture media. *Nested-PCR* detected proviral DNA in all supernatants. Supernatants containing CAEV-Cork viruses had TCID₅₀/ml titres of 10^{5.5} in MEM, 10^{4.0} in low glucose DMEM, 10^{5.0} in M199 and 10^{5.7} in RPMI-1640. Supernatants containing the MVV-K1514 virus had TCID₅₀/ml titres of 10^{4.3} in MEM, 10^{3.5} in low-glucose DMEM, 10^{4.7} in M199 and 10^{3.5} in RPMI-1640. Sheep cells from WJUC are permissive to *in vitro* infection by small ruminant lentivirus.

Keywords: CAEV-Cork, MVV-K1514, permissiveness, *in vitro* infection

INTRODUCTION

SRLV are a group of highly heterogenic viruses capable of infecting sheep and goats, causing different clinical manifestations depending on the virulence of the strain involved. In order to control these infections and avoiding their consequences in flocks, periodically performing serologic diagnostics are necessary, using essays with adequate specificity spectrum to identify seropositive animals (Minguijón *et al.*, 2015).

In order to do so, the *in vitro* production of viral proteins is essential due to their use in indirect diagnostic tests. Conventionally, this production is performed with viral replication in permissive cells, which are most frequently extracted from goat synovial membrane (GSM) and choroid plexus, and used to replicate caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) and Maedi-Visna virus (MVV), respectively (OIE, 2008). However, these tissues are usually collected from fetuses or neonates, which are then euthanized to obtain cells with a higher potential for *in vitro* growth.

In this context, using umbilical cord tissue is an alternative that provides cells without harming ethical principles or causing unnecessary suffering in animals, in addition to being an easy source to obtain these cells with an elevated capacity for *in vitro* proliferation (De Vita *et al.*, 2012).

Umbilical cord forms a bond between placenta and fetus. It contains a vein and two arteries surrounded by the Wharton's Jelly (WJ), which are covered by a simple amniotic epithelium. WJ is formed by a mucosal connective tissue composed by mesenchymal cells immersed in a basal substance (Bańkowski *et al.*, 1993).

These cells have elevated potential for many applications and, therefore generated great interest in the genic and cellular therapies, cloning, biotechnological and viral studies (Cardoso *et al.*, 2012a). The permissiveness to infection by bovine herpesvirus type 5 have already been demonstrated in cells collected from bovine WJUC (Cardoso *et al.*, 2012b).

Therefore, this study aimed to isolate sheep cells from Wharton's jelly of umbilical cords (WJUC) collected at natural parturition using different culture media in isolation and maintenance, in addition to first report the permissiveness of these cells to *in vitro* infection by SRLV.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was submitted and approved by the local Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of the State University of Ceará (UECE) with the following protocol number 12776979-0.

Umbilical cords (n=10) were collected from healthy mixed breed sheep from two farms located in Guaiuba city, Ceará State. The animals tested negative for SRLVs by agar gel immunodiffusion test (AGID), using a commercial kit (MVV-AGID, Biovetech®, Brasil) that detects anti-p28 antibodies in ovine serum. At natural parturition, umbilical cords were pinched with sterile hemostatic scissors and cut into sections of 6 to 10cm. Once collected, each cord was washed with sterile PBS added 2% penicillin and streptomycin (P/S) (Gibco™, California) to remove the excess of blood and to disinfect, then placed in 50mL falcon tubes immersed in low glucose DMEM added with 4% P/S and 1% amphotericin B (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Brasil). Tubes were placed in isothermal boxes with recyclable ice (4%) and sent for processing at the Virology Laboratory, State University of Ceará.

Explants from sheep WJUC were cultured in 6-well plates (Kasvi, Brasil) in four distinct media, which were: MEM, low glucose DMEM, medium 199 (M199) and RPMI-1640 (Gibco™, California). To all of these media 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco™, California), 2% P/S and 1% amphotericin B were added and plates were maintained in incubator with humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. When monolayers reached 80% confluence, trypsinization was performed in bottles of 75cm² (Kasvi, Brasil) and the respective medium was replaced every 2 to 3 days.

Permissiveness of sheep cells from WJUC to infection was tested with two SRLVs strains in 6-well plates, in which two wells were inoculated with CAEV-Cork, two with MVV-K1514 and the remaining two were not inoculated, used as negative control for each medium (MEM, low glucose DMEM, M199 or RPMI-1640). The inoculation was performed in monolayers with 90% confluence, which were washed twice with PBS to remove FBS and added 1mL of the respective medium, free of serum, containing 0.1 MOI (100µL of viral supernatant) as an inoculum of each strain and incubated for viral adsorption in humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C for one hour. Then, monolayers were washed with PBS and incubated with the respective medium, added 2% FBS, 2% P/S and 1% amphotericin B. At the end of seven days, the medium was removed from wells, which were then stained with May Grunwald Giemsa and cytopathic effect was

visualized with inverted microscope Olympus CKX41 coupled with camera Olympus Evolt E-330.

Supernatants containing viral particles were produced in 150cm² bottles (Corning, USA) containing monolayers of WJUC-derived sheep cells, inoculated with viral suspension to assess replication of CAEV-Cork and MVV-K1514 in different culture media. When monolayers reached 90% confluence, the medium was removed and two washings were performed with PBS to remove FBS from layers. Then, 15mL of inoculum composed of medium free of FBS and added 200µL of viral suspension containing CAEV-Cork or MVV-K1514 strain was added for one hour in humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. After this period, the inoculum was replaced by 40mL of medium (MEM, low glucose DMEM, M199 or RPMI-1640) containing 2% FBS, 2% P/S and 1% amphotericin B. Every seven days, supernatants were collected and each medium was replaced by the same concentrations of FBS, P/S and amphotericin B as previously mentioned. Therefore, three collections in a 21 days period were performed in which all bottles were frozen and de-frozen at the third collection for cellular lysis and liberation of viral particles. With this methodology, eight supernatants were obtained, which were four CAEV-Cork and four MVV-K1514, each with a distinct medium.

Titration of the eight supernatants containing replicated viral particles in WJUC-derived sheep cells was performed with 10 serial dilutions and four wells for each dilution in 96-well plates (Corning, USA) containing monolayers of GSM cells. Supernatants of CAEV-Cork and MVV-K1514 replicated in GSM were used as standard. Viral titers were calculated according to Reed and Muench (1938) as the highest dilution that after 14 days post inoculation presented syncytia in 50% of inoculated wells and was expressed as the 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID₅₀) by mL of supernatant.

Supernatants were used to extract proviral DNA and PBS 1X in 1:1 was used to centrifuge 4mL of each supernatant at 250g for 5 minutes. Then, superior phase was discarded and the pellet was washed again in PBS in the same previous conditions. Pellet was then resuspended in 2mL of hypertonic buffer for two minutes in room temperature for lysis of cellular cytoplasm, after which centrifugation at 1,100g for 10 minutes was performed. Pellet was resuspended in 2mL of PBS and centrifuged at 1,100g for 10 minutes. Then, sediment was resuspended in 250mL of PCR buffer, homogenized and treated with proteinase K (0.1mg/mL) for 60 minutes at 56°C. The

enzyme was inactivated with boiling water at 100°C for 10 minutes and maintained refrigerated at -20°C until use.

DNA amplification was performed in two rounds of PCR. At first, Master Mix (MM) was prepared according to the amount of samples, using 36.35µL of DNase free water, PCR Kit [5µL Tris HCl + KCl pH8.0; 3µL MgCl₂; 0.25µL dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)], 1µL of each primer for gag gene, primer 1 (CAAGCAGCAGGAGGGAGAAGCTG) and primer 2 (TCCTACCCCCATAATTGATCCAC) and 0.4µL of Taq DNA polymerase. Then, 47µL of the MM was transferred to each tube and 3µL of sample was added, including positive and negative controls. Samples were amplified (Mastercycler egradientS eppendorf® realplex, Applied BioSystems, USA) with a four stage setup. At the first stage, five minutes at 94°C, then a second stage of 35 cycles of the following sequence: 94°C for one minute (denaturation), 56°C for one minute (annealing), 72°C for 45s (extension). In the third stage, the temperature was maintained at 72°C for seven minutes and in the last stage, amplified samples were maintained at 4°C. For the second round, MM was again prepared with 38.35µL of DNase free water, PCR kit, Taq DNA polymerase and primers 3 (5'GTTCCAGCAACTGCAAACAGTAGCAATG3') and 4 (5'ACCTTTCTGCTTCTTCATTTAATTTCCC3') also for the gag gene. Then, 49µL of MM was transferred to tubes with 1µL of each product from the first round and again submitted to amplification. Following, PCR products were submitted to 2% agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide (2.5µL in 50mL) and buffer (53.90g of trizma base; 3.72g of EDTA ethylenediaminetetraacetic acid; 27.5g of boric acid) (BARLOUGH et al, 1994; SALTARELLI et al, 1990).

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, *in vitro* culture of monolayers of fibroblastoid cells from sheep WJUC obtained at natural parturition through a simple method of explant culture in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640 was possible.

Cells began to migrate from explants to the plate surface after four days of culture (Fig. 1D) presenting similar growth in all four media used and subculture was possible after eight days, when monolayers reached 80% confluence.

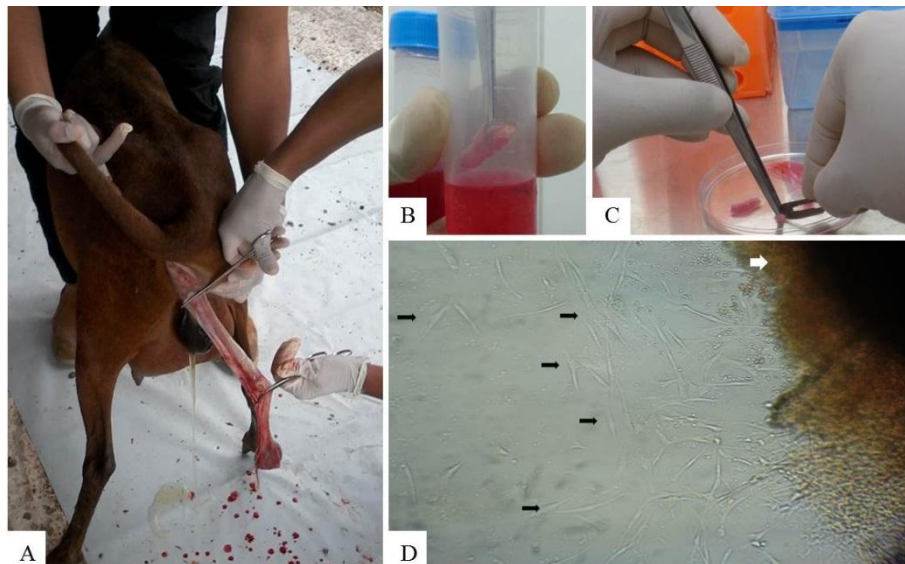


Figure. 1 – Collection of sheep umbilical cord at natural parturition (A), transport (B), explantation (C) and culture of primary cells collected from sheep Wharton's jelly of umbilical cord (white arrow: sheep WJUC explant border; black arrows: fusiform cells migrating to culture plate), P0, day 4, 100x.

Hendijani *et al.* (2014) reported with explant technique applied in human WJUC that cells began to migrate to plate surface 13 days after the beginning of culture and reached 80 to 100% confluence in 22 days. Caprine fibroblastoid cells are evident in the second culture day, reaching enough confluence for trypsinization after 10 days of culture (Moshrefi *et al.*, 2010). Passeri *et al.* (2009) using enzymatic technique exposed umbilical cord tissue from mares to collagenase and reported the formation of individual fusiform cells with three to four days of culture and colonies in five days, performing subculture in seven days after initial seeding.

Although explant culture method requires a longer period to obtain cells from the collected tissue, this technique provides more pure and less heterogenic cells with high proliferation rates (Salehinejad *et al.*, 2012). In addition, the greater volume of cells in the umbilical cord and the easy manipulation, theoretically increase the number of cells that can be harvested, which provides a substantial number that can be obtained without the need for long-term culture or a vast *ex vivo* expansion (Iacono *et al.*, 2015).

The presence of syncytia containing more than four nuclei was demonstrated in both *in vitro* infection by CAEV-Cork and MVV-K1514 in WJUC-derived sheep cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640 (Fig. 2). In addition, sparse areas in monolayers, lytic effect and cellular death characterized by the presence of cells in suspension were observed.

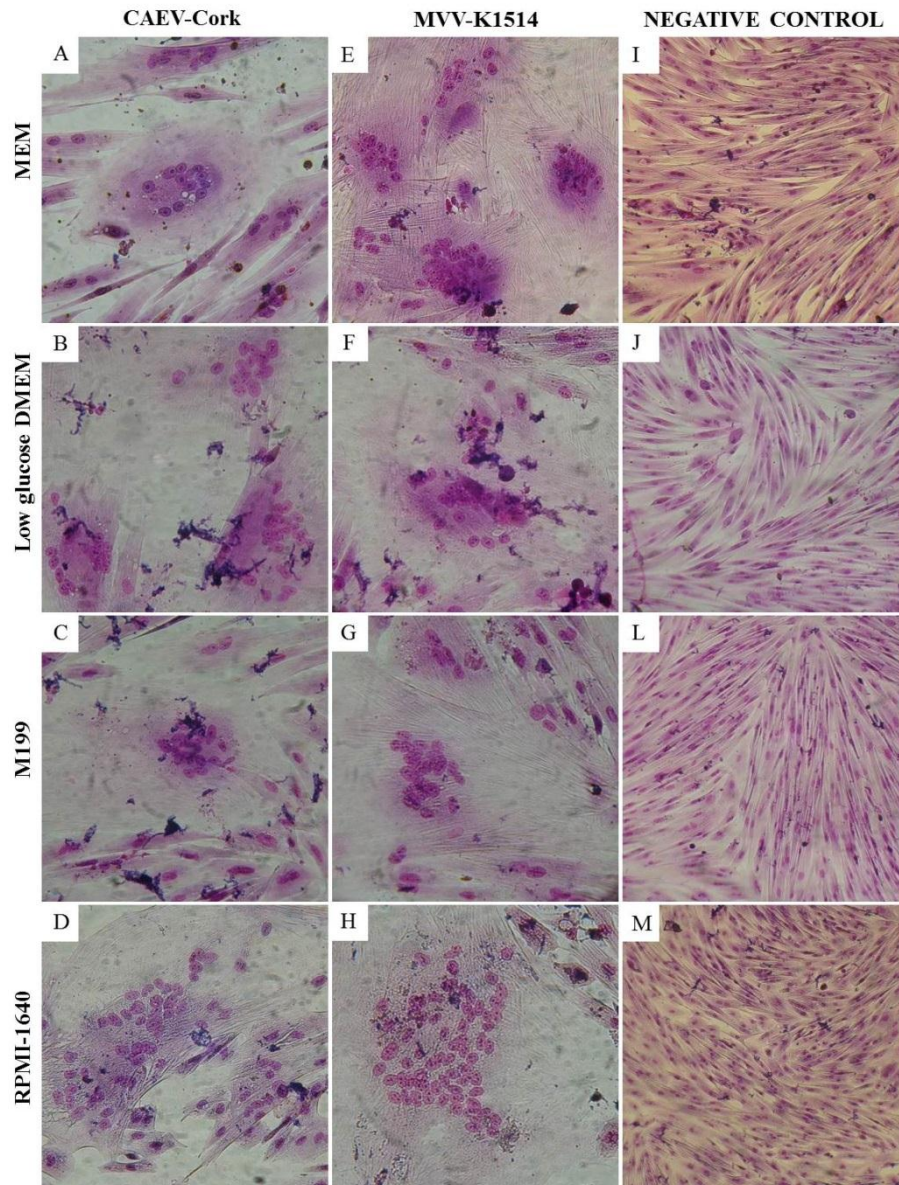


Figure 2. Cytopathic effect of CAEV-Cork (A, B, C, D) and MVV-K1514 (E, F, G, H) in WJUC-derived sheep cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640. P2, 400x. Negative control of sheep cells from WJUC (I, J, L, M). P2, 100x, stained with May Grunwald Giemsa.

Syncytial formation caused by *in vitro* inoculation with CAEV have been previously described in GSM, which is similar to what is caused by MVV. In this case, cells fuse as a result of direct interaction with input virus and this behavior is termed fusion from without, which occurs before viral replication (Ellis *et al.*, 1985).

In addition to the presence of syncytia, lytic effect was also observed with the destruction of cellular monolayers and the most intense result was caused by CAEV-Cork in WJUC-derived sheep cells cultured in RPMI-1640 with the destruction of approximately 80% of monolayers three days post infection (Fig. 3). All other

treatments presented lysis, however both strains presented syncytial formation as the predominant cytopathic effect having minor lytic character until the seven days post infection.

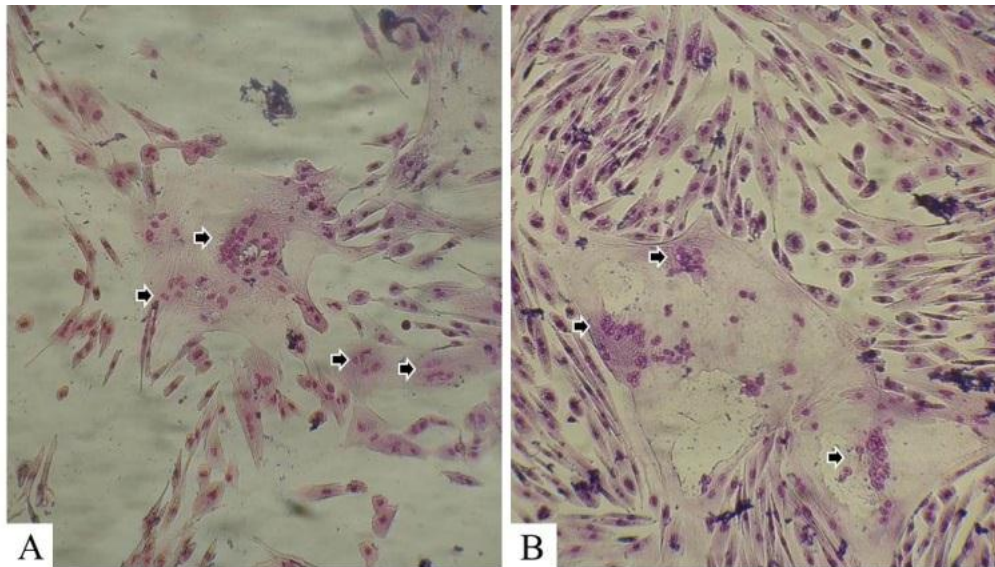


Figure 3. Cytopathic effect in WJUC-derived sheep cells cultured in RPMI-1640 after three days post infection. (A) Infection with CAEV-Cork generating intense lysis in monolayer. (B) Infection with MVV-K1514 in initial phase of lysis in monolayer of cells. Arrows: Syncytia. 100x. May Grunwald Giemsa.

Artificially infected sheep cells from WJUC hosted proviral genome as detected by *nested*-PCR. This was confirmed with the visualization of an 187pb product amplified from the targeted-sequence of proviral DNA (Fig. 4), which occurred in both strains, CAEV-Cork and MVV-K1514, producing infectious viruses to the culture media.

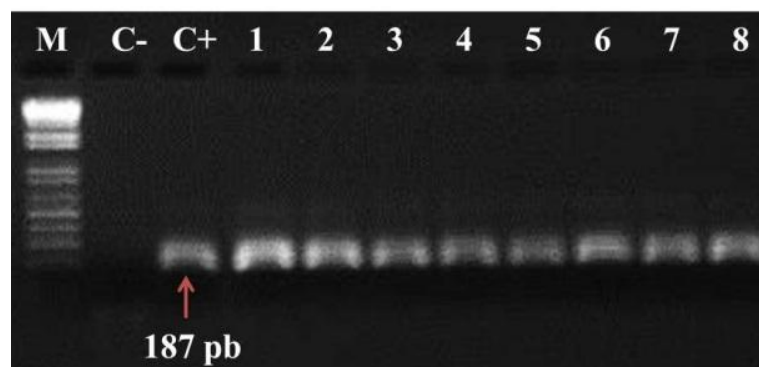


Figure 4. Amplification products of 187pb compatible with the targeted-sequence of CAEV proviral DNA in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. M (DNA ladder 100pb Marker); C- (negative control); C+ (positive control); 1, 2, 3 and 4 (positive samples from supernatant of umbilical cord sheep cells infected with CAEV-Cork and cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640, respectively); 5, 6, 7

and 8 (positive samples from supernatant of umbilical cord sheep cells infected with MVV-K1514 and cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640, respectively).

To demonstrate that the released viral proteins of CAEV-Cork and MVV-K1514 were newly mounted and infectious, culture media used in infected sheep cells from WJUC were collected in the 21 days period and used in the viral titration assay with GSM, estimating the approximate amount of infectious viral particles.

Different titers were observed for the same viral strains inoculated in WJUC-derived sheep cells cultured in different media and CAEV-Cork in RPMI-1640 medium was the most elevated ($10^{5.7}$ TCID₅₀/mL), followed by MVV-K1514 in M199 ($10^{4.7}$ TCID₅₀/mL). Inferior titers were obtained when low glucose DMEM medium was used in maintenance with titers of $10^{4.0}$ TCID₅₀/mL of CAEV-Cork strain and $10^{3.5}$ TCID₅₀/mL of MVV-K1514 strain.

Comparing viral titers obtained in each medium revealed that CAEV-Cork were more elevated than those obtained with MVV-K1514 infection in every case (Tab. 1)

Table 1. Titration of CAEV-Cork and MVV-K1514 replicated in umbilical cord sheep cells cultured in MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640.

| Supernatant medium | TCID ₅₀ /mL titers | |
|--------------------|-------------------------------|------------|
| | CAEV-Cork | MVV-K1514 |
| MEM | $10^{5.5}$ | $10^{4.3}$ |
| Low glucose DMEM | $10^{4.0}$ | $10^{3.5}$ |
| M199 | $10^{5.0}$ | $10^{4.7}$ |
| RPMI-1640 | $10^{5.7}$ | $10^{3.5}$ |

According to Ellis *et al.* (1985), GSM cells form syncytia only when in contact with intact viral particles, excluding the possibility that this cytopathic effect occurs due to intracellular precursors of a fusion protein or cellular products contained in the medium. This way, the cytopathic effect visualized in monolayer of GSM cells reported in this study demonstrates the presence of intact viral particles in supernatant of infected sheep cells from WJUC (Fig. 5).

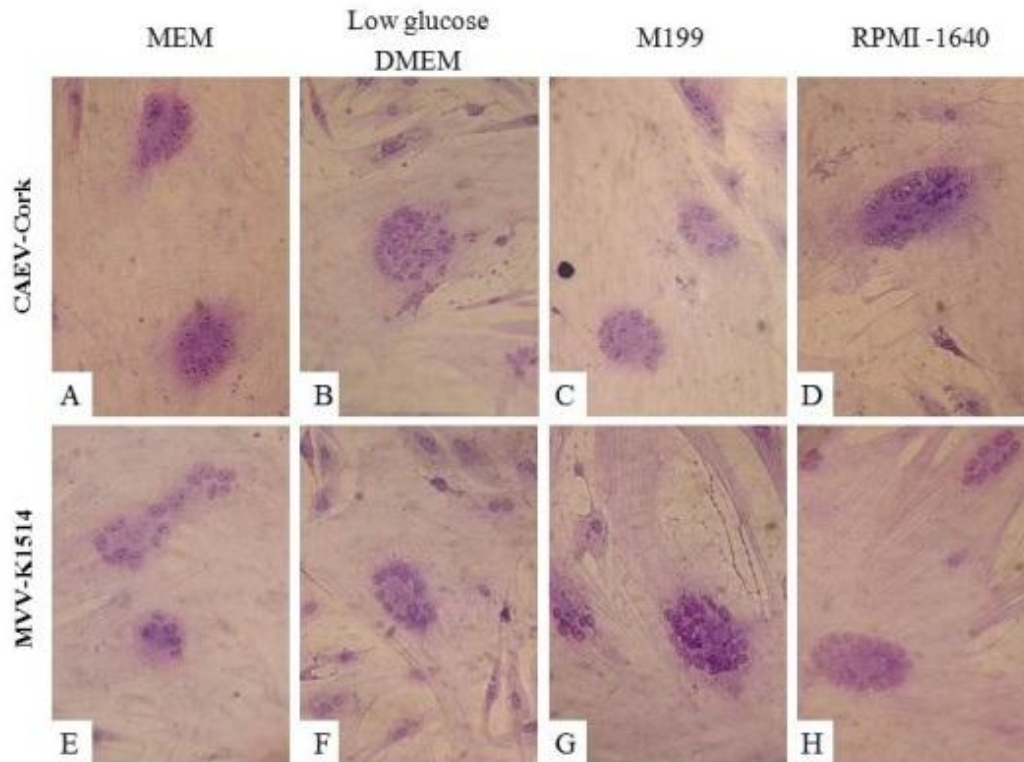


Figure 5. Cytopathic effect in GSM cells. Viral titration of CAEV-Cork (A, B, C, D) and MVV-1514 (E, F, G, H) replicated in sheep cells from WJUC in different media. Dilution 10^{-3} , 400x, Crystal Violet staining.

Supernatants of GSM cells infected with CAEV-Cork and MVV-1514 were used as standards and viral titration was performed. These results were similar to the titers obtained with the infected sheep cells from WJUC, demonstrating considerable potential for the viral production necessary for diagnostic applications (Tab. 2).

Table 2. Titration of CAEV-Cork and MVV-K1514 replicated in GSM cells.

| Virus replicated in GSM cells | TCID ₅₀ /mL titer |
|-------------------------------|------------------------------|
| CAEV-Cork | $10^{4.5}$ |
| MVV-K1514 | $10^{4.7}$ |

Demonstrating the *in vitro* permissiveness of sheep cells from WJUC is an important result that adds knowledge, along with other researches, aiming to understand the mechanism of vertical pre-natal transmission of these lentiviruses to the fetus, which have been reported (Cutlip *et al.*, 1981; Brodie *et al.*, 1994). However, the exact

pathway that this transmission occurs is not yet fully understood (Cortez-Romero *et al.*, 2012).

In addition, obtaining satisfactory viral titers for the production of antigens for diagnostic applications aggregate value to sheep umbilical cords, which is a tissue routinely discarded in sheep farming.

CONCLUSION

Cells from sheep WJUC obtained at natural parturition are permissive to infection by CAEV-Cork and MVV-K1514 and present characteristic cytopathic effect. In addition, these cells when infected produce replication when using MEM, low glucose DMEM, M199 and RPMI-1640 as culture media and present a potential for large-scale antigen production in all of these. Additionally, sheep umbilical cord is a viable alternative to avoid using fetus and euthanasia in young animals to obtain cells for *in vitro* replication of SRLVs.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank CNPq (Universal proc. 487425/2012-0) and AUXPE-PROEX 533/2014 for the financial support, EMBRAPA Caprinos e Ovinos for the technical support and to CAPES for granting the doctoral scholarship.

REFERENCES

- BAŃKOWSKI, E.; ROMANOWICZ, L.; JAWORSKI, S. Collagen of the umbilical cord and its alteration in EPH-gestosis. *J. Perinat. Med.* v.21, n.6, p491-498, 1993.
- BARLOUGH, J.; EAST, N.; ROWE, J.D. et al. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis encephalitis virus proviral DNA in blood, milk, and tissues of infected goats. *J. Virol. Methods*, v.50, p.101-113, 1994.
- BRODIE, S.J.; CONCHA-BERMEJILLO, A.; KÖENIG, G.; et al. Maternal factors associated with prenatal transmission of ovine lentivirus. *J. Infect. Dis.*, v.169, n.3, p.653–657, 1994.
- CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F. et al. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotech.*, v.12, n.18, 2012a.

- CARDOSO, T.C.; NOVAIS, J.B.; ANTELLO, T.F. et al. Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine herpesvirus type 5 infections. *BMC Vet. Res.*, v.8, n.242, 2012b.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; JACKSON, T.A. Intrauterine transmission of ovine progressive pneumonia virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.1795–1797, 1981.
- DE VITA, B.; CAMPOS, L.L.; LISTONI, A.J. et al. Anexos fetais: Uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. *Vet. e Zootec.*, v.19, n.1, p.008-022. 2012.
- ELLIS, T.M.; WILCOX G.E.; ROBINSON, W.F. Characteristics of cell fusion induced by a caprine retrovirus. *Arc. Virol.*, v.86, p.263-273, 1985.
- HENDIJANI, F.; SADEGHI-ALIABADI, H.; JAVANMARD, S.H. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell Tissue Bank*, v.15, p.555–565, 2014.
- IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: An update on their features and clinical application. *Reprod. Dom. Anim.*, v.50, p.353–364, 2015.
- MINGUIJÓN E., REINA R., PÉREZ M., et al. Small ruminant lentivirus infections and diseases. *Vet. Microbio.*, v.181, p.75-89, 2015.
- MOSHREFI, M.; BABAEI, H.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S.N. Isolation and characterization of mesenchymal cells isolated from caprine umbilical cord matrix. *Anim. Reprod.*, v.7, n.4, p.367-372, 2010.
- OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.7.3/4. - Caprine arthritis/encephalitis & Maedi-visna, 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.03-04_CAE_MV.pdf>. Acessado em: 1 fev. 2016.
- PASSERI, S.; NOCCHI, F.; LAMANNA, R. et al. Isolation and expansion of equine umbilical cord-derived matrix cells (EUCMCs). *Cell Bio. International*, v.33, p.100-105, 2009.
- SALEHINEJAD, P.; ALITHEEN, N.B.; ALI, A.M. et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *In Vitro Cell. Develop. Bio. Animal*, v.48, n.2, p.75-83, 2012.
- SALTARELLI M., QUERAT G., KONINGS D.A. et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of molecular clones of CAEV which generate infectious virus. *Virology*, v.179, n.1, p.347-364, 1990.

9 CAPÍTULO 4

Cordão umbilical ovino: uma alternativa para a produção de antígenos utilizados no diagnóstico das lentiviroses de pequenos ruminantes

Sheep umbilical cord: an alternative for the production of antigens used in the diagnosis of lentiviruses of small ruminants

A ser submetido ao Periódico Ciência Rural (Qualis B1).

Resumo

Este trabalho teve como objetivo realizar a imunodifusão de gel de agarose (IDGA) para pesquisa de anticorpos anti-CAEV com antígenos de lentivirus de pequenos ruminantes produzidos em células do cordão umbilical ovino. Cordões umbilicais foram coletados ao parto natural, e do tecido foram realizados *explants* que foram cultivados *in vitro* em meio DMEM baixa glicose acrescidos de 10% de soro fetal bovino. Os vírus CAEV-Cork e MVV-K1514 foram utilizados para a inoculação das monocamadas celulares. Os sobrenadantes contendo partículas virais foram coletados e concentrados 100 vezes em sistema AMICON e liofilização. Cada antígeno foi titulado em gel de agarose e testado frente a 199 soros caprinos previamente diagnosticados por Western Blot e um Kit comercial de IDGA OPPV/CAEV. A sensibilidade de ambos os antígenos, CAEV-Cork e MVV-K1514, foi de 75%, superando o Kit de IDGA comercial OPPV/CAEV que foi de 56.4%.

Palavras-chave: IDGA, CAEV, MVV, caprino, cultivo de células, sorodiagnóstico, geleia de Wharton.

**Cordão umbilical ovino: uma alternativa para a produção de antígenos utilizados
no diagnóstico das lentivirose de pequenos ruminantes**

**Sheep umbilical cord: an alternative for the production of antigens used in the
diagnosis of lentiviruses of small ruminants**

**Ronaldo Pereira Dias² Raymundo Rizaldo Pinheiro^{II} Edmara Chaves Costa^{III}
Anderson Carvalho de Farias^{IV} Vanderlan Warlington Souza dos Santos^V Maria
Fátima da Silva Teixeira^I**

ABSTRACT

This work aimed to carry out an agarose gel immunodiffusion (IDGA) to investigate anti-CAEV antibodies with lentivirus antigens from small ruminants produced in sheep umbilical cord cells. Each umbilical cord was collected at natural delivery, and explants were cultured in vitro in DMEM low glucose medium plus 10% fetal bovine serum. CAEV-Cork and MVV-K1514 viruses were used for inoculation of cell monolayers. Supernatants containing virus particles were collected and concentrated 100 times in AMICON system and lyophilization. Each antigen was titrated on agarose gel and tested against 199 goat sera previously diagnosed by Western Blot and a commercial Kit of IDGA OPPV / CAEV. The sensitivity of both antigens, CAEV-Cork and MVV-K1514, was 75%, surpassing the commercial IDGA Kit OPPV / CAEV which was 56.4%.

^IUniversidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil. Laboratório de Virologia, Núcleo de Pesquisa em Sanidade Animal (NUPESA), 60740-000, Fortaleza, CE, Brasil. E-mail: ronaldodias01@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

^{II}Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil.

^{III}Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, CE, Brasil.

^{IV}Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, PA, Brasil.

^VUniversidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró, RN, Brasil

Key words: AGID, CAEV, MVV, goat, cell culture, serodiagnosis, Wharton's jelly.

INTRODUÇÃO

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) afetam o bem-estar e a produção de ovinos e caprinos em todo o mundo, e o seu controle consiste principalmente da eliminação de animais infectados, causando prejuízos econômicos. O diagnóstico das infecções baseia-se principalmente na realização testes sorológicos altamente sensíveis (CRESPO et al., 2016), no entanto, estes são mais caros, podendo tornar o programa de controle inviável.

Devido aos menores custos e à praticidade, o método sorológico mais utilizado na detecção de anticorpos contra os LVPR é a IDGA. No Brasil, os custos para a produção de antígeno para IDGA e dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA-Indireto) foram de US\$ 30,53/mL e US\$ 110,25/mL, respectivamente, enquanto que os valores de custos de produção estimados para cada teste foram: US\$ 0.93 (IDGA) e US\$ 1.59 (ELISA-I) (PINHEIRO et al., 2006).

Vários tipos celulares tem demonstrado potencial para a replicação de LVPR *in vitro*, onde, geralmente, o sacrifício de animais jovens ou fetos é inevitável (OIE, 2008). A membrana nictitante obtida de cabritos recém-nascidos é uma alternativa à eutanásia, apesar de ser necessária microcirurgia para coleta (AZEVEDO et al., 2015).

Recentemente foi demonstrada a permissividade das células do tecido do cordão umbilical ovino à infecção *in vitro* por LVPR. A possibilidade da utilização destas células para a produção de antígeno viral em larga escala, tem como vantagem a inexistência de conflitos éticos, desconfortos e perigos à saúde animal, já que sua coleta é realizada por ocasião do parto natural (DIAS et al., 2016).

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi utilizar células provenientes do tecido do cordão umbilical ovino para a produção de antígenos nucleoprotéicos de LVPR, utilizando as cepas virais CAEV-Cork e MVV-K1514, avaliando a sensibilidade e especificidade desses antígenos em IDGA, comparando-os a um kit comercial OPPV/CAEV IDGA, e tendo como padrão ouro o Western Blot.

MATERIAL E MÉTODOS

Cordões umbilicais ovinos (n=10) foram coletados de ovelhas híidas oriundas de duas fazendas localizadas no município de Guaiuba no estado do Ceará, sem raça definida, soronegativas para os LVPR por IDGA, utilizando-se Kit comercial nacional, direcionado à detecção de anticorpos anti-p28 em soros ovinos. Por ocasião do parto natural, o cordão umbilical era pinçado com pinça hemostática estéril e seccionado em comprimento de seis a 10 cm. Em seguida, cada cordão era lavado com PBS estéril acrescido de 2% de penicilina e estreptomicina (P/S), para retirada do excesso de sangue e desinfecção, os quais eram imersos em tubos falcon de 50 mL contendo DMEM baixa glicose acrescido de 4% de P/S e 1% de anfotericina B. Acondicionados em caixa isotérmica contendo gelo reciclável (4 °C), os cordões eram encaminhados ao Laboratório de Virologia da Universidade Estadual do Ceará para processamento.

Explants do tecido extra vascular do cordão ovino foram cultivados em placas de seis poços contendo DMEM baixa glicose acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de penicilina e estreptomicina e 1% de anfotericina B, e cultivado em estufa a 37 ° C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células eram visualizadas em microscópio de luz invertido e quando as monocamadas atingiam 80% de confluência, eram tripsinizadas para garrafas de 75 cm², sendo substituído o respectivo meio de cultivo a cada 2-3 dias.

A replicação viral se deu por infecção *in vitro* das monocamadas de células de cordão umbilical ovino cultivadas em garrafas de 150 cm². À medida que as monocamadas atingiam 90% de confluência, eram lavadas em PBS e em seguida adicionado inoculo constituído de 200 µL de suspensão viral contendo a cepa CAEV-Cork, título 10^{4,5} TCID₅₀/mL, ou MVV-K1514, título 10^{4,7} TCID₅₀/mL, diluída em 15 mL de DMEM baixa glicose sem SFB, sendo então mantidas por uma hora em estufa a 37 °C. Após esse período, o inoculo era substituído por 40 mL de meio completo constituído de DMEM baixa glicose, 2% de SFB, 2% de P/S e 1% de anfotericina B. A cada sete dias os sobrenadantes eram coletados e o meio de cultivo era substituído nas mesmas concentrações de SFB, P/S e anfotericina B anteriores, totalizando em três coletas num período de 21 dias. Ao final deste período, na terceira coleta, as garrafas de cultivo foram então congeladas e descongeladas por três vezes, para lise celular e liberação das partículas virais nos sobrenadantes. Desta forma, foram produzidos dois sobrenadantes, CAEV-Cork e um MVV-K1514, sendo o volume total de cada sobrenadante 120 mL.

Para remoção dos debris celulares, cada sobrenadante foi centrifugado a 3.300g a 8 °C por 30 min e armazenados a -80 °C. A seguir, 100 mL de cada sobrenadante foi submetido à microfiltração em membrana AMICON de 10 kilodantons (kDa), com pressão positiva de gás nitrogênio, de acordo com as recomendações do fabricante ^f. Solutos acima do peso molecular de retenção “cut-off” da membrana (10000 Daltons) foram retidos na câmara, enquanto solutos abaixo do “cut-off” saíram para o filtrado. Todo o processo foi realizado sob-refrigeração, com a finalidade de se evitar a desnaturação das proteínas antigênicas (ALVES et al., 2012).

Quando o volume de cada sobrenadante alcançava aproximadamente 4 mL, estes eram transferidos para tubos falcon de 15 mL e congelados a -80 °C. A continuação da

concentração ocorreu em liofilizador, aonde os sobrenadantes permaneceram sob temperatura de $-41\text{ }^{\circ}\text{C}$ e vácuo de $233\mu\text{Hg}$, continuamente, até a redução do volume para 1 mL, ou seja, 100 vezes a concentração inicial.

Findada a etapa de concentração, cada antígeno foi tratado com éter etílico na proporção 1:1 por 15 minutos sob lenta agitação para destruição das glicoproteínas, evidenciando a proteína p28. Após centrifugação era obtido um produto final composto de duas fases. O antígeno (Ag), propriamente dito, na fase inferior e uma capa de glicoproteínas na fase superior. O Ag era cuidadosamente coletado com pipeta pasteur e armazenado em eppendorf a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização das IDGA, enquanto que a fase superior era descartada.

Ambos os antígenos (Ag), Ag CAEV e Ag MVV, foram então titulados para determinação das diluições de uso e tempo de leitura. Cada um foi titulado em IDGA, com ágar a 1% em tampão fosfato, utilizando 25 μL de soro/antígeno. O gel foi perfurado com roseta metálica em formato hexagonal, contendo seis poços periféricos e um central, sendo perfurados duas rosetas, destinando uma para cada antígeno.

No poço central, colocou-se um soro caprino conhecidamente soropositivo como padrão positivo. Os poços em torno do poço central foram preenchidos com as diluições seriadas do antígeno nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. A leitura foi realizada em 24, 48 e 72 horas, com luz indireta sobre fundo escuro, sendo fotografadas as linhas de precipitação oriundas da ligação antígeno-anticorpo para posterior comparação e definição da melhor diluição/tempo favoráveis à nitidez.

Estabelecidas a diluição de uso e tempo de leitura para o IDGA, 199 soros de caprinos foram utilizados para testar os dois Ag produzidos. Cada Ag foi utilizado a princípio na diluição 1:8, no entanto, houve a necessidade de se utilizar a diluição de 1:4

com leitura em 72 horas, pois esta permitiu reações mais visíveis e sem necessidade de repetição.

Os resultados dos Ag produzidos, Ag CAEV e Ag MVV, foram comparados com o kit comercial dos EUA para o diagnóstico da CAE por IDGA. Este kit é composto por 1 mL de antígeno (p28 e gp135) produzido a partir do MVV e 3 mL de soro reagente (soro rico em anticorpos contra a glicoproteína gp135).

O Western Blot com Ag ultracentrifugado em colchão de sacarose (RODRIGUES et al., 2014) foi adotado como padrão, neste experimento, sendo a este comparado os resultados obtidos pelos testes IDGA, tanto com os Ag experimentais, CAEV e MVV, como com o Kit comercial.

Estatística

Os dados foram tabulados no programa Microsoft Excel[®] 13 e processados estatisticamente nos programas SPSS versão 22 (IBM., Chicago, EUA) e MedCalc versão 16.5 (Medcalc Software, Bélgica), obtendo-se os resultados de sensibilidade, especificidade, concordância dos testes e índice Kappa. Para todos os testes foi assumido um nível de significância $\alpha = 5\%$ e seu respectivo intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tempo para a obtenção de sobrenadantes contendo partículas virais do CAEV-Cork e do MVV-1514 foi de 54 dias, tempo este que teve início no cultivo dos explantes de tecido do cordão umbilical ovino até a terceira e última coleta de suspensão viral. A IDGA dos Ags produzidos comprovou a presença do vírus tanto na preparação antigênica com CAEV-Cork como com MVV-K1514, por meio da

visualização de uma linha de imunoprecipitação correspondente a reação antígeno-anticorpo.

As duas suspensões virais resultaram em dois Ag 100x concentrados de volume final 1mL cada. A titulação de ambos os antígenos em gel de agarose, demonstrou linhas de precipitação imunogênicas visíveis em todas as diluições testadas, nos tempos de 24, 48 e 72 horas, com destaque para maior nitidez de leitura em 72 horas (Fig.1).

A linha de precipitação, apesar de visível em todas as diluições, tornou-se menos nítida e mais distante do poço central à medida que a diluição dos antígenos aumentou. Testes com a diluição 1:8 frente às amostras de soro resultaram em várias reações fracas, havendo necessidade de repetições, não sendo recomendado o uso nesta diluição. Desta forma, para maior segurança e estabilidade na leitura do IDGA, foi determinada a diluição 1:4 como a diluição de uso adequada.

A partir desta definição, cada Ag concentrado resultou 4mL de antígeno na diluição 1:4, quantidade suficiente para a realização de 480 pesquisas de anticorpo séricos contra o CAEV em soros caprinos.

A sensibilidade e especificidade de todos os antígenos IDGA experimentais foram comparadas com o padrão Western Blot CAEV ultracentrifugado conforme a tabela 1, demonstrando a mesma sensibilidade entre eles, e superioridade ao Kit comercial OPPV/CAEV importado.

CONCLUSÃO

Células do tecido do cordão umbilical ovino podem ser utilizadas na produção de antígenos para a realização de IDGA, sendo uma alternativa a outros protocolos que causam riscos ou mesmo o sacrifício animal. O vírus MVV obteve o mesmo

desempenho que o CAEV quanto à sensibilidade de detecção no IDGA demonstrando o mesmo potencial para o diagnóstico da CAE.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Universal proc. 487425/2012-0) e ao AUXPE-PROEX 533/2014 pelo suporte financeiro. A CAPES pela bolsa de doutorado concedida e à EMBRAPA Caprinos e Ovinos na pessoa do Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro pela disponibilização da infraestrutura laboratorial.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O experimento foi realizado após a aprovação da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), registrado sob o seguinte número 12776979-0.

REFERÊNCIAS

Abreu SRO et al. Produção de antígeno nucleoprotéico do vírus da artrite-encefalite caprina e comparação com o do vírus Maedi-Visna para utilização em teste de imunodifusão em Agar gel. *Pesq Vet Bras* 1998;18:57-60.

Alves LAO et al. Produção de antígeno e separação da proteína p28 por microfiltração seriada para sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina por ensaio imunoenzimático. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2012;64:935-942.

Azevedo DAA et al. Produção de antígeno de lentivírus de pequenos ruminantes através da cultura celular de membrana nictitante caprina. *Rev Bras Med Vet* 2015;37:316-320.

Crespo H et al. Low proviral small ruminant lentivirus load as biomarker of natural restriction in goats. *Vet Microbiol* 2016;192:152–162.

Dias RP et al. Wharton's jelly cells from sheep umbilical cord maintained with different culture media are permissive to in vitro infection by Small Ruminant Lentiviruses. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2016; 68:1292-1300.

Lima CCV et al. Imunodiagnóstico para a artrite-encefalite caprina em rebanhos do semiárido baiano, Brasil. *Ver Bra Med Vet* 2013;35:358-364.

OIE OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.7.3/4. - Caprine arthritis/encephalitis & Maedi-visna, 2008. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.03-04_CAE_MV.pdf>. Acessado em: 1 fev. 2016.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; TORRES, A.M.C.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F.S.F. Custo dos antígenos no diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.28, p.110-113, 2006.

Pinheiro RR et al. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. *Arq Inst Bio* 2010;77:133-137.

Rodrigues AS et al. Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2014;66:417-424.

Tabela 1 – Sensibilidade, Especificidade e Índice Kappa de testes IDGA utilizando os antígenos experimentais CAEV e MVV, e o kit comercial CAEV/OPPV importado tendo o Western Blot como Padrão.

| AGID | WB | | Sensibilidade | Especificidade | Kappa* |
|----------------------------|----|----|---------------|----------------|--------------------|
| | + | - | | | |
| Ag CAEV | + | 81 | 75.0% | 100.0% | 0.733 ^a |
| | - | 27 | (65.7 - 82.8) | (96.0 – 100.0) | (0.643 – 0.823) |
| Ag MVV | + | 81 | 75.0% | 100.0% | 0.733 ^a |
| | - | 27 | (65.7 – 82.8) | (96.0 – 100.0) | (0.643 – 0.823) |
| CAEV / OPPV Kit | + | 61 | 56.4% | 100.0% | 0.543 ^b |
| | - | 47 | (46.6 – 66.0) | (96.0 – 100.0) | (0.441 – 0.644) |

* O Índice Kappa pode variar entre 0.00 e 1.00, com valores > 0.80 representando concordância “muito boa” além do acaso, valores entre 0.60 e 0.80 concordância “boa” e valores entre 0.40 e 0.60 concordância “moderada”.

Sobrescrito ^a = $p \leq 0,05$; ^b = $p \geq 0,05$

Os dados entre parênteses são o intervalo de confiança de 95%

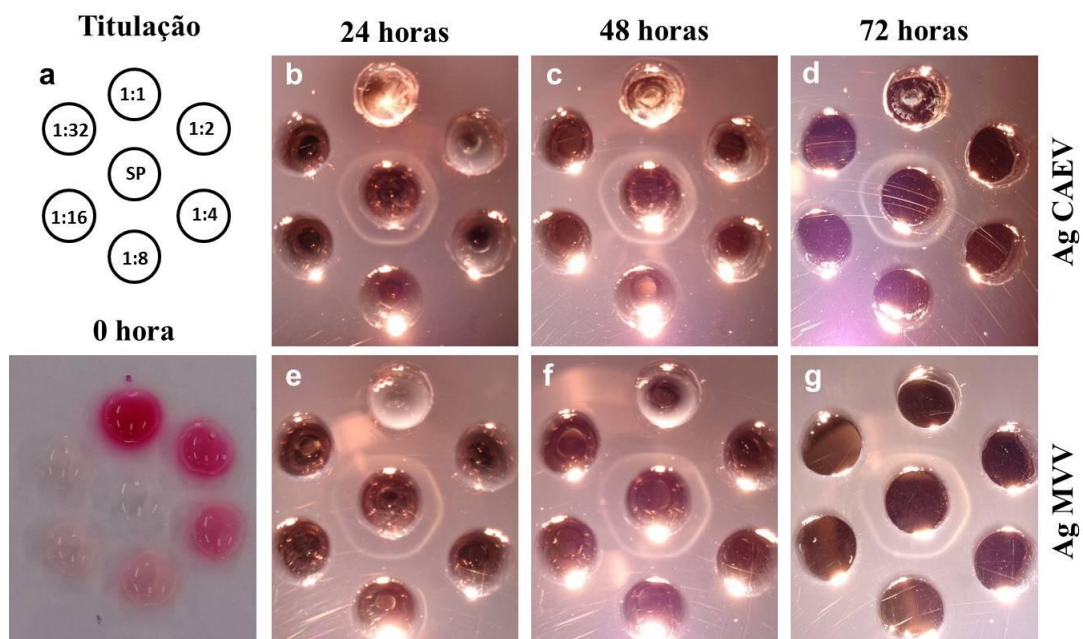


Figura 1 – Titulação de antígenos e padronização do tempo de leitura da IDGA. **a.** Desenho esquemático e foto de roseta demonstrando as diluições seriadas dos antígenos ao redor do Soro Positivo (SP), **b. c. e d.** Linha de precipitação do Ag CAEV nos tempos 24, 48 e 72 horas respectivamente, **e. f. e g.** Linha de precipitação do Ag MVV nos tempos 24, 48 e 72 horas respectivamente.

10 CONCLUSÕES

Células oriundas da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino colhido por ocasião do parto natural possuem morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. O meio de cultura celular modula o comportamento dessas células, sendo um fator importante para a proliferação e manutenção da multipotência, destacando-se o DMEM baixa glicose como o meio mais adequado para o transporte e cultivo.

As células da geleia de Wharton do cordão umbilical ovino também foram permissivas à infecção *in vitro* pelo CAEV-Cork e MVV-K1514, apresentando efeito citopático característico e replicação produtiva utilizando-se os meios MEM, DMEM baixa glicose, meio 199 e RPMI-1640, com potencial para a produção de antígeno em larga escala em todos eles.

O cordão umbilical ovino é então uma alternativa viável para se evitar a utilização de fetos e a eutanásia de animais jovens visando à obtenção de células para a replicação *in vitro* de LVPR. Ele pode ser utilizado como ferramenta para replicação de LVPR cepas CAEV-Cork e MVV-K1514 visando à produção de antígenos nucleoprotéicos.

Sobrenadantes DMEM baixa glicose contendo partículas virais, CAEV-Cork e MVV-K1514, foram processados em protocolo de produção de antígenos para IDGA e, ambos os vírus, proporcionaram reações de imunoprecipitação nítidas e com maior sensibilidade (75%) que o Kit comercial IDGA importado (56,4%).

11 PERSPECTIVAS

Este trabalho demonstrou o potencial de diferenciação mesodermal *in vitro* de células da geleia de Wharton de cordão umbilical da espécie ovina, obtidas por ocasião do parto natural. Além disso, demonstrou pela primeira vez a permissividade que essas células possuem a infecção *in vitro* por LVPRs e replicação produtiva.

Os protocolos envolvendo diferentes meios de transporte e de cultivo possibilitaram a descoberta das melhores condições de transporte deste tecido, bem como nortear a metodologia dependendo da finalidade da utilização das células da geleia de Wharton.

Para melhor compreensão quanto à manutenção ou perda de multipotência, estudos envolvendo citometria de fluxo poderiam ajudar a compreender a dinâmica causada por cada meio de cultivo. Testes variando apenas a concentração de glicose em DMEM poderiam nos mostrar o real efeito da glicose sobre as células da geleia de Wharton ovinas.

Vários estudos envolvendo a diversificação de meios na produção de antígenos semi-purificados hoje podem ser realizados, tomando por base aos achados desde trabalho, além de incluirmos soro de animais ovinos nos testes de sensibilidade dos antígenos produzidos neste experimento.

Apesar de haverem outras técnicas conhecidamente mais sensíveis, o IDGA, neste experimento, apresentou boa sensibilidade trazendo a inovação da utilização de anexos fetais para a produção de antígenos, que pode ser aplicado ao protocolo de produção antigênica para outras técnicas sorológicas.

Estas células podem ser utilizadas em futuros estudos de terapia regenerativa e em estudos relacionados à medicina veterinária preventiva no que tange a produção antigênica que visa o controle das doenças relacionadas aos LVPR.

REFERÊNCIAS

- ADEBAYO, I.A.; OLALEYE, O.D.; AWONIYI, T.A. Affinity (tropism) of caprine arthritis encephalitis virus for brain cells. **African Journal of Medicine and Medical Sciences**, 3 (Suppl), 89–93, 2008.
- AGNARSDÓTTIR, G.; THORSTEINSDÓTTIR, H.; ÓSKARSSON, T.; MATTHÍASDÓTTIR, S.; HAFLIDADÓTTIR, B.; ANDRÉSSON, Ó.S.; ANDRÉSDÓTTIR, V. The long terminal repeat is a determinant of cell tropism of maedi-visna virus. **Journal of General Virology**, v.81, p.1901–1905, 2000.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; DUBREIL, L.; CHATAGNON, G.; KHAYLI, Z.; THERET, M.; MARTIGNAT, L.; CHEBLOUNE, Y.; FIENI, F. Goat uterine epithelial cells are susceptible to infection with caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in vivo. **Veterinary Research**, v.43, n.5, 2012.
- AMARAL, J.B.; MACHADO-SANTELLI, G.M. A cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, Rio Claro, v. 34, p.1-20, 2011.
- ANDRÉS, D.; KLEIN, D.; WATT, N. J.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; BLACKLAWS, B. A.; HARKISS, G. D. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 107, n. 1-2, p. 49-62, 2005.
- ANGELOPOULOU, K.; BRELLOU, G.D.; VLEMMAS, I. Detection of maedi-visna virus in the kidneys of naturally infected sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p.329–335, 2006.
- ARAÚJO, S.A.C.; PINHEIRO, R.R.; DANTAS, T.V.M.; ANDRIOLI, A.; LIMA, F.E.S.; DIAS, R.P.; CAMPELLO, C.C.; COSTA, E.C.; RICARTE, A.R.F.; MELO, V.S.P.; ROLIM, B.N.; SILVA, J.B.A.; TEIXEIRA, M.F.S. Inibição dos lentivírus de pequenos ruminantes por drogas antivirais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.225-232, 2010.
- BANKOWSKI, E. Collagen of the umbilical cord and it's alteration in EPH-gestosis (preeclampsia). **Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Chemical Sciences)**, 111, 207–213, 1999.

BOLEA, R.; MONLEÓN, E.; CARRASCO, L.; VARGAS, A.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B.; BADIOLA, J.J.; LUJÁN, L. Maedi-visna virus infection of ovine mammary epithelial cells. **Veterinary Research**, v.37, p.133–144, 2006.

BRELLOU, G.D.; ANGELOPOULOU, K.; POUTAHIDIS, T.; VLEMMAS, I. Detection of Maedi-Visna Virus in the liver and heart of naturally infected sheep. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.27–35, 2007.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.3, p.87-97, 2001.

CAPUCCHIO, M.T.; SANNA, E.; SANNA, M.P.; FARIGU, S.; MINELLI, R.; GUARDA, F. Maedivisna virus detection in ovine third eyelids. **Journal of Comparative Pathology**, v.129, p.37–43, 2003.

CARDOSO, T.C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A.F.; Novais, J.B.; Silva-Frade, C.; Ferrarezi, M.C.; Andrade, A.L; Gameiro, R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. **BMC Biotech.**, v.12, n.18, 2012a.

CARDOSO, T.C.; NOVAIS, J.B.; ANTELLO, T.F.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M.C.; FERRARI, H.F.; GAMEIRO, R.; FLORES, E.F. Susceptibility of neuron-like cells derived from bovine Wharton's jelly to bovine herpesvirus type 5 infections. **BMC Veterinary Research**, v.8, n.242, 2012b.

CARLIN, R.; DAVIS, D.; WEISS, M.; SCHULTZ, B.; TROYER, D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v.4, n.6, 2006.

CARROZZA, M.L.; MAZZEI, M.; BANDECCHI, P.; ARISPICI, M.; TOLARI, F. In situ PCR associated immunohistochemistry identifies cell types harbouring the maedivisna virus genome in tissue sections of sheep infected naturally. *Journal of Virological Methods*, v.107, p.121–127, 2003.

CHEBLOUNE, Y.; SHEFFER, D.; KARR, B.M.; STEPHENS, E.; NARAYAN, O. Restrictive Type of Replication of Ovine/Caprine Lentiviruses in Ovine Fibroblast Cell Cultures. **Virology**, n.222, p.21–30, 1996.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **Veterinary Record**, v.120, n.19, p.451-454, 1987.

ELLIS, T.M.; WILCOX, G.E.; ROBINSO, W.F. Characteristics of Cell Fusion Induced by a Caprine Retrovirus. **Archives of Virology**, v.86, p.263—273, 1985.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 5^oed. New York: Wiley-Liss, 2005.

GLARIA, I.; REINA, R.; RAMÍREZ, H.; ANDRÉS, X.; CRESPO, H.; JÁUREGUI, P.; SALAZAR, E.; LUJÁN, L.; PÉREZ, M.M.; BENAVIDES, J.; PÉREZ, V.; POLLEDO, L.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; RIEZU, J.I.; BORRÁS, F.; AMORENA, B.; ANDRÉS, D. Visna/maedi virus genetic characterization and serological diagnosis of infection in sheep from a neurological outbreak. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.137–146, 2012.

GREGO, E.; BERTOLOTTI, L.; CARROZZA, M.L.; PROFITI, M.; MAZZE, M.; TOLARI, F.; ROSATI, S. Genetic and antigenic characterization of the matrix protein of two genetically distinct ovine lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, v.106, p.179–185, 2005.

HARTMANN, I.; HOLLWECK, T.; HAFFNER, S.; KREBS, M.; MEISER, B.; REICHART, B.; EISSNER, G. Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. **J Immunol Methods**, v.363, n.1, p.80–89, 2010.

HOU, T.; XU, J.; WU, X.; XIE, Z.; LUO, F.; ZHANG, Z.; ZENG, L. Umbilical Cord Wharton's Jelly: A New Potential Cell Source of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering**, v.15, n.9, 2009.

HOVDEN, A.; SOMMERFELT, M.A. The influence of CD4 and CXCR4 on maedi-visna virus-induced syncytium formation. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, n.110, p.697–708, 2002.

IACONO, E.; ROSSI, B.; MERLO, B. Stem cells from foetal adnexa and fluid in domestic animals: An update on their features and clinical application. **Reprod. Dom. Anim.** v.50, p.353–364, 2015.

KITA, K.; GAUGLITZ, G.G.; PHAN, T.T.; HERNDON, D.N.; JESCHKE, M.G.; Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. **Stem Cells and Dev**, v.19, n.4, p. 491–501. 2010.

KLEVJER-ANDERSON P.; ANDERSON L.W. Caprine Arthritis-Encephalitis Virus Infection of Caprine Monocytes. **J. Gen. Virol.**, v.58, p.195-198, 1982.

LAMARA, A.; FIENI, F.; CHATAGNON, G.; LARRAT, M.; DUBREIL, L.; CHEBLOUNE, Y. Caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) replicates productively in cultured epididymal cells from goats. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.36, p.397–404, 2013.

LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v.79, p.165–172, 2001.

LEROUX, C.; CORDIER, G.; MERCIER, I.; CHASTANG, J.; LYON, M.; QUERAT, G.; GREENLAND, T.; VIGNE, R.; MORNEX, J.F. Ovine aortic smooth muscle cells allow the replication of visna-maedi virus in vitro. **Archives of Virology**, v.140, n.1, p.1–11, 1995.

LEROUX, C.; CRUZ, J.C.; MORNEX, J.F. SRLVs: a genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. **Current HIV Research**, v.8, p.94–100, 2010.

MARCUS-SEKURA, C.; RICHARDSON, J.C.; HARSTON, R.K.; SANE, N.; SHEETS, R.L. Evaluation of the human host range of bovine and porcine viruses that may contaminate bovine serum and porcine trypsin used in the manufacture of biological products. **Biologicals**, v.39, v.6, p.359–369, 2011.

MINGUIJÓN, E.; REINA, R.; PÉREZ, M.; POLLEDO, L.; VILLORIA, M.; RAMÍREZ, H.; LEGINAGOIKOA, I.; BADIOLA, J.J.; GARCÍA-MARÍN, J.F.; ANDRÉS, D.; LUJÁN, L.; AMORENA, B.; JUSTE, R.A. Small ruminant lentivirus infections and diseases. **Veterinary Microbiology**, v.181, p.75-89, 2015.

MOURA, G.S.; ARAÚJO, S.A.C.; ASSIS, R.N.; PINHEIRO, R.R.; DANTAS, T.M.V.; ANDRIOLI, A.; LIMA, F.E.S.; DIAS, R.P.; MELO, V.S.P.; MORAIS, S.M.; TEIXEIRA, M.F.S. Atividade antiviral in vitro de *Azadirachta indica* A. JUSS contra lentívirus de pequenos ruminantes. **Saúde animal, vigilância Sanitária e Biossegurança** – 37º CONBRAVET, 2010.

MSELLI-LAKHAL, L.; FAVIER, C.; LEUNG, K.; GUIGUEN, F.; GREZEL, D.; MIOSSEC, P.; MORNEX, J.; NARAYAN, O.; QUERA, T.G.; CHEBLOUNE, Y. Lack of Functional Receptors Is the Only Barrier That Prevents Caprine Arthritis-Encephalitis Virus from Infecting Human Cells. **Journal of Virology**, v.74, n.18, p.8343-8348, 2000.

MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, 3rd ed. Academic Press, San Diego, 1999.

MUSSI, J.M.S.; GOUVEIA, A.M.; CORTEZ, A.; LAGE, A.P.; GUIMARÃES, A.S.; HEINEMANN, M.B. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* v. 52, n. 4, p. 283-297, 2015.

NARAYAN, O.; CORK, L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: Chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Reviews of Infectious Diseases**, v.7, p.89-97, 1985.

OIE Terrestrial Manual. Chapter 2.7.3/4. - Caprine arthritis/encephalitis & Maedi-visna, 2008. Disponível em:

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.03-04_CAE_MV.pdf>. Acessado em: 1 fev. 2016.

PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P. Le C.A.E.V.: revue des connaissances actuelles et consequences pratiques. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.144, p.93-98, 1993.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R.A.; KRABNIG, R.; LAFONT, J.; LENIHAN, P.; PÉTURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, J.; PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v.35, p.257-274, 2004.

PÉTURSSON, G.; ANDRÉSDÓTTIR, V.; ANDRÉSSON, O.S.; GEORGSSON, G.; PÁLSSON, P.A.; RAFNAR, B.; TORSTEINSDÓTTIR, S. **Lentivirus diseases of sheep and goats: maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis**. In: Speedy, A.W. (Ed.), *Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International, Oxford, p.107–129, 1992.

RACHID, A.; CROISE, B.; RUSSO, P.; VIGNONI, M.; LACERENZA, D.; ROSATI, S.; KUZMAK, J.; VALAS, S. Diverse host–virus interactions following caprine arthritis-encephalitis virus infection in sheep and goats. **Journal of General Virology**, v.94, p.634–642, 2013.

RAMÍREZ, H.; REINA, R.; AMORENA, B.; ANDRÉS, D.; MARTÍNEZ, H.A. Small Ruminant Lentiviruses: Genetic Variability, Tropism and Diagnosis. **Viruses**, v.5, p.1175-1207, 2013.

REA-BOUTROIS, A.; PONTINI, G.; GREENLAND, T.; MEHLEN, P.; CHEBLOUNE, Y.; VERDIER, G.; LEGRAS-LACHUER, C. Caprine arthritis–encephalitis virus induces apoptosis in infected cells in vitro through the intrinsic pathway. **Virology**, v.375, p.452–463, 2008.

REINA, R.; BERRIATUA, E.; LUJÁN, L.; JUSTE, R.; SÁNCHEZ, A.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 1, p. 31-37, 2009.

RYAN, S.; TILEY, L.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B.A. Infection of dendritic cells by the maedi-visna lentivirus. **Journal of Virology**, v.74, p.10096–10103, 2000.

SANJOSÉ, L.; PINCZOWSKI, P.; CRESPO, H.; PÉREZ, M.; GLARIA, I.; GIMENO, M.; ANDRÉS, D.; AMORENA, B.; LUJÁN, L.; REINA, R. Diagnosing infection with small ruminant lentiviruses of genotypes A and B by combining synthetic peptides in ELISA. **The Veterinary Journal**, v.204, p.88–93, 2015.

TAGHIZADEH, R.R.; CETRULO, K.J.; CETRULO, C.L. Wharton’s Jelly stem cells: Future clinical applications. **Placenta**, v.32, p.311-315, 2011.

TOLARI, F.; AL-RAMADNEH, W.; MAZZEI, M.; CARROZZA, M.L.; FORZAN, M.; BANDECCHI, P.; GREGO, E.; ROSATI, S. Small ruminant lentiviruses in Jordan:

evaluation of sheep and goat serological response using recombinant and peptide antigens. **Tropical Animal Health Production**, v.45, p.1335–1340, 2013.

VAREA, R.; MONLEÓN, E.; PACHECO, C.; LUJÁN, L.; BOLEA, R.; VARGAS, M. A.; EYNDE, G. V.; SAMAN, E.; DICKSON, L.; HARKISS, G.; AMORENA, B.; BADIOLA, J. J. Early detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 4, p. 301-307, 2001.

WANG, X.Y.; LAN, Y.; HE, W.Y.; ZHANG, L.; YAO, H.Y.; HOU, C.M.; TONG, Y.; LIU, Y.L.; YANG, G.; LIU, X.D.; YANG, X.; LIU, B.; MAO, N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. **Blood**, v111, n.4, p.2436-2443, 2008.