SERGIO ALOISIO DUARTE

Estudo das células mesenquimais do líquido amniótico em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Zugaib

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

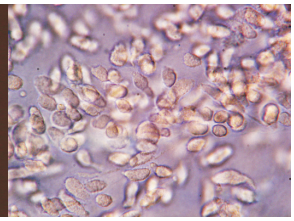
©reprodução autorizada pelo autor

Duarte, Sergio Aloisio
Estudo das células mesenquimais do líquido amniótico em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano / Sergio Aloisio Duarte. -- São Paulo, 2009.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Obstetrícia e Ginecologia.
Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Marcelo Zugaib.

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimais 2.Líquido amniótico 3.Expressão gênica 4.Diferenciação celular 5.Imunofenotipagem

USP/FM/SBD-070/09

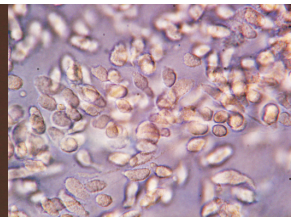
DEDICATÓRIA



Dedico este estudo

- às **gestantes**, por vezes inseguras e ansiosas que depositam em nossas mãos, a esperança de tratamento para os males que afligem o produto de seu amor;
- a meus pais **José Luiz** e **Venturosa**, meus irmãos **Eduardo** e **José Luiz Filho**, e minha esposa **Elaine**, eternos incentivadores e espectadores entusiasmados;
- as minhas filhas, **Fernanda**, **Carolina** e **Mariana**, os melhores presentes de Deus.

AGRADECIMENTOS



Agradeço, especialmente,

- ao **Professor Doutor Marcelo Zugaib**, Professor Titular de Obstetrícia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu orientador, não só pela oportunidade concedida à realização deste trabalho, mas, sobretudo pelo exemplo de liderança e honestidade, no dia-a-dia da Clínica Obstétrica, nesses 25 anos de convívio.

Agradeço, especialmente,

- ao **Professor Doutor Dario de Oliveira Fauza**, Professor Associado de Cirurgia da Harvard Medical School, pesquisador admirável, que me estimulou a estudar as células do líquido amniótico, permitindo meu acesso a seu laboratório e a suas pesquisas;

- ao **Professor Doutor Sérgio Paulo Bydlowski**, líder de extrema capacidade profissional e científica, agradeço a confiança em minha sugestão de trabalho, e a oportunidade concedida, recebendo-me em seu laboratório;

- ao **Professor Doutor Seizo Miyadahira**, professor e amigo especial, desde minha residência médica, pelo exemplo de ética, profissionalismo e profundo conhecimento científico.

- à **Professora Doutora Roseli Mieko Yamamoto Nomura**, exemplo de retidão de caráter, amiga pessoal e pesquisadora ímpar, professora no termo exato da palavra;

- ao **Professor Dr. Victor Bunduki**, sincero, amigo, profundo conhecedor de Medicina Fetal, que tudo fez para a realização deste projeto, ensinando e colaborando;

- ao **Professor Dr. Souhbi Kahhale**, sempre pronto a incentivar, exemplo de generosidade e amizade verdadeira.

- ao **Professor Dr. Roberto Eduardo Bittar**, amigo de longa data, pela compreensão, estímulo e exemplo;

- ao **Doutor Marco Antônio Borges Lopes**, grande amigo, sincero, participante maior deste projeto, pela orientação precisa, ensinamento constante e apoio em todos os momentos;

- à **Doutora Rossana Pulcineli Vieira Francisco**, pela competência e sabedoria, sempre disposta a ajudar, minha grande admiração;

- ao **Doutor Rodrigo Ruano**, meu amigo pessoal, verdadeiro pesquisador, pelas suas mãos o ambiente fetal foi-me descortinado;

- à **Adriana de Aguiar Debbes**, amiga de todas as horas, parceira de laboratório, guiou-me, desde o início do projeto, literalmente, em todas as etapas do cultivo celular;

- à **Débora Levy**, do Laboratório de Investigação Médica 31, pelas orientações e conselhos;

- ao **Dr. Nilton Takiuti**, pela participação na banca da qualificação e pela ajuda no Laboratório de Investigação Médica 57;

- ao **Dr. Sílvio Martinell**i, pela participação na banca de qualificação e pelos comentários contrutivos;

- à pós-graduanda **Rita de Cássia Cavaglieri**, parceira sempre ética e colaborativa, pela dedicação, extrema organização e total comprometimento, sugerindo, incentivando e apoiando, em todas as fases do projeto;

- ao pós-graduando **Felipe de Lara Janz**, pelo companheirismo e dedicação;

- ao amigo **Eduardo Jorge Pimenta**, pela colaboração e companheirismo.

Agradeço

- às gestantes envolvidas neste trabalho, que entenderam nosso propósito e, gentilmente, forneceram o material necessário à sua realização;
- aos assistentes da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, que sempre ofereceram ajuda quando dúvidas existiram e, em especial, aos do Setor de Medicina Fetal que muito me ensinaram e, também, colaboraram nas amniocentes realizadas;
- à equipe do Laboratório de Investigação Médica 31, da FMUSP, pela colaboração irrestrita em todas as fases do projeto;
- às técnicas do Laboratório de Investigação Médica 57, da FMUSP, Ísis Paloppi Correa e Salet Terezinha de Souza, pelo apoio;
- à equipe do Laboratório de Investigação Médica 10, da FMUSP, pelo apoio na preparação do soro humano;
- à equipe do Laboratório de Investigação Médica 59, da FMUSP, em especial, à Prof. Dra. Élia Garcia Caldini e Marcelo Ferreira Alves, pela colaboração na análise morfológica das células;
- à equipe do Laboratório de Investigação Médica 19, da FMUSP, em especial, à Dra. Verônica Coelho e Carolina Lavini Ramos, pela colaboração na imunofenotipagem;
- à equipe do Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Hematologia da Divisão de Clínica Médica I – HCFMUSP, em especial, à Dra. Juliana Pereira, Graciela Aparecida Brocardo e Carla Rosa de Godoy, pela colaboração na imunofenotipagem;

- à equipe do Laboratório de Bioengenharia do Instituto do Coração do HCFMUSP, em especial, às engenheiras Idagene Aparecida Cestari e Helena Taeko Tanaka Oyama, pela colaboração no projeto;

- ao pessoal de enfermagem da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, tanto das Enfermarias, do Ambulatório e do Centro Obstétrico e, em especial, à Enfermeira-chefe Terezinha Hideco Tase e Sra. Maria Aparecida Pereira Domingues, que não mediram esforços para que este trabalho fosse realizado;

- ao pessoal administrativo da Clínica Obstétrica do HCFMUSP, que tudo fizeram para apoiar o projeto;

- à equipe do Laboratório de Investigação Médica 39, especialmente, ao Sr. Rogério Ruscitto do Prado, pela colaboração na análise estatística.

- ao Professor Dr. Chao Lung Wen e à equipe do Projeto Homem Virtual, da Disciplina de Telemedicina da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela colaboração;

- aos colegas da Pós-Graduação, pelo incentivo e ajuda inestimável;

- ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro ao projeto.

νονσων φνσεις ιητροι

“vis medicatrix naturae”

Hipócrates (460 a.C – 377 a.C.)

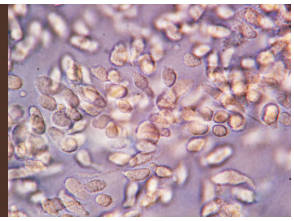
Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.
São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO



SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos
Lista de figuras
Lista de gráficos
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1 INTRODUÇÃO 1

1.1 Medicina Fetal 4

1.2 Células-tronco 7

1.3 Células-tronco mesenquimais 9

1.4 Células-tronco mesenquimais fetais 14

1.5 Células-tronco mesenquimais do líquido amniótico 18

2 OBJETIVOS 37

3 MÉTODOS 39

3.1 Material 41

3.2 Critérios de inclusão 41

3.3 Critérios de exclusão 41

3.4 Coleta das amostras de líquido amniótico 42

3.5 Preparação do soro humano 43

3.6 Contagem celular em hemocitômetro e análise de viabilidade celular 45

3.7 Tripsinização 46

3.8 Isolamento e cultivo das células mesenquimais do líquido amniótico 47

3.9 Ensaios com as células mesenquimais do líquido amniótico 48

3.9.1 Avaliação da expansão celular em cultura 48

3.9.2 Avaliação da morfologia das células 49

3.9.3 Imunofenotipagem 51

3.9.4 Diferenciação 53

3.9.4.1 Osteogênica 53
3.9.4.2 Condrogênica 54
3.9.5 Análise da expressão gênica 55
3.10 Cálculo do tamanho amostral 58
3.11 Características das amostras de líquido amniótico 58
3.12 Análise estatística 59

4 RESULTADOS 61
4.1 Isolamento e cultivo das células mesenquimais do líquido amniótico 62
4.1.1 Avaliação da expansão das CMLAs em cultura, com meio suplementado por soro humano ou soro fetal bovino 65
4.1.2 Avaliação da viabilidade celular das CMLAs em cultura, suplementada com soro humano ou soro fetal bovino 67
4.1.3 Avaliação morfológica das CMLAs em cultura, suplementada com soro humano ou soro fetal bovino 68
4.1.4 Imunofenotipagem 70
4.1.5 Diferenciação 72
4.1.6 Análise da expressão gênica 74

5 DISCUSSÃO 76
5.1 Considerações iniciais 77
5.2 Amostragem, desenho do estudo e métodos utilizados 78
5.3 Ensaios com as células mesenquimais do líquido amniótico 85
5.3.1 Expansão das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura 85
5.5.2 Morfologia das células mesenquimais do líquido amniótico 88
5.3.3 Imunofenotipagem 89
5.3.4 Diferenciação 90
5.3.4.1 Diferenciação osteogênica 90

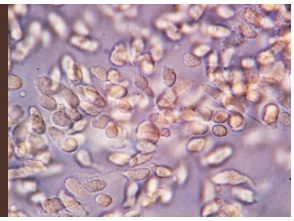
5.3.4.2 Diferenciação condrogênica 92
5.3.5 Expressão gênica..... 94
5.4 Considerações éticas 96
5.5 Aplicações 98
5.6 Considerações finais 103

6 CONCLUSÕES 105

7 ANEXOS 107
ANEXO A 108
ANEXO B 111
ANEXO C 112
ANEXO D 116
ANEXO E 117

8 REFERÊNCIAS..... 119

LISTAS



LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	porcentagem
µg	micrograma
µm	micrômetros
µM	micro-mol
ATV	versene-tripsinap
CD	do inglês, *cluster differentiation*
cDNA	do inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*
cm	centímetro
cm^2	centímetros quadrados
CMEMs	células mesenquimais estromais multipotentes
CMLAs	células mesenquimais do líquido amniótico
CO_2	dióxido de carbono
DEPC	dietilpirocarbonato
D-MEM	do inglês, *minimum essential medium eagle – Dulbecco modification*
DP	desvio-padrão
EGFP	do inglês, *enhanced green fluorescent protein*
FDA	do inglês, *Food and Drug Administration*
FITC	do inglês, *fluorescein isothiocyanate*
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	constante de aceleração gravitacional
g/L	gramas por litro
GALC	do inglês, *galactosylceramidase*
GFAP	do inglês, *glial fibrillary acidic protein*
h	horas

HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HLA	do inglês, *Human Leucocyte Antigen*
IgG	imunoglobulina da classe G
iPS	do inglês, *induced Pluripotent Stem Cell*
KDR	do inglês, *kinase insert domain receptor*
LacZ	gene repórter, que codifica a β-galactosidase
LIF	do inglês, *leukocyte inhibitory factor*
Log10	logaritmo na base 10
MALDI-TOF-MS	do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectometry*
MEM	do inglês, *minimum essential médium eagle*
mg/mL	miligramas por mililitro
mL	mililitro
mM	mili-mol
mMSC	do inglês, *mature mesenchymal stem cell*
MSCGM	do inglês, *Mesenchymal Stem Cell Grow Médium*
NANOG	do inglês, *nanog homeobox,* em referência à *Tir Nan Og (the land of the young)*
NEFH	do inglês, *neurofilament, heavy polipeptide 200kDa*
NES	do inglês, *nestin*
NEUNA60	do inglês, *neuronal nuclear antigen A60*
NIH	do inglês, *National Institute of Health*
NLS	do inglês, *nuclear localization signal*
NOD/SCID	do inglês, *non-obese diabetic severe combined immunodificiency*
^{o}C	graus Celsius
OCT-4	do inglês, *octamer 4*

ORF	do inglês, O*pen Reading Frame*
PBS	do inglês, *phosphate buffered saline*
PE	do inglês, *phycoeritrin*
rpm	rotações por minuto
RPMI-1640	do inglês, *Roswell Park Memorial Institute-1640*
RS	do inglês, *recycling stem cell*
RT-PCR	do inglês, *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
SFB	soro fetal bovino
SH	soro humano
SOX2	o mesmo que SRY box2, do inglês, *sex determining region Y-2*
SSEA4	do inglês, *stage specific embryonic antigen 4*
Stro-1	do inglês, *stromal cell surface antigen 1*
TGF-β1	do inglês, *transforming grow factor – beta 1*
TTF1	do inglês, *thyroid transcription factor*
TUBB3	do inglês, *tubulin, beta3*
UI/mL	unidades internacionais por mililitro
α-MEM	do inglês, *minimum essential médium eagle – alfa modification*
µg/mL	microgramas por mililitro
µL	microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração de proposta de terapia fetal baseada em células do líquido amniótico obtidas por amniocentese de segundo trimestre, isoladas, expandidas e diferenciadas in vitro e posteriormente transplantadas no feto. A – feto no útero; B – amniocentese; C – cultura e expansão; C1 – células mesenquimais do líquido amniótico em cultura; D – diferenciação e inoculação em bioprótese para posterior transplante fetal; D1 – cartilagem; D2 – células em bioprótese; D3 – células ósseas; D4 – osso.....3

Figura 2 – Diagrama de Venn, demonstrando o número de gens regulados pelos transcritos OCT-4, NANOG e SOX2 35

Figura 3 – Cinética das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementado por soro fetal bovino, observando-se adesão inicial das células ao frasco, crescimento em colônias, confluência celular, produção de material amorfo extracelular, e organização celular em multicamadas 63

Figura 4 – Cinética das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementada por soro humano, observando-se adesão inicial das células ao frasco, crescimento em colônias, confluência celular, produção de material amorfo extracelular, e organização celular em multicamadas.....64

Figura 5 – Células mesenquimais do líquido amniótico em cultura, com meio suplementado com soro fetal bovino, afiladas, com aspecto fibroblastóide, organizando-se em colônias 68

Figura 6 – Células mesenquimais do líquido amniótico em cultura, com meio suplementado com soro humano, afiladas, com aspecto fibroblastóide, organizando-se em colônias.....68

Figura 7 – Células mesenquimais do líquido amniótico, dos grupos B e H, visualizadas pelo microscópio eletrônico, com mesma ampliação (6000X), demonstrando maior número de vacúolos lipídicos cheios, naquelas suplementadas com SH 69

Figura 8 – Histogramas da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais do líquido amniótico, cultivadas em meio suplementado com soro humano, demonstrando as características de expressão dos antígenos de superfície dessas células.....71

Figura 9 – Histogramas da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais do líquido amniótico, cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino, demonstrando as características de expressão dos antígenos de superfície dessas células 71

Figura 10 – Microscopia ótica, invertida, corando o cálcio produzido pelas células derivadas das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com meio suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, demonstrando diferenciação osteogênica.....72

Figura 11 – Microscopia ótica, invertida, corando, discretamente, a fosfatase alcalina, demonstrando diferenciação osteogênica das células derivadas das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura, com meio suplementado com soro humano e soro fetal bovino 73

Figura 12 – Microscopia ótica, demonstrando condrócitos e lacunas condrocitárias, corados por hematoxilina, derivados das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com meio suplementado com soro humano e soro fetal bovino.....74

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando bandas de expressão dos genes NANOG, OCT-4 e SOX2 nas células mesenquimais do líquido amniótico, das cinco amostras do grupo B, das cinco amostras do grupo H, do controle negativo de contaminação das soluções, controle positivo de expressão, N-TERA-2, controle negativo de expressão, MRC-5.....75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Perfil médio do crescimento em log10 e erros padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia.....66

Gráfico 2 – Perfil médio do crescimento em log10 e erros padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 1 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia.....113

Gráfico 3 – Perfil médio do crescimento em log10 e erros padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 5 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia.....114

Gráfico 4 – Perfil médio do crescimento em log10 e erros padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 10 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia 115

Gráfico 5 – Perfil médio do crescimento em log10 e erros padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 15 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia 116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos *primers* utilizados para a análise da expressão dos genes NANOG, SOX2 e OCT-4, das células mesenquimais do líquido amniótico 57

Tabela 2 – Descrição do crescimento médio em $\log_{10}$ e desvio-padrão, das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 5.000 células, quando o meio foi suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia, demonstrando, dia a dia, a média de crescimento celular, o desvio padrão e o número de amostras da análise 65

Tabela 3 – Descrição da viabilidade das células mesenquimais do líquido amniótico, em meio, com soro fetal bovino e humano e o resultado da comparação entre elas.....67

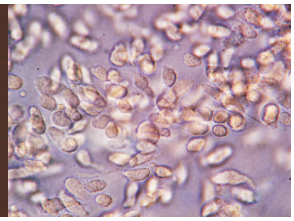
Tabela 4 – Médias das porcentagens de expressão dos diferentes antígenos de superfície das células mesenquimais do líquido amniótico, em meio de cultura suplementados com soro humano ou soro fetal bovino, no *gate* da citometria de fluxo.....71

Tabela 5 – Tabela de comparação entre a expressão dos genes NANOG, OCT-4 e SOX2 nas cinco amostras de células mesenquimais do líquido amniótico do grupo B (complementado com soro bovino), além do controle negativo de RNA (branco), para análise da contaminação do preparado; N-TERA-2, como controle positivo; e as células MRC-5, como controle negativo da expressão gênica.....111

Tabela 6 – Tabela de comparação entre a expressão dos genes NANOG, OCT-4 e SOX2 nas cinco amostras do grupo H (complementado com soro humano), além do controle negativo de RNA (branco), para análise da contaminação do preparado; N-TERA-2, como controle positivo; e as células MRC-5, como controle negativo da expressão gênica.....111

Tabela 7 – Tabela de comparação entre a concentração dos componentes dos meios de cultura celular *Minimum Essential Medium Eagle*, modificação α do *Minimum Essential Medium Eagle* e modificação Dullbecco do *Minimum Essential Medium Eagle*, utilizados em ensaios de isolamento e expansão das células mesenquimais do líquido amniótico.....117

RESUMO



RESUMO

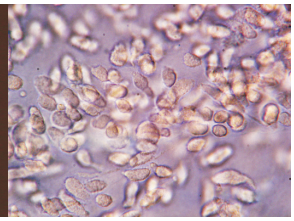
DUARTE SA. *Estudo das células mesenquimais do líquido amniótico em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 179 p.

Malformações fetais são importantes causas de óbito fetal e mortalidade infantil. A medicina regenerativa apresenta-se como a terceira modalidade terapêutica fetal. Células obtidas do líquido amniótico mostram-se como opção preferencial em terapia celular por sua alta taxa de proliferação *in vitro*, habilidade de autorrenovação e potencial multilinhagem. Para uso clínico, é recomendável a exclusão de material animal não humano do meio de cultura dessas células, prevenindo reações imunes, transmissão de príons, bactérias e vírus. O soro fetal bovino é componente usual do meio de cultura dessas células. Sua substituição por soro humano previne essas possíveis consequências. O objetivo deste trabalho foi estudar células obtidas do líquido amniótico, em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano e compará-las. Foram avaliadas seu isolamento e cultivo, padrão de crescimento, morfologia, imunofenótipo, capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica, e caracterizou-se a expressão dos genes OCT-4, NANOG e SOX2. Foram analisadas amostras provenientes de cinco gestantes, obtidas por amniocentese de segundo trimestre, indicadas por idade materna avançada. As células do líquido amniótico, após centrifugação, foram colocadas em frasco de cultura com meio α-MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino (grupo B) ou soro humano (grupo H). Ao atingirem 70% de confluência, foram tripsinizadas e expandidas. Após a terceira passagem celular foram separadas alíquotas do grupo B e H para avaliação de seu potencial de expansão, por meio da construção de curvas de crescimento celular para diferentes inóculos iniciais (1.000, 5.000, 10.000 e 15.000 células). Sua morfologia foi avaliada por microscopia ótica através da coloração de Leishman e por microscopia eletrônica. A análise do imunofenótipo das células dos dois grupos foi realizada por citometria de fluxo, analisando-se os marcadores de superfície: CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD117 e CD133. A diferenciação osteogênica foi realizada pelo acréscimo ao meio de cultura de fosfato-2-ascorbato e β-glicerofosfato, comprovada pela produção de cálcio pelas células, coradas pela Alizarina e visualização da Fosfatase Alcalina nas células. A diferenciação condrogênica foi realizada pelo acréscimo ao meio de cultura de dexametasona e TGF-β1, comprovada pela análise histológica após coloração pela hematoxilina-eosina. Avaliou-se a expressão gênica dos transcritos OCT-4, NANOG e SOX2, por RT-PCR das células dos dois grupos (B e H), comparadas aos controles celulares MRC-5 e NTERA-2 cl.D1. Observou-se alta taxa de expansão, sem diferença significativa entre os grupos (p=0,715), mesmo considerando-se a evolução dia-a-dia (p=0,681) e a alta viabilidade celular, com média de 94% nos dois grupos (p=0,686). A análise morfológica das células dos dois grupos revelou aspecto mesenquimal típico, com crescimento celular em cultura também típico dessa linhagem. Ao microscópio eletrônico, observou-se maior número

de vacúolos lipídicos naquelas células do grupo H. A imunofenotipagem demonstrou marcação positiva para linhagem mesenquimal e negativa para outras linhagens. Ocorreu diferenciação osteogênica e condrogênica e expressão dos transcritos OCT-4, NANOG e SOX2. Não houve diferença significativa nos aspectos estudados, entre os grupos B e H. Concluiu-se que essas células, isoladas do líquido amniótico, apresentam característica de fácil isolamento, alta taxa de proliferação, aspecto morfológico e imunofenótipo mesenquimal, capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica, expressando os transcritos OCT-4, NANOG e SOX2, associados à pluripotência celular, tanto em meio suplementado por soro fetal bovino como por soro humano.

Descritores:1.células-tronco mesenquimais 2.líquido amniótico 3. expressão gênica 4.diferenciação celular 5.imunofenotipagem

SUMMARY



SUMMARY

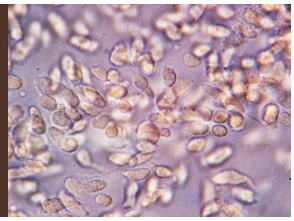
DUARTE SA. *Study of the mesenchymal cells of the amniotic fluid in a culture medium supplemented with bovine fetal or human serum* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 179p.

Fetal malformations are a significant cause of fetal death and infant mortality. Regenerative medicine is presented as a third therapeutic method. Cells obtained from the amniotic fluid are seen to be an option of choice for cell therapy because of their high rate of *in vitro* proliferation, power of self-renewal and multi-lineage potential. For clinical use the exclusion of non-human animal material from the culture medium of these cells is to be recommended, thus precluding immune reactions and the transmission of prions, bacteria and viruses. Bovine fetal serum is a normal component of the culture medium of these cells. Its replacement by human serum precludes those possible consequences. The objective of this present study was investigation into the cells obtained from the amniotic fluid, in a culture medium supplemented with bovine fetal or human serum, and compare them. Their isolation and culture, growth rate, morphology, immune phenotype and osteogenic and chondrogenic capacity were assessed and the expression of the OCT-4, NANOG and SOX2 genes was characterized. Samples taken from five pregnant women by amniocentesis during the second trimester, recommended by virtue of advanced maternal age, were analyzed. The cells of the amniotic fluid, after centrifugation, were placed in a culture flask with an α-MEM medium supplemented with 20% of bovine fetal serum (group B) or human serum (group H). After attaining 70% confluence they were trypsinized and expanded. After the third cellular passage they were separated into quotas of groups B and H for assessment of their expansion potential, by means of the construction of cellular growth curves for the different initial inocula (1,000, 5,000, 10,000 and 15,000 cells). Their morphology was assessed by optical microscopy by means of Leishman´s staining and electron microscopy. The analysis of the immune phenotype of the cells of the two groups was undertaken by flow cytometry, the surface markers CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD117 and CD133 being analyzed. The osteogenic differentiation was undertaken by the addition of ascorbate-2-phosphate-2 and β-glycerophosphate to the culture medium and proved by the production of calcium by the cells, stained with Alizarin, and visualization of the Alkaline Phosphatase in the cells. The chondrogenic differentiation was brought about by the addition of dexamethasone and TGF-β1 to the culture medium and demonstrated by histological analysis after staining with hematoxiline-eosine. The genic expression of the OCT-4, NANOG and SOX2 transcripts was compared with the control cells MRC-5 and NTERA-2 cl.D1 by the RT-PCR of the cells of the two groups (B and H). A high expansion rate was observed, with no significant difference between the groups (p=0.715), even when the day-to-day progress (p=0.681) was taken into consideration, and high cell viability, with an average of 94% in the two groups (p=0.686). The

morphological analysis of the cells of the two groups presented a typical mesenchymal aspect, with cell growth in the culture also typical of this line. Under the electron microscope, a greater number of lipid vacuoles were observed in the cells of the H group. The immune phenotyping presented a positive marking for the mesenchymal line but a negative one for the others. Osteogenic and chondrogenic differentiation occurred as also did expression of the transcripts OCT-4, NANOG and SOX2. There was no significant difference, as regards the aspects studied, between groups B and H. It is concluded that these cells isolated from the amniotic fluid were characterized by ease of isolation, a high rate of proliferation, mesenchymal morphological aspect and immune phenotype, capacity for osteogenic and chondrogenic differentiation, expressing the transcripts OCT-4, NANOG and SOX2, both in the medium supplemented with bovine fetal serum and in that with human serum.

Drescriptors: 1.mesenchymal stem cells 2.amniotic fluid 3.gene expression 4.cell differentiation 5.immunophenotyping

INTRODUÇÃO



A vida humana inicia-se no ventre materno. Erros de desenvolvimento podem ocorrer na constante multiplicação e diferenciação celular que resultará no organismo adulto. O ambiente intrauterino, pelo efeito multiplicador e pela imaturidade fetal, é o ambiente ideal para o tratamento desses desvios de formação. O uso de células, a mesma ferramenta empregada pela natureza, na formação, manutenção e reparo do tecido humano, oferece vantagens óbvias. O líquido amniótico é fonte de células fetais, podendo ser obtido precocemente na gestação. Portanto, a terapia fetal, baseada em células do líquido amniótico, parece alternativa interessante e viável (Figura 1).

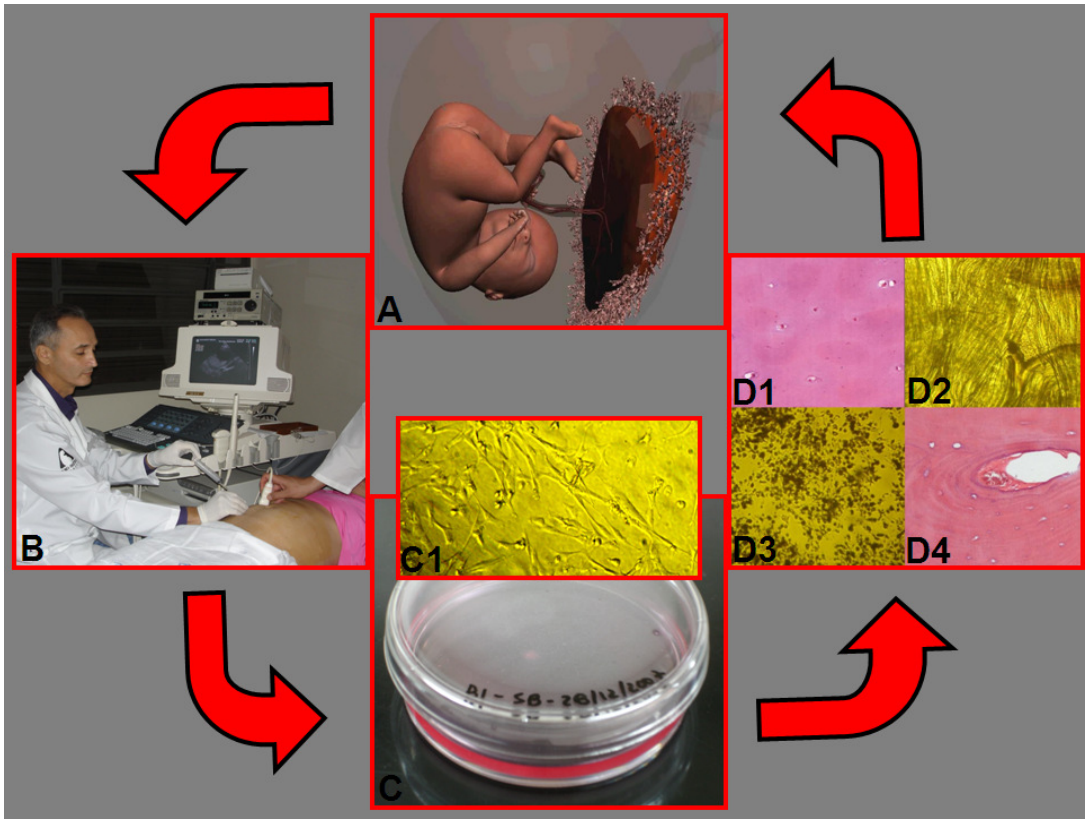


Figura 1 – Ilustração de proposta de terapia fetal baseada em células do líquido amniótico obtidas por amniocentese de segundo trimestre, isoladas, expandidas e diferenciadas in vitro e posteriormente transplantadas no feto. **A** – feto no útero; **B** – amniocentese; **C** – cultura e expansão; **C1** – células mesenquimais do líquido amniótico em cultura; **D** – diferenciação e inoculação em bioprótese para posterior transplante fetal; **D1** – cartilagem; **D2** – células em bioprótese; **D3** – células ósseas; **D4** - osso

1.1 MEDICINA FETAL

A raiz latina de Obstetrícia, *obstare,* não só traduz presença, contemplação ante a vida que surge, mas também conduta próativa. Do episódio solitário, à semelhança dos animais, passando por Séfora e Fua, a Tocologia aliou o instinto e a experiência das mulheres mais velhas ao conhecimento e à razão[1]. De Cós, Alexandria, até as escolas de hoje; de Hipócrates, Avicena até os professores modernos, os conceitos e condutas na gestação e parto foram se estabelecendo. O conhecimento expandiu-se muito durante os séculos e a necessidade de maior especialização fez surgir novo ramo, a Medicina Fetal. De início, munida do olhar privilegiado (a ultrassonografia), a Medicina Fetal estudou a fisiologia e o desenvolvimento do feto. Ampliou-se a identificação de vários defeitos genéticos e não genéticos no feto, vários desses, passíveis de detecção pré-natal[2]. Barrow descreve a história das malformações fetais e relata que Aristóteles sugere, muito antes da ideia de se colocar o feto como paciente, que alterações no desenvolvimento do embrião seriam causa de defeitos congênitos[3]. Muito se progrediu desde então, sobretudo nos últimos 25 anos, triplicando-se os padrões reconhecidos de defeitos congênitos[2].

Além disso, hoje se conhece mais os efeitos potenciais de várias drogas, agentes químicos e ambientais. Defeito congênito é definido como toda anomalia funcional ou estrutural do desenvolvimento do feto decorrente de fator originado antes do nascimento, seja genético, ambiental ou

desconhecido, mesmo quando o defeito não for aparente no recém-nascido e só se manifestar mais tarde[4-6].

Mais de 20% dos fetos malformados serão abortados espontaneamente. Dos que conseguirem chegar ao parto, 3%-5% apresentarão malformação, sendo esta importante causa de mortalidade infantil e de mortalidade geral. Em 1997, foram responsáveis diretamente por cerca de 495.000 mortes em todo o mundo, respondendo por 5% da mortalidade infantil e relacionando-se com 20% da mortalidade geral[7;8].

Nos países desenvolvidos, a proporção de mortes no primeiro ano de vida, relacionada aos defeitos congênitos, tende a ser elevada, mesmo com o declínio da mortalidade por estes defeitos nas últimas décadas. Nos Estados Unidos da América, os defeitos congênitos representam a principal causa de morte no primeiro ano de vida. A proporção de mortes infantis atribuíveis aos defeitos congênitos nos países em desenvolvimento, em média, não difere muito dos países desenvolvidos[9]. Na América Latina e no Caribe, varia entre 2% e 27%, refletindo as grandes disparidades regionais, aumentando proporcionalmente na medida que outras causas de morte são controladas[10-13].

No Brasil, os defeitos congênitos constituem a segunda causa de mortalidade infantil, determinando 11,2% destas mortes[14]. A associação de defeitos congênitos com a mortalidade perinatal constitui também preocupação atual, uma vez que eles associam-se aos óbitos fetais e àqueles ocorridos no primeiro mês de vida. Na verdade, em algumas regiões do mundo, as malformações representam a primeira causa de óbitos

neonatais, respondendo por 25% das mortes no período, superando a prematuridade (associada com 20% dos óbitos)[7].

Ao buscar solução para alterações fetais, responsáveis pela mortalidade descrita acima, a medicina fetal, inicialmente, com transfusões, derivações, cirurgias a céu aberto e fetoscopia minimamente invasiva, tentava, quando a intervenção fosse possível, se não interromper o curso natural da doença, ao menos, minimizar seus efeitos deletérios[15;16]. Na grande maioria das vezes, entretanto, o tratamento definitivo dessas alterações fetais hoje, ou inexiste, ou não se mostra vantajoso antes do parto.

Além das duas técnicas terapêuticas tradicionais, terapia medicamentosa e cirurgia, imagina-se, então, uma terceira modalidade terapêutica fetal, a medicina regenerativa tão precoce quanto possível, por meio de transplantes, sejam eles de células, tecidos ou até órgãos, a chamada terapia de base celular.

Em princípio, a célula ideal é aquela de fácil acesso e manipulação, além de uso múltiplo; sempre na dependência da correção desejada. Das células do organismo, seja na vida intrauterina ou extrauterina, um grupo chama a atenção por suas características inerentes, próprias de ferramenta de reparação e construção – as células-tronco.

1.2 CÉLULAS-TRONCO

Classicamente, as células-tronco são definidas por três propriedades fisiológicas: a) capacidade de autorrenovação (habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula mãe); b) capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares; c) capacidade de reconstituir funcionalmente tecido lesado em ser vivo[17;18].

Não há consenso entre os diversos autores sobre os limites dessa definição[19], sobretudo no que diz respeito à autorrenovação ilimitada e capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares[20]. A diferença fundamental é se estabelecer como célula-tronco apenas aquelas que possuem as características estritas descritas inicialmente ou, também aquelas que podem estar parcialmente ou, totalmente, relacionadas a determinada linhagem celular e possuem capacidade de autorrenovação limitada. Esse segundo tipo seria classificado como célula progenitora[21].

As células-tronco podem ser classificadas, conforme com seu potencial de diferenciação ou pela sua origem. Quanto à primeira classificação, são ditas totipotentes quando podem dar origem ao embrião e aos tecidos extra-embrionários em condições propícias (suporte materno). São pluripotentes quando podem dar origem às células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), mas não dão origem ao embrião ou aos tecidos extra-embrionários[22]. São multipotentes quando dão origem a quatro ou mais linhagens celulares[23].

Quanto à origem, são classificadas em células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias são as derivadas da massa celular interna do blastocisto. Em meio adequado, podem se proliferar indefinidamente, mantendo seu potencial de diferenciação em todos os tecidos do organismo em desenvolvimento[24-31].

Muitos fatores podem colaborar para que ocorra a diferenciação das células-tronco embrionárias em cultura, tais como a densidade celular, composição do meio de cultura, fatores de crescimento e a dose e qualidade do soro fetal utilizado. A eficiência do processo de diferenciação também se relaciona com esses fatores, por vezes favorecendo determinada linhagem, em especial[32]. As células-tronco embrionárias, em cultura, representam alternativa interessante, com aplicação potencial em inúmeras doenças. Possuem características bastante atrativas, quando comparadas às células-tronco adultas, pois podem crescer indefinidamente em cultura apropriada, além de gerar ampla série de tipos celulares e permitir manipulação genética mais fácil. Por outro lado, sua utilização apresenta dificuldades geradas pelos questionamentos éticos de sua obtenção e seu potencial de desenvolvimento de tumores[33].

Em contraste, as células-tronco adultas podem ser encontradas em diferentes tecidos do feto e do adulto; podem proliferar apenas por um número limitado de gerações, e sua resposta a sinais de diferenciação diminui após cada geração. Formam um reservatório de células indiferenciadas que permanecem no indivíduo adulto e que estão envolvidas na reposição celular e no reparo dos órgãos e tecidos por toda a vida[23].

As primeiras células-tronco bem caracterizadas foram as hematopoiéticas. Já em 1940, sabia-se que na medula óssea existiam células indiferenciadas responsáveis pela reposição das células maduras do sangue. São raras (menos de 1 em 100.000 células da medula óssea). O impulso para seu estudo aconteceu logo após a Segunda Guerra Mundial, nos estudos de radiação e transplante da medula óssea, culminando com a realização do primeiro transplante alogênico em 1968[34;35]. A partir de então, houve grande expansão dos estudos sobre as células-tronco hematopoiéticas. Seu uso foi ampliado após ser isolada também do sangue de cordão umbilical e placentário e do sangue periférico, após mobilização do reservatório medular[36].

A medula óssea contém, também, uma população bastante rara de células, as células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciarem em diversas linhagens celulares, como os condrócitos, os osteócitos, os adipócitos e os tenócitos[37].

1.3 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Conforme Prockop e colaboradores[38] e Fehrer e colaboradores[39], foi sugerida sua existência em 1867, por Julius Cohnheim e demonstrada na metade do século XX, na medula óssea[40], e no baço[41]. Inicialmente foi chamada de CFU-F (do inglês, *colony forming unit fibroblast*) pela capacidade de formar colônias similares aos fibroblastos[42]. Mais tarde, de célula-tronco mesenquimal, pelo potencial de diferenciação em uma série de

células não-hematopoiéticas[43]. Em 2005, foi proposto, pela *International Society for Cellular Therapy*, chamar de células mesenquimais estromais multipotentes (CMEMs), àquelas de aspecto fibroblastóide, isoladas de diversos tecidos, com característica de adesão ao plástico do frasco de cultura, crescimento em colônias e capacidade de diferenciação mutipotencial. Reserva-se a designação células-tronco mesenquimais para aquelas que preencham os critérios específicos de célula-tronco[44].

A sua origem é controversa, embora seja razoável supor que descenda da célula pluripotente fetal, persistindo durante toda a vida[45]. Apóia tal hipótese, o encontro de maior concentração de CMEMs em gestação precoce[46], diminuindo com o decorrer da gestação, provavelmente, dirigindo-se de seu sítio de origem para os tecidos fetais[47]. São ainda encontradas em tecido materno, mesmo após a gestação, participando de reparo tecidual[48-50].

Classicamente, no ser humano, a CMEM foi descrita na medula óssea[51;52], embora já tenha sido isolada do sangue periférico[53;54]; e de outros tecidos e órgãos, como do pulmão[55], do rim[56], do tecido adiposo[57], do tecido muscular esquelético[58], da membrana sinovial[59;60] e da cartilagem articular[61], do endotélio e subendotélio das veias[62;63], da vilosidade coriônica da placenta[64] e do sangue de cordão umbilical e placentário[65-67], do cordão umbilical[68], de tecidos fetais[46;69], da membrana amniótica[70;71], e do líquido amniótico[72-74].

As CMEMs apresentam-se como células fibroblastóides alongadas e fusiformes, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma

abundante, à microscopia de fase. Observam-se cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de poliribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades, à microscopia eletrônica[75]. Ocorre transição da morfologia das células durante o cultivo[76], de células alongadas tornam-se células grandes, achatadas e largas, com proliferação lenta[39]. Coram-se pela fosfatase alcalina, sudan-black, colágeno IV, fibronectina e não se coram pela esterase. Expressam em níveis variados os marcadores CD73, CD105, CD166 e Stro-1, não expressam CD14, CD34, CD45 (marcadores celulares hematopoiéticos) nem CD31, KDR (marcadores celulares endoteliais)[77;78]. Elas compartilham antígenos expressos por múltiplas linhagens celulares[79].

Em cultura, essas células apresentam três fases de crescimento: a) inicial, com duração de 3 a 4 dias, logo após o plaqueamento, com crescimento celular muito lento; b) logarítmica, durante as primeiras passagens, com crescimento acelerado; c) *plateau*: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão[80;81].

Após cultivo celular em baixa densidade, elas originam colônias[45]. Presume-se que estas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora[82]. Podem ser expandidas por mais de 50 vezes quando plaqueadas em baixa concentração celular (1,5 células/cm^2), e menos, quando plaqueadas em concentrações maiores[81]. São necessárias de 24 a 33 horas para duplicação celular durante a fase de crescimento logarítmico[83;84], com capacidade de duplicação de 4 a 50 vezes[45;80;85].

Apresentam proliferação mais rápida em altas concentrações de soro fetal bovino, porém, a velocidade de crescimento diminui próximo à confluência das colônias no frasco de cultura[84].

Normalmente, mantêm normal seu cariótipo e não perdem a atividade da telomerase. Contudo, no cultivo extenso, ocorre uma parada na proliferação celular, com sinais evidentes de senescência e/ou apoptose[47;86], por um encurtamento progressivo do telômero, secundário à perda progressiva da atividade da telomerase[87].

Essas células classificam-se pela citometria de fluxo em três subtipos de acordo com o tamanho e a complexidade interna: a) células pequenas e agranulares - RS1 (do inglês, *recycling stem cell*); b) células pequenas e granulares - RS2; c) células grandes e moderadamente granulares - mMSC (do inglês, *mature mesenchymal stem cell*). As células granulares encontram-se com ciclo celular ativo. As células RS2 aparecem por primeiro e expandem-se na primeira fase do cultivo. Na segunda fase, de crescimento logarítmico, diminuem em número, e as mMSC proliferam-se rapidamente. Ao final desta fase, as células RS2 desaparecem, e as células RS1 expandem-se[81].

Aproximadamente 10% das CMEMs em cultura encontram-se nas fases S + G2 + M, e a maioria na fase G0-G1 do ciclo celular[83], sugerindo alta competência em se diferenciar[47]. Podem se distinguir em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, miócitos, cardiomiócitos, células neurais e endoteliais[76;77;85;88-106]. Os eventos celulares e moleculares associados à diferenciação ainda não foram esclarecidos. A análise do nível da expressão

gênica por RT-PCR (reação em cadeia de polimerase pela transcriptase reversa) demonstra que a diferenciação acontece de acordo com o estímulo aplicado, na linhagem à qual foi induzida, mas não em células que expressam múltiplas linhagens[37].

As CMEMs apresentam propriedades imunossupressoras e indutoras de tolerância, o que pode ser positivo se pensarmos em sua aplicação em terapia celular. São mediadas pela interação com os linfócitos, envolvem a diferenciação das células T CD4+ em um fenótipo regulatório, a secreção de citocinas pelas células T efetoras e células NK (do inglês, *Natural Killer*), inibição da diferenciação dos monócitos em células dendríticas, inibição das células T alorreativas e da ativação preferencial de células T com fenótipo regulatório/supressor, inibição da proliferação, da quimiotaxia e da diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos[45;47].

Pelas suas características, como o fácil isolamento e cultura, amplo potencial de diferenciação, produção de citocinas e fatores de crescimento importantes na regeneração celular, as CMEMs mostram-se candidatas ideais para uso em medicina regenerativa[87;106]. Podem ser transplantadas por duas vias, o implante local e a inoculação sistêmica, com migração para o local da lesão. Em ambos os casos, agem na regeneração dos tecidos[37].

Estudos isolados de implante local dessas células para tratamento de defeitos ósseos, cartilaginosos, isquemia vascular arterial e outros, com sucesso, necessitam de confirmação por estudos duplos-cegos randomizados[77;87]. Ocorre migração das CMEMs, para o local da lesão, após injeção intravenosa das mesmas, em tratamento para enfarte do miocárdio,

isquemia cerebral e fratura óssea, embora com migração diminuída no cultivo *in vitro*[77]. A inoculação intrauterina das CMEMs, em modelo animal de osteogênese imperfeita, proporciona enxertia das mesmas nos ossos, com redução de dois terços das fraturas em ossos longos. Em humanos, sua inoculação em portadores de osteogênese imperfeita causa enxertia, das mesmas, em sítios ósseos, com diminuição significativa de fraturas[107;108]. É factível seu uso em terapia gênica[87;109], com fácil transdução, por uma variedade de vetores[45], na correção de erros inatos do metabolismo[109] ou para favorecer a expressão de genes suicidas na terapia anticâncer[110].

1.4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS FETAIS

O feto apresenta-se como potencial fonte para a terapia celular, pois pelo estado indiferenciado de suas células, quando transplantadas podem crescer, migrar e estabelecer conexões funcionais com as outras células[111].

A maioria das células fetais proliferam mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células após o nascimento[111-119]. Este efeito, porém, não é uniforme a todas as linhagens celulares[112-114;119;120]. Também, respondem melhor aos estímulos ambientais que células maduras[111]. Sobrevivem melhor com menores níveis de tensão de oxigênio, resistindo melhor à hipóxia em meio de cultura[121]. Algumas células fetais, como as hematopoiéticas, resistem melhor a criopreservação em comparação às células maduras[111;122;123]. As células mesenquimais fetais apresentam menor chance de rejeição em aplicações alogênicas, em implantes xenólogos, são

melhor toleradas[124-128]. Produzem altos níveis de fatores tróficos e angiogênicos, o que aumenta sua possibilidade de crescimento após o implante[129], e até dos tecidos vizinhos. Observa-se o fenômeno, mesmo quando não se demonstra a enxertia dessas células[130].

O uso de células fetais na terapia celular é vantajoso pelo fato de se tratar a doença antes que se estabeleçam lesões definitivas. A coleta, tão logo seja feito o diagnóstico da doença, permite o cultivo e expansão, em paralelo à gestação, para utilização o mais precoce possível, seja por inoculação direta, terapia gênica ou confecção de enxerto autólogo.

Existem tentativas de aplicações terapêuticas, utilizando-se células fetais desde o início do século passado. O primeiro transplante de tecido fetal documentado em humanos aconteceu, em 1922, com enxertia de glândula adrenal fetal em paciente portador de Doença de Addison[131]. Em 1928, células pancreáticas fetais foram transplantadas em tentativa de tratamento de diabete melito[132]. Em 1957 pela primeira vez foi instituído um programa de transplante de medula óssea fetal[133].

Recentemente, ainda que experimental, células fetais têm se mostrado úteis no tratamento de doenças neurológicas[134-140], síndrome de Wiskott-Aldrich[141;142], aplasia e hipoplasia tímica[143;144], doenças hematológicas [111;141;145-148], neuroblastoma[141;142;149], osteogênese imperfeita[108].

O primeiro relato do uso de células fetais, em associação com matrizes de polímeros biodegradáveis, data de 1987. Células fetais de fígado, intestino e pâncreas, formando neotecidos, foram implantadas de modo heterólogo e heterotópico, com sucesso, exceto naquele com células

pancreáticas[114]. Observa-se interesse crescente na utilização das células fetais em engenharia tecidual, para correção de diversos defeitos congênitos[97;112;113;119;120;150-152].

O uso terapêutico de células fetais era limitado pelo fato de sua obtenção ocorrer pelo aproveitamento de células ou tecidos obtidos de abortamentos[153], levando, às vezes, à contaminação da amostra; ou então por biópsia fetal direta ou por via videofetoscópica, podendo causar complicações maternas e fetais, tais como trabalho de parto prematuro, rompimento das membranas ovulares, infecção e lesões iatrogênicas[120;154;155]. Novos métodos de obtenção de células fetais tentam contornar esses problemas. O sangue periférico materno apresenta-se como fonte com menor risco fetal, porém oferece pequena quantidade de células fetais, frequente contaminação com células maternas e difícil expansão celular[156-159].

Outras fontes incluem células da placenta, do sangue fetal, do líquido amniótico, do cordão umbilical e da membrana amniótica. As duas últimas fontes, citadas acima, mostram-se extremamente valiosas, embora apresentem como desvantagem o fato de só poderem ser acessadas no momento do parto, inviabilizando a coleta e expansão celular em paralelo à gestação[71;160-167]. Apresentam pluripotência e capacidade de se diferenciar em células neurais e em hepatócitos[168-172], com emprego em modelo animal de tratamento de isquemia cerebral e lesão medular e como vetores em terapia gênica para o fígado[170-173]. As três primeiras fontes citadas acima apresentam como vantagem o fato de poderem ser acessadas ainda no

decorrer da gestação, fazendo parte da propedêutica normal, sobretudo quando uma malformação é diagnosticada pela ultrassonografia. A cordocentese e a biópsia vilo-corial, embora sejam fontes importantes de células fetais[174], apresentam risco maior de perda fetal, quando comparadas à amniocentese[175-177]. Esta é a técnica preferencial para a obtenção de células fetais em rotina diagnóstica em medicina fetal, realizada entre 16 e 18 semanas. Atualmente, é o método invasivo antenatal mais seguro. Em estudo clássico do Instituto Nacional Americano de Saúde e Desenvolvimento Infantil, de 1976, que analisou 1.040 mulheres submetidas à amniocentese, mostra-se risco de perda fetal de 3,5%, e de 3,2% no controle[178]. Em estudo colaborativo europeu, embora em pacientes muito mais velhas e com maior paridade que o controle, verifica-se taxa de perda fetal de 0,2 a 1,6%[179]. Em estudo colaborativo canadense[180], mostra-se taxa de perda fetal direta relativa à amniocentese, de 0,5%, taxa esta aceita por vários autores.

Apesar da larga e bem estabelecida utilização do líquido amniótico, e de suas células, em diagnóstico pré-natal de rotina citogenética, de seu estudo para avaliação da vitalidade fetal[181] e maturidade pulmonar fetal[182], o conhecimento atual a respeito da origem e propriedades destas células é limitado[183-187 188].

1.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

O líquido amniótico contém quantidade muito grande de células em suspensão, população celular esta variável com a fase da gestação e traduz as mudanças na formação do líquido amniótico e da maturação fetal e de seus anexos[184].

No primeiro trimestre de gestação, o líquido amniótico é formado pela passagem passiva de líquidos pela membrana amniótica, difusão simples e transporte ativo de solutos, podendo ser considerado um ultrafiltrado do sangue materno; além de descamação de células da vesícula vitelina, do embrião e posteriormente do feto[184;185], talvez da placenta[189;190] e ainda do amnion[191]. Entre a 17ª e a 20ª semana de gestação, acontece a queratinização da pele fetal, fazendo com que a deglutição e diurese fetal adquiram papel importante na formação do líquido amniótico[192]. Uma importante fonte adicional de fluido amniótico é a secreção a partir do trato respiratório[193-195]. As excreções do trato gastrointestinal do feto, conquanto não volumosas, também participam da composição do fluido amniótico[196;197]. Células desses compartimentos participam do pool encontrado no fluido amniótico. Varia-se o espectro de células no líquido amniótico quando existe defeito aberto fetal, como do tubo neural ou do abdome[184;185].

Com uma origem tão variada de células, pode-se inferir a presença de células-tronco embrionárias, germinativas e adultas em suspensão no líquido amniótico.

Em dois trabalhos pioneiros, observa-se a presença de células mesenquimais no líquido amniótico[198;199], que confirma a hipótese de origem mesenquimal de uma parcela de células do líquido amniótico, sugerida pela análise de produção de colágeno por essas células[200]. Confirma-se a origem mesenquimal de células do líquido amniótico pela constatação de que essas células, tanto quanto os fibroblastos expressam HLA Classe I (HLA-ABC), mas não apresentam Classe II (HLA-DR)[201].

A primeira observação de células progenitoras no líquido amniótico ocorreu em 1993, com a detecção de células nucleadas, arredondadas e pequenas, antes da 12ª semana de gestação, identificadas como células-tronco hematopoiéticas, possivelmente provenientes da vesícula vitelina[202].

Em 1996, sugere-se a presença de células de linhagem não hematopoiética, com potencial multilinhagem, no líquido amniótico, e demonstra-se a conversão miogênica destas[203]. Também se confirma a origem fetal das células mesenquimais, coletadas do líquido amniótico e cultivadas *in vitro*, por meio da tipagem molecular dos antígenos leucocitários humanos (HLA)[204].

Ampliam-se os achados anteriores, com a descrição de células embrionárias e fetais dos três folhetos germinativos no líquido amniótico[184;185;205;206].

Encontra-se também atividade de telomerase, relacionada à pluripotencialidade, em células nativas e em cultura de líquido amniótico de 14 semanas[207], além de maior comprimento dos telômeros, quando comparadas com as CMEMs de medula óssea[208;209].

Demonstram-se precursores neurais e células neuronais diferenciadas[210], mesmo em gestações em que não ocorre defeito aberto de tubo neural. Tais células expressam, ao lado de marcadores mesenquimais, outros relacionados a células neuronais, como NES (do inglês, *nestin*), TUBB3 (do inglês, *tubulin beta 3*), NEFH (do inglês, *neurofilament heavy polipeptide 200kDa*), NEUNA60 (do inglês, *neuronal nuclear antigen A60*), GALC (do inglês, galactosylceramidase) e GFAP (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*)[211].

No líquido amniótico, outras células são identificadas embora em muito pequeno número (1% das obtidas pela amniocentese)[151;206;212] que expressam OCT-4, *stem cell factor*, vimentina, fosfatase alcalina, NANOG (do inglês, *nanog homeobox*), SSEA4 (do inglês, *stage specific embryonic antigen 4*), CD34 (do inglês, *cluster differentiation 34*), CD105 (do inglês, *cluster differentiation 105*), CD117 (do inglês, *cluster differentiation 117*) e atividade de telomerase, normalmente, marcadores de células-tronco embrionárias, embora não exclusivas dessas[85;206;210;213-217]. Diferente das células-tronco embrionárias, elas não desenvolvem teratocarcinomas, quando implantadas[218;219].

Uma classificação das células que se obtem do líquido amniótico une critérios morfológicos, bioquímicos e de crescimento celular[205]. São classificadas em: células tipo E (epitelióides), derivadas da pele e urina fetal; células tipo AF (do inglês, *amniotic fluid*), específicas do líquido amniótico, produzem estrógeno, progesterona e gonadotrofina coriônica humana, são derivadas do âmnion e trofoblasto[220]; células tipo F (fibroblásticas),

derivadas do tecido conectivo fetal. Células tipo AF e E aparecem no início da cultura celular, as células tipo F aparecem em um segundo tempo, e só as do tipo AF e F persistem, enquanto que as do tipo E regridem[221].

Em trabalho pioneiro, foi identificado um tipo celular com característica de rápida proliferação, com positividade para vimentina, actina de músculo liso (SMA), citoqueratina 8 e 18 e proteína de superfície de fibroblastos (FSP), e negatividade para desmina e CD31; e confirma-se descender de linhagem mesenquimal (fibroblástica/miofibroblástica)[222;223]. Para essas células, outros meios de isolamento e cultura são descritos[73;224]; além do que se demonstra que a baixa tensão de oxigênio no meio de cultura facilita seu desenvolvimento clonogênico[225]. Elas permanecem diplóides, *in vitro*, mesmo após 250 duplicações[218]. Em condições de cultura com meio nutricional subótimo, a deficiência nutricional resultante induz à formação de agregados celulares, em multicamada, por provável perda de inibição de contato, por fim, senescência. Nesse caso, também são observadas alterações de cariótipo e poliploidia[226].

Estas células são comparadas com outras, obtidas por técnica minimamente invasiva, do tecido celular subcutâneo fetal e do adulto, para comparação de proliferação *in vitro*. Conclui-se que, elas proliferam significativamente mais rápido em meio de cultura, que as outras células semelhantes, fetais e de adulto[222;223]. Além disso, apresentam o mesmo potencial de expansão, mesmo quando coletadas por ocasião do parto[74;227], tornando-se senescentes somente após 27 passagens, por um período maior que 8 meses em cultura[74]. Mantêm capacidade proliferativa após 32

anos de criopreservação[96]. Demonstram também capacidade de aderência em bioprótese de polímeros de ácido poliglicólico e derme humana acelular[223].

As células mesenquimais do líquido amniótico (CMLAs) apresentam maior capacidade de expansão que células-tronco mesenquimais derivadas de outras fontes, como da medula óssea neonatal e de adulto e do cordão umbilical[73;228]. Enquanto as CMLAs atingem 3 milhões de células em 9 dias, as CMEMs da medula óssea expandem-se para quatrocentos mil células, em condições semelhantes de cultura e plaqueamento[229].

Em cultura, as CMLAs de ovinos, apresentam a característica de diminuição de imunogenicidade, à medida que o número de passagens celulares é aumentado[230]. As CMLAs humanas apresentam a propriedade de inibir em cultura a proliferação dos linfócitos T[209].

O fenótipo das CMLAs é bastante semelhante às células mesenquimais de outros tecidos, como aquelas originadas da medula óssea e do cordão umbilical. Expressam os antígenos de superfície da membrana celular CD29, CD44, CD90 e CD105. Não expressam CD31, característico de células endoteliais, e CD34 e CD45, característicos de células hematopoiéticas. Quanto ao CD73, alguns relatos demonstram expressão nessas células[221;229], enquanto outros monstram expressão somente nas células derivadas da medula óssea e não nas derivadas do líquido amniótico[72;73;85;224;228;231;232]. Esse mesmo padrão de imunofenótipo, do tipo mesenquimal, é mantido pelas CMLAs após isolamento, expansão, criopreservação e descongelamento depois de 5 meses[233].

A análise proteômica das CMLAs em cultura, pelo método MALDI-TOF-MS (do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectometry*), revela 261 proteínas diferentes, e quando se compara com a análise proteômica das CMEMs de medula óssea em cultura, observam-se 124 proteínas comuns, 137 relacionadas somente às CMLAs e 51 relacionadas somente às CMEMs de medula óssea[229]. A maioria das proteínas, originadas das duas fontes celulares, estão relacionadas funcionalmente ao crescimento e manutenção das células, e ao metabolismo celular, porém aquelas originadas das CMLAs apresentam proteínas que se referem à proliferação e manutenção celular que não são identificadas naquelas originadas das CMEMs da medula óssea[229].

Quanto à possibilidade de criopreservação das CMLAs, observa-se que podem passar pelo estágio de obtenção pela amniocentese, isolamento e expansão, criopreservação e posterior descongelamento para uso futuro, por 5 meses, tempo normalmente decorrido entre a amniocentese e o uso perinatal, sem perder suas características de expansão, viabilidade e imunofenótipo.

Só recentemente, foram observados relatos a respeito do potencial de diferenciação dessas células[73;234] que persiste durante toda a gestação, mesmo quando essas células são coletadas por ocasião do parto[74].

CMLAs de ovinos podem se diferenciar, em meio indutor, a progenitores miogênicos[234]. Quando infectado por vetor retroviral contendo MyoD, gene que regula a miogênese, induz diferenciação muscular, com a formação de miotúbulos e expressão de proteínas específicas, como a

distrofina[235]. Outro estudo também mostra diferenciação miogênica em CMLAs de camundongos em meio indutor, porém não em todas amostras[236].

CMLAs humanas diferenciam-se em neurônios, hepatócitos, fibroblastos, adipócitos, osteócitos, miócitos e condrócitos quando em meio facilitador[73;210;219;223;224;228;237-239]. Descreve-se, ainda, manutenção de potencial de diferenciação naquelas criopreservadas por 32 anos[96].

No entanto, questiona-se um fato importante. O líquido amniótico é fonte de células monopotenciais, já comprometidas com determinada linhagem, quando induzida, diferenciam-se somente em linhagem prédeterminada ou apresentam células multipotenciais ainda não comprometidas com nenhuma linhagem, isto é, a mesma célula pode, dependendo do estímulo, diferenciar-se em células das três linhagens germinativas?

Em 2007, foi adicionado importante dado que confirma e amplia estudos anteriores sobre a diferenciação das CMLAs. Pela marcação das células com um vetor retroviral, demonstra-se que uma única célula pode se diferenciar em seis linhagens diferentes, adipogênica, osteogênica, miogênica, endotelial, neurogênica e hepática[219]. A diferenciação dessas células em hepatócitos apresenta importante aplicação em insuficiência hepática, e foi realizada em estudo, de 2008, comparando-se com a diferenciação das CMEMs da medula óssea, mostrando superioridade das primeiras neste aspecto, com expressão maior de marcadores específicos hepáticos, além de taxas mais altas de proliferação e autorrenovação *in vitro*[240].

Quanto à diferenciação osteogênica das CMLAs, a metodologia parece ter especial importância, pois resulta em diferentes expressões gênicas das células derivadas[241]. O potencial de diferenciação osteogênico dessas células diminui após determinado número de passagens, semelhante ao observado com outras células mesenquimais, como as derivadas de medula óssea e do sangue de cordão umbilical[242;243]. As células derivadas das CMLAs mostram expressão gênica mais parecida com o tecido original, que as derivadas de outros tecidos[228].

Células ósseas, diferenciadas *in vitro*, provenientes das CMLAs, e aplicadas no subcutâneo de ratos imunologicamente deficientes, produzem grande aumento na formação óssea, sugerindo persistência do fenótipo osteoblástico, mesmo após transplante[244].

Estudos de diferenciação mostram que a cartilagem originada das CMLAs, é a que mais se aproxima da cartilagem fetal original, com maior quantidade de glicosaminoglicanas, matriz extracelular e elastina quando comparada com células derivadas das células mesenquimais de medula óssea e de cordão umbilical, embora tenha menor quantidade de colágeno tipo II que aquela de origem fetal[228;245]. Além disso, pode-se programar, de acordo com o uso a que se propõe, modificações nos meios indutores de diferenciação condrogênica das CMLAs, para produzir cartilagem com diferentes composições de matriz extracelular[246].

As CMLAs, diferenciadas em cartilagem, são utilizadas para construção de bioprótese e reparam lesão traqueal em modelo animal, por cirurgia intrauterina. Avaliadas no pós-parto, mostram inclusão celular das

células derivadas das CMLAs na bioprótese, com características histológicas e de conteúdo de glicosaminoglicanas, colágeno e elastina semelhantes à cartilagem original. Após o parto, observa-se nos animais 80% de respiração espontânea, embora com presença de estenose traqueal leve a moderada em todos os casos[247].

Para reparo cirúrgico de lesão diafragmática, em ovinos, compara-se: material protético cultivado com CMLAs, sem CMLAS e cultivado com mioblastos fetais. Encontra-se superioridade do primeiro, com maior quantidade de elastina[212]. Realiza-se a mesma comparação com a bioprótese aplicada em cirurgia no pós-parto e obtem-se melhor resultado funcional e mecânico naquela cultivada com CMLAs[151].

Para o tratamento de lesão de bexiga urinária em modelo animal, o transplante de CMLAs causa hipertrofia das células musculares vesicais, por fusão com células teciduais restantes e pela secreção de fatores de crescimento, embora com discreta diferenciação miogênica *in vivo* [248].

Quando se secciona o nervo ciático de ratos, e realiza-se o transplante de CMLAs no local, observa-se crescimento do axônio em 50% dos tratados e em nenhum dos controles, 50% desenvolvem movimentos parciais do membro correspondente ao nervo lesado, e em nenhum dos controles. A ação sugerida é a provável interação com as células de Schwann, através da secreção pelas CMLAs de fatores neurotróficos, porém, não se observa diferenciação evidente das mesmas[249;250]. O autor citado estuda a interação das CMLAs com o G-CSF (do inglês, *granulocyte-colony stimulating factor*), em lesão de nervo periférico, e demonstra que

essa associação apresenta melhor resultado na mielinização e recuperação da função motora[251].

Encontra-se enxertia e reversão da isquemia, com reperfusão, em modelo animal de isquemia cerebral, com transplante de CMLAs autólogas e células-tronco neurais embrionárias, inoculadas em ventrículo cerebral. Mostra-se melhora sensorial e motora, comparável ao efeito neuroprotetor das células-tronco neurais embrionárias, sem os impedimentos éticos encontrados na inoculação dessas últimas[252].

Em xenotransplante de CMLAs humanas, inoculadas em ventrículo cerebral de rato, mostra-se a incorporação dessas células e migração para diferentes sítios cerebrais, com expressão de células neurais primitivas e diferenciadas e migração para o local da lesão em isquemia cerebral[253].

Em outro relato, CMLAs humanas são induzidas para diferenciação neurogênica, embora expressem marcadores neurais primitivos, não expressam marcadores de neurônios dopaminérgicos completamente diferenciados, mesmo quando inoculadas em cérebro de modelo animal (rato) de Doença de Parkinson[254]. Além disso, após três semanas, não se observa a presença das CMLAs, com reação inflamatória, sugestiva de rejeição aguda no local da injeção[254].

Tenta-se também aplicação terapêutica em cardiologia, em experimento animal. Em infarto agudo do miocárdio, CMLAs autólogas são aplicadas no local de isquemia. Observa-se mudança no padrão de expressão gênica das células inoculadas, com perda dos marcadores de indiferenciação e com permanência dos marcadores de músculos lisos e

endoteliais. Não ocorre expressão do marcador de cardiomiócitos, a troponina I. Isso demonstra que as CMLAs transdiferenciam-se em células vasculares, mas não em cardiomiócitos[216].

Um relato do uso de CMLAs marcadas, em cocultura com tecido cardíaco de rato, demonstra expressão de marcadores específicos cardíacos, com integração ao tecido cardíaco e diferenciação em células muito semelhantes a cardiomiócitos[255].

CMLAs humanas, em cocultura com tecido cardíaco de rato, transplantadas em modelo animal de infarto do miocárdio (xenotransplante), apresentam rejeição, com ou sem ciclosporina, em animal imunocompetente ou imuno-deficiente. Além disso, em alguns animais ocorre a formação de uma massa no miocárdio, sugestiva de produto de diferenciação condro-osteogênica[256].

Após inoculação de CMLAs humanas em coração de camundongo, observa-se sua localização e migração, por meio do uso de método de imagem por ressonância nuclear magnética[257].

Pela engenharia tecidual, válvulas cardíacas autólogas podem ser criadas, a partir de CMLAs humanas que expressam CD133, separadas por magnetismo e inoculadas em polímeros de biodegradação rápida. Apresentam tecido endotelial e matriz extracelular, o fechamento e a abertura das valvas mostra-se eficiente e demonstram potencial terapêutico importante[258]. Após criopreservação, por 4 meses, as CMLAS que expressam CD133, separadas por magnetismo, são inoculadas em polímeros de biodegradação rápida para formação de válvulas cardíacas

autólogas com imunofenótipo, perfil histológico e funcional comparável às não criopreservadas[259].

Demonstra-se integração de CMLAs humanas em epitélio de pulmões de embriões de camundongos em cultura, com a expressão do marcador de diferenciação inicial humana TTF1 (do inglês, *thyroid transcription factor 1*)[260]. Elas, quando injetadas em veia caudal de camundongos com deficiência imunológica combinada severa, após lesão pulmonar por hiperoxigenação, migram para porções distais do pulmão e expressam TTF1 e a proteína surfactante C, marcador de pneumócito tipo II[260]. Quando as células progenitoras Clara são lesadas, do compartimento brônquioalveolar do pulmão de camundongos com deficiência imunológica combinada severa, ocorre incorporação e diferenciação das CMLAs inoculadas, comprovadas pela produção da proteína 10-kDa, específica das células Clara[260].

CMLAs em cocultura com rins fetais murinos incorporam-se às estruturas primordiais renais, além de expressar marcadores específicos de células renais, podem apresentar papel na regeneração renal[261].

Terapia gênica é uma das aplicações possíveis para as CMLAs, que obtidas de camundongo são transfectadas por baculovírus, mantendo imunofenótipo compatível com células mesenquimais e preservando seu potencial de diferenciação miogênico, osteogênico, adipogênico e neurogênico[236]. CMLAs humanas são transduzidas por vetor adenoviral, sem alteração em seu imunofenótipo, expressando os marcadores transgênicos LacZ e EGFP, além dos marcadores de pluripotencialidade OCT-4 e SSEA4[262]. Quando em meio indutor de diferenciação, as CMLAs infectadas

permanecem com capacidade de se diferenciar em osteócitos e adipócitos[262]. A relação da eficiência de trandução das CMEMs da medula óssea e das CMLAs é de um décimo, demonstrando o potencial dessas últimas[262].

As vantagens das CMLAs em relação às células-tronco embrionárias (questionamentos éticos e formação de tumores) e em relação às células-tronco adultas (baixa taxa de proliferação e potencial de diferenciação restrito) torna-as opção preferencial para a terapia de base celular. Além disso, sua grande capacidade de expansão em cultura, diminuição de imunogenicidade, capacidade de se diferenciar em células da linhagem mesenquimal, parece a opção mais indicada como fonte celular em engenharia tecidual para construção de tendões autólogos e substitutos fibromusculares, para utilização no feto patológico, intraútero, em fase mais tardia da gestação, ou logo após o nascimento.

Para o crescimento celular, utiliza-se em laboratório, meio de cultura apropriado, com composição variável, de acordo com o tipo celular que se deseja selecionar. Trabalho recente da literatura demonstra a diferença do potencial de expansão das CMLAs em três tipos de meio de cultura, MSCGM (do inglês, *Mesenchymal Stem Cell Grow Médium*), PC-1 e RPMI-1640 (do inglês, *Roswell Park Memorial Institute-1640*), além de mudança no padrão de diferenciação neural e do potencial de re-estabelecimento de cultura após criopreservação, dependendo do meio utilizado[263].

O soro adicionado ao meio de cultura exerce função importante no crescimento celular, pelos fatores de crescimento, hormônios, aminoácidos e

proteínas que o constituem, proporcionando nutrição às células, além de favorecer a aderência das células ao frasco de cultura[264-266]. Ainda não foi definido nenhum meio de cultura livre de soro para o cultivo das células mesenquimais[267]. Tentativas de obtê-lo existem[268], embora a formulação seja extensa, experimento-dependente, levando a uma infinidade de soros específicos a cada aplicação[269].

O meio de cultura padrão para expansão dessas células utiliza o soro fetal bovino para enriquecimento. Isso pode gerar controvérsia quando se pensa no emprego em humanos das células cultivadas nesse meio, pois como apresentam componentes de origem não humana, estas células podem ser consideradas veículos de vírus estranhos ao ser humano[270], como também de príons (encefalopatia espongiforme bovina), causando uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob[271-273], além de potencial causa de infecções bacterianas[274]. Reações inflamatórias e imunes locais podem acontecer pela contaminação com proteínas bovinas[275-279], mesmo após lavagens repetidas na cultura[280], podendo levar à formação de anticorpos e rejeição do enxerto ou das células transplantadas[84].

Outro enfoque é a substituição do soro fetal bovino, pelo soro humano[84;281].

Em publicação recente, o soro fetal bovino é substituído pelo soro humano em meio de cultura para células mesenquimais de medula óssea[281]. Como resultado, observa-se crescimento semelhante, quando em soro bovino ou humano, na dosagem de 10%. Outro estudo semelhante mostra discordância no resultado, com menor potencial de crescimento das células

mesenquimais com soro humano[84]. O potencial de diferenciação osteogênica das células cultivadas em meio suplementado com soro humano é maior[84] e com maior estabilidade na expressão dos transcritos de diferenciação[266]. Outro estudo mostra resultado semelhante, com maior potencial de diferenciação e manutenção dessa capacidade, em culturas de longa duração[282]. Outro ainda, com células mesenquimais de sinóvia, mostra maior potencial condrogênico quando em cultivo suplementado com soro humano[281].

Além disso o Serviço Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América – NIH (do inglês, *National Institute of Health*) e o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), por exemplo, não homologam aplicações em humanos de produtos, nos quais se utiliza soro fetal bovino quando em cultura.

Em vista do exposto acima, em trabalho recente, preparando-se para aplicação em humanos, com o fim de construir neotecido com as CMLAs para correção de hérnia diafragmática, o grupo de pesquisadores que deu impulso inicial ao uso dessas células em engenharia tecidual[222], isola e cultiva essas células em meio suplementado com soro fetal bovino e soro humano, para comparação[232]. Em ambos os meios, apresentam, crescimento semelhante e também mostram os mesmos marcadores antigênicos de superfície de membrana celular, compatíveis com as células mesenquimais, nem expressam marcadores hematopoiéticos ou endoteliais[232].

Os organismos vivos, desde vírus até o ser humano, utilizam o mecanismo da transcrição de partes específicas de seu genoma para executar funções biológicas críticas, durante seu ciclo de vida, em resposta a sinais ambientais ou de crescimento[283]. A transcrição é passo essencial na regulação dos processos biológicos e os fatores de transcrição são considerados os determinantes principais da diferenciação celular[284]. Eles podem informar o nível de diferenciação ou de indiferenciação dessas células. Quanto mais diferenciada menor plasticidade apresenta a célula, e mais comprometida com determinada linhagem. Recentes pesquisas mostram que os transcritos OCT-4, NANOG e o SOX2, exercem papel essencial e coordenado, bloqueando gens que, ausentes os transcritos, desencadeiam diferenciação[285-290]. Além disso, demonstra-se reprogramação de células diferenciadas adultas, retornando ao estado de pluripotência, por meio da técnica iPS (do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells*), pela introdução dos fatores de pluripotência OCT-4 e SOX2 na mesma[290-293]. A pluripotência é mantida por meio de um processo denominado autorrenovação. Ele confere a algumas células a capacidade de se dividir, mantendo seu estado de indiferenciação, tanto pela divisão celular simétrica, como assimétrica[294].

Inicialmente, descrito por Scholer[295], 0 OCT-4 é o primeiro gen identificado como regulador mestre da pluripotência[287]. É descrito como uma proteína de ligação do DNA, do homeodomínio POU, codificado por 324 aminoácidos ORF[295]. O OCT-4 depende de dois domínios de transativação no DNA para exercer suas atividades de transcrição[296]. É sintetizado e

transportado para o núcleo por meio do típico NLS (do inglês, *nuclear localization signal*)[297]. O NLS do OCT-4 é necessário para a atividade de transcrição, sem o qual, ocorre diferenciação das células-tronco embrionárias[297]. O padrão de expressão do OCT-4 sugere que ele pode regular as características celulares do desenvolvimento embrionário inicial[295]. Embriões deficientes de OCT-4 desenvolvem-se até o estágio de blastocisto, porém as células da massa celular interna não apresentam pluripotência[287]. Nas células-tronco embrionárias, sua ação é dose dependente; e em maior ou menor concentração induz a diferenciação, e somente em concentração padrão pode manter a indiferenciação[288]. Esta concentração ótima é regulada pela ação de outros genes reguladores[296]. Um desses reguladores é o NANOG, que tem a característica de manter a autorrenovação das células-tronco embrionárias, na ausência de LIF (do inglês, *leukocyte inhibitory factor*)[286;289]. Age como forte ativador da expressão do OCT-4[298]. O SOX2 age, frequentemente, associado ao OCT-4 na regulação da expressão gênica[299;300], sendo necessário na formação do ectoderma extraembrionário, e em associação com o OCT-4 na sequência de diferenciação das células pluripotentes na fase de implantação[301]. O SOX2 é necessário para manter a concentração ótima do OCT-4, mantendo as células-tronco embrionárias no estado pluripotente[302;303]. A regulação dos genes OCT-4, SOX2 e NANOG é exercida sobre alvos sobrepostos, incluindo um grupo importante de proteínas homeodomínio relacionadas ao desenvolvimento do embrião[285]. Boyer e colaboradores propõem que o OCT-4, SOX2 e NANOG cooperam na formação de um circuito regulatório,

contribuindo para a pluripotência e autorrenovação das células-tronco embrionárias[285], de maneira similar que outros grupos[304-307].

A Figura 2, mostra, em diagrama de Venn, o número de gens regulados por essa tríade (OCT-4,SOX2 e NANOG), isolados ou em associação.

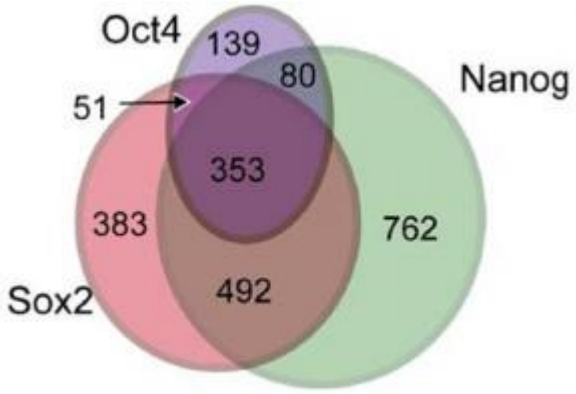


Figura 2 - Diagrama de Venn, demonstrando o número de gens regulados pelos transcritos OCT-4, NANOG e SOX2 (fonte: Boyer et al., 2005)

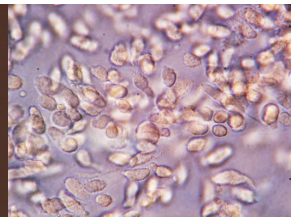
As CMLAS mostram-se como excelente fonte celular para terapia fetal. A futura utilização dessas células em ensaios clínicos, em humanos, depende de maneiras eficientes de sua obtenção, cultivo e expansão. Se cultivadas em soro humano, podem evitar possíveis problemas quanto à transmissão de príons, bactérias e fenômenos alérgicos. Quanto mais indiferenciada for essa célula, maior será seu potencial de uso em múltiplas aplicações, e para provar esse estado, deve-se demonstrar sua capacidade de derivação em diferentes tecidos, como por exemplo, em osso e em cartilagem. Além disso, a presença de marcadores de pluripotência e autorrenovação, como o OCT-4, SOX2 e NANOG podem significar presença

de células primitivas no líquido amniótico, indiferenciadas, aumentando ainda mais o interesse nessas células.

Ao se pensar na utilização futura das CMLAs em seres humanos, em terapia de base celular, é proposto estudo comparando a expansão e a caracterização dessas células, quando cultivadas com suplementação de soro fetal bovino ou soro humano. Além disso, por primeiro na literatura revisada, analisa-se a diferenciação osteogênica e condrogênica e a expressão gênica de transcritos relacionados à pluripotência celular, o OCT-4, o NANOG e o SOX2, nos dois grupos.

A Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) é centro de referência em Medicina Fetal e recebe pacientes que têm indicação para a coleta de líquido amniótico durante a gestação, para estudo do cariótipo fetal. O Laboratório de Investigação Médica - LIM57, vinculado à Disciplina de Obstetrícia da FMUSP é aliado ao Laboratório de Genética e Hematologia Molecular - LIM31, vinculado à Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP, apresentam estrutura física para tal estudo, estando o último, vinculado à Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo, fornecedora do soro humano para o estudo.

OBJETIVOS



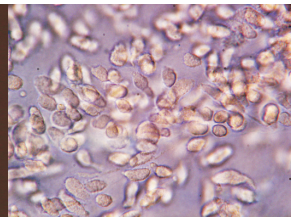
2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as células mesenquimais do líquido amniótico (CMLAs) em meio de cultura, comparando a suplementação com soro fetal bovino (SFB) e com soro humano (SH).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Análise de seu isolamento e cultivo;
2. Caracterização de seu padrão de crescimento;
3. Análise morfológica;
4. Análise do imunofenótipo;
5. Avaliação de sua capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica; e
6. Caracterização da expressão dos genes OCT-4, NANOG e SOX2.

MÉTODOS



O presente estudo experimental foi conduzido, utilizando-se células presentes no líquido amniótico, obtidas de gestantes da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os ensaios de crescimento, diferenciação e expressão gênica foram realizados nas dependências do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular - Laboratório de Investigação Médica 31, da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP; o ensaio de imunofenotipagem foi realizado no Laboratório de Imunopatologia do Serviço de Hematologia da Divisão de Clínica Médica I – HCFMUSP; A avaliação morfológica das CMLAs foi feita no Laboratório de Biologia Molecular – Laboratório de Investigação Médica 59, do Departamento de Patologia da FMUSP. Todos os ensaios foram conduzidos pelo próprio autor.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projeto de Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP em 09/08/2007, e encontra-se registrado sob o número 0414/2007.

As gestantes doadoras foram orientadas, verbalmente e por escrito, sobre o projeto de pesquisa, sua justificativa, seus objetivos e riscos, bem como os benefícios obtidos com a conclusão do estudo. Assinaram e receberam uma cópia do termo de consentimento (ANEXO A), foram informadas sobre os nomes dos responsáveis pela pesquisa (pesquisador e orientador), e de como deveriam proceder em caso de dúvidas. A privacidade dos envolvidos foi preservada em todas as fases da pesquisa.

3.1 MATERIAL

Amostras de líquido amniótico foram usadas e obtidas por amniocentese de gestantes que preenchiam os critérios para inclusão no projeto.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

No estudo, foram incluídas gestantes que preenchiam os seguintes critérios:

- gestação sem intercorrências clínicas ou obstétricas, com indicação para investigação de cariótipo fetal, por idade materna avançada;
- idade gestacional entre 16 e 22 semanas;
- ausência de defeito estrutural fetal observado em ultrassonografia morfológica;
- concordância em participar do estudo, assinando termo de consentimento informado.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A exclusão estava prevista nas seguintes condições:

- desistência em participar do projeto;
- ocorrência de acidente durante a amniocentese, ocasionando contaminação do líquido amniótico com sangue materno;

- cariótipo fetal alterado;
- malformação estrutural constatada ao nascimento;
- falha de expansão das células, em cultura; e
- contaminação bacteriana e/ou fúngica da cultura celular.

3.4 COLETA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

A obtenção de células do líquido amniótico foi realizada no ambulatório do Setor de Medicina Fetal, por meio de amniocentese clássica ou de segundo trimestre, realizada entre 16 e 22 semanas de idade gestacional, confirmada por ultrassonografia de primeiro trimestre, indicada por idade materna superior a 35 anos.

Após a assinatura do consentimento informado, esclarecendo a finalidade, os riscos e o motivo do procedimento, a paciente permaneceu em decúbito dorsal horizontal. Inicialmente, doi realizada uma ultrassonografia a fim de confirmar-se idade gestacional, localização da placenta, volume de líquido amniótico, morfologia e vitalidade fetal que foi feita após assepsia do abdome com iodopovidona tópica e cobertura do transdutor com plástico estéril. Não se utilizou anestesia local para o procedimento[308].

Para a realização da punção, foram usadas agulha calibre 20 ou 22 *gauge* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), com 9 cm de comprimento e seringa descartável de 20 mL.

A punção sempre foi guiada pela ultra-sonografia, preferencialmente sem transfixar a placenta. No caso de impossibilidade, foi realizada punção

trans-placentária[309]. A agulha foi inserida através da parede abdominal, em seguida, pela parede uterina, atingindo a cavidade amniótica, sempre observando seu trajeto à ultra-sonografia, procurando um grande bolsão, distante do feto, preservando-o. Retirado então o guia da agulha, conectou-se a seringa (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e aspirou-se pequena quantidade de líquido amniótico. Descartou-se a primeira amostra, pelo risco de contaminação com células maternas. A segunda amostra, então, foi utilizada para o estudo. O volume aspirado, normalmente de 30 mL, foi dividido em duas amostras, uma delas (20 mL), seguiu para cariotipagem fetal e a outra para nosso estudo (10mL). Finda a aspiração, a agulha e seringa foram retiradas conjuntamente. Pela ultrassonografia, foi avaliado, o trajeto da agulha e observadas a presença ou ausência de sangramento no mesmo e a vitalidade do feto.

Após permanecer em repouso durante alguns minutos, a paciente foi orientada a respeito de sintomas pós-procedimentos, tais como, dor, febre, perda de líquido ou sangramento e orientada a retornar às suas atividades rotineiras. Não se fez necessária a profilaxia da aloimunização ao fator Rh, com administração de 300µg de imunoglobulina anti-D, pelo fato das pacientes selecionadas apresentarem fator Rh positivo.

3.5 PREPARAÇÃO DO SORO HUMANO

O plasma humano foi obtido do estoque regular do Banco de Sangue e Hemo-derivados da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo,

por doação voluntária de sangue de pacientes sadios, com sorologia negativa para as principais doenças infecciosas transmitidas pelo sangue e seus derivados (já padronizadas em bancos de sangue), processado e armazenado pela Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo.

Ao plasma, foi adicionado trombina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), na concentração de 10 UI/mL que permaneceu à temperatura de 4º C, por 24h. Após esse tempo, foi centrifugado a 60.000 x *g* por 56 minutos em ultracentrífuga Beckman L7-55 (Beckman, Palo Alto, CA, USA), utilizando-se rotor 50 Ti Beckman (Beckman, Palo Alto, CA, USA). O soro foi obtido do sobrenadante, e o coágulo formado descartado. Após a passagem em filtro de 0,22 µm Milex Durapore (Millipore Corp, Billerica, MA, USA) para esterelização, ele foi inativado a 56°C por 45 minutos. Para padronização do soro humano com o soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum Standard - HyClone™, Logan, UT, USA), foi analisado o conteúdo de proteínas das amostras dos soros, utilizando-se o método de Lowry[310]. Pelo resultado dessa análise, as diferentes concentrações de proteínas nos soros foram corrigidas para 0,4 mg/mL, com a adição de PBS (do inglês, *phosphate buffered saline*) 1X (não diluído), para que atingissem a mesma concentração encontrada no soro fetal bovino, que seria usado nos experimentos, possibilitando, portanto, a comparação entre eles.

P3.6 CONTAGEM CELULAR EM HEMOCITÔMETRO E ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Por ocasião do estabelecimento da cultura e nas passagens subsequentes, as suspensões celulares sempre foram contadas, com o intuito de se estabelecer padronização no cultivo e expansão. Para tanto, foi utilizado hemocitômetro, também, conhecido como câmara de Neubauer. É um tipo especial de lâmina de vidro, para uso em microscópio, construída com o fim de contagem celular. É dividida em quadrantes de área definida, sobre o qual a suspensão celular é distribuída e diluída em volume conhecido. pela contagem de células nesse volume, aplica-se cálculo apropriado para aferir a concentração de células da amostra.

Sempre que necessário as amostras de suspensão celular foram diluídas em tubos cônicos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de 15 mL, em meio α-MEM (do inglês, *minimum essential medium eagle – alfa modification*) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) suplementadas com 20% de SFB (soro fetal bovino) ou SH (soro humano), de acordo com a origem da amostra. A seguir, foi adicionada solução de azul de Trypan 0,4% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) em volume conhecido para posterior análise da concentração e viabilidade celular. Cada amostra foi homogeneizada e desta, 10 µL foram colocados no hemocitômetro. As células não coradas, presentes nos quatro quadrantes da câmara, foram contadas em microscópio ótico (Olympus CBA, Tokyo, Japan). A concentração das células foi determinada pela divisão por quatro do número total de células

contadas, multiplicado pelo fator de correção (10.000) e pelo fator de diluição da solução de azul de Trypan 0,4%.

A viabilidade celular da amostra foi analisada pela contagem do número de células não coradas (viáveis) em relação às coradas (não viáveis), expressas em porcentagem. Esta análise é possível pela propriedade das células viáveis de não permitir o azul de Trypan no espaço intra-celular.

3.7 TRIPSINIZAÇÃO

As CMLAs secretam uma matriz extracelular e proteínas de ligação que permitem sua adesão à superfície de crescimento. É necessário um tratamento prévio com enzima proteolítica, a tripsina, por exemplo, para que as células percam sua adesão. Para que isso ocorra, é preciso que o SFB, o cálcio e o magnésio do meio sejam removidos, de forma a afrouxar a ligação célula – célula e permitir o acesso da enzima proteolítica à superfície das células. Para tanto, o frasco de cultivo foi lavado com 10 mL de PBS 1X por duas vezes, após a remoção de todo o meio. A seguir, a solução de versene-tripsina (ATV) (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil) foi acrescentada, no volume de 5 mL para os frascos de 175 cm^2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), com o objetivo de recobrir toda a monocamada de células. A amostra, então, foi incubada a 37°C por 1 minuto e após, as células foram visualizadas ao microscópio de contraste de fase para confirmação de perda de adesão. A tripsina foi inativada com 10 mL de

meio α-MEM 20% SFB ou SH, conforme o grupo a qual a amostra pertence. Estas células foram transferidas para um tubo de polipropileno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) previamente identificado, centrifugadas por 10 minutos a 1800 rpm. Após o descarte do sobrenadante, ao botão celular homogeneizado foram acrescentados 2 mL do meio de cultivo. Uma amostra destas células foi separada para contagem. Após a determinação do número de células coletadas, alíquotas foram separadas e destinadas para uso nos ensaios previstos.

3.8 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

As amostras coletadas pela amniocentese foram transportadas imediatamente para o laboratório, transferidas para tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e centrifugadas em 1800 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, o precipitado foi removido e re-suspenso em tubo cônico de polipropileno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo 2 mL do meio α-MEM (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). O total de células foi contado, com método já descrito acima. Uma fração de 300.000 células de cada amostra (cinco pertencentes ao grupo B e cinco pertencentes ao grupo H) foi re-suspensa em frasco de cultura (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) de 175 cm^2. As amostras componentes do grupo B continham 25 mL de meio α-MEM (Gibco Division, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) acrescidas de 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Penicillin –

Streptomycin – Gibco Division, Invitrogen, Carslbad, CA, USA), enriquecidas com 20% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum Standard – Gibco Division, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), previamente inativado a 56°C por 45 minutos. As amostras componentes do grupo H foram re-suspensas em frascos com as mesmas especificações, com meio semelhante, exceto pela substituição do soro fetal bovino por soro humano (Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo, SP, Brasil), também na concentração de 20%, inativado a 56 ºC por 45 minutos. Permaneceram, então, em ambiente de estufa de cultura, a 37°C, com 95% de umidade, e CO_2 a 5%.

O cultivo celular foi monitorado sob microscopia ótica invertida e o meio de cultura foi trocado duas vezes por semana, utilizando-se o mesmo meio suplementado descrito acima, após remoção do antigo. As CMLAs foram isoladas das outras presentes no líquido amniótico, pela sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão em meio de cultivo com altas concentrações de aminoácidos e proteínas (soro bovino fetal e soro humano), sem uso de outros fatores de crescimento além daqueles presentes no soro usado. A cultura foi mantida até se obter confluência celular de 70%, quando as células foram coletadas, após tripsinização.

3.9 ENSAIOS COM AS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

3.9.1 Avaliação da expansão celular em cultura

A capacidade de expansão em cultura das CMLAs, variando-se somente o soro utilizado, seja ele de origem fetal bovina ou humana, foi

analisada por meio da construção de curvas de crescimento celular para as amostras do grupo B (soro fetal bovino) e H(soro humano).

Após a confluência celular de 70% em todos os frascos de cultura (grupos B e H), procedeu-se a tripsinização e contagem em hemocitômetro das CMLAs em cultura. Triplicatas de alíquotas, contendo 1.000, 5.000, 10.000 e 15.000 células de cada amostra dos grupos B e H, foram ressuspensas em placas contendo 48 poços para cultura celular (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), para avaliação da capacidade de expansão das CMLAs.

A contagem do número de células das triplicatas de cada dosagem de inóculo primário (1.000, 5.000, 10.000 e 15.000), das cinco amostras de cada grupo (B e H) foi realizada desde o dia 1 do início do ensaio, após tripsinização. Durante 14 dias, foi repetida e, posteriormente, inserida em gráfico, para análise comparativa das curvas de crescimento celular entre os dois grupos.

3.9.2 Avaliação da morfologia das células

O cultivo celular foi monitorado sob microscopia ótica a cada troca de meio de cultura.

Após a confluência celular de 70% em todos os frascos de cultura (grupos B e H), procedeu-se a tripsinização e contagem em hemocitômetro das CMLAs em cultura. Alíquotas contendo 5.000 células dos grupos B e H foram ressuspensas em placas, contendo três poços para cultura celular (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), para análise morfológica,

coradas por Leishman e visualizadas por microscopia ótica, no terceiro dia de cultivo celular. Alíquotas contendo 10.000 células de cada amostra, dos grupos B e H, foram ressuspensas em tubos cônicos de polipropileno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), e centrifugadas em 1800 rpm por 10 minutos.

Após a centrifugação, o botão celular foi encaminhado para fixação do material. Foi ressuspenso em solução de 500 µL de glutaraldeído 2% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) + tampão fosfato 0,1 M por duas horas. Findo esse processo foi adicionado tetróxido de ósmio 1% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) por uma hora. Realizada, então, a lavagem do botão celular com solução padrão com 1,2g de cloreto de sódio (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) + 14,6g de sacarose (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) + 20 mL de água destilada. A seguir, o botão celular permaneceu durante 12 horas em solução de uranila, formado pelos componentes da solução de lavagem descrita acima + 1g de acetato de urinila (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). Realizada, então, a desidratação do botão celular em gradientes crescentes de acetona (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) por 10 minutos cada, iniciando-se por 30°C, 70°C, 95°C e quatro banhos de 100°C. Removida a solução de desidratação, a amostra celular foi incluída em composto de resina epóxi e óxido de propileno (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), em temperatura ambiente por três horas, à temperatura de 37°C por uma hora e à temperatura de 60°C por 72 horas. O bloco resultante foi cortado por facas de vidro Knife Maker 400x25x8mm em micrótomo Leica EM KMR2 (Leica Corp., Tokyo, Japan) e preparado para

visualização sob microscopia eletrônica em microscópio JEOL 1010 (Jeol Ltd., Tokyo, Japan).

3.9.3 Imunofenotipagem

A citometria de fluxo foi usada para a avaliação das características dos antígenos de superfície da membrana celular da população de CMLAs. A identificação dos antígenos foi realizada pelo uso de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com dois fluorocrômos diferentes, o isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*). Para se obter calibração adequada do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra, utilizou-se um controle negativo.

Após tripsinização, já descrita anteriormente em item específico, as células foram quantificadas em hemocitômetro e re-suspendidas em 500 µL de PBS 1X. Dessa suspensão, uma alíquota de 100 µL contendo 500.000 células foi transferida para tubo específico de citometria de fluxo, previamente identificado, para os diferentes marcadores.

A seguir, foram adicionadas a cada alíquota identificada 5 µL da solução preparada, contendo o anticorpo monoclonal marcado com os fluorocrômos. As amostras foram incubadas em ambiente sem luz, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Forãm acrescentados 2 mL de PBS 1X a cada tubo e centrifugados a 300 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi re-suspenso em 500 µL de paraformoldeído 1% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA).

Para a identificação da população celular, foi montado um painel contendo os seguintes marcadores de superfície da membrana celular: CD14 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcador de monócitos; CD45 FITC (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcador pan-leucocitário; CD29 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), CD44 FITC BD (PharMingen, San Jose, CA, USA), CD90 FITC (BD PharMingen, San Jose, CA, USA) e CD105 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcadores de células-tronco mesenquimais; CD34 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA) e CD117 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcadores de células-tronco hematopoiéticas, CD31 FITC (BD PharMingen, San Jose, CA, USA) e CD106 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcadores de células-tronco endoteliais; e CD133 PE (BD PharMingen, San Jose, CA, USA), marcador de células-tronco neurais e progenitores endoteliais. Para todos os pacientes foram realizados controle negativo IgG FITC (BD PharMingen, San Jose, CA, USA) e IgG1 PE (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Após a marcação celular realizada, a amostra foi cadastrada e criada uma máscara de aquisição celular com os parâmetros do tamanho celular (*FSC-foward side scatter*) e complexidade interna (*SSC-side scatter*), ambos em escala linear. Foi delimitada, então, a região da população de CMLAs pelo gráfico e pelo histograma. A aquisição celular foi realizada por meio da intensidade de fluorescência, captada pelo citômetro de fluxo, no aparelho *FacScalibur*™ (Becton Dickinson, San Jose, CA. USA). Os dados foram analisados no *CELLQuest*™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.9.4 Diferenciação

3.9.4.1 Diferenciação Osteogênica

Após a confluência celular de 70% em frasco de cultura das amostras dos grupos B e H, identificadas para o ensaio, procedeu-se à tripsinização e contagem em hemocitômetro das CMLAs. Alíquotas de 1 mL, contendo 3.000 células que foram ressuspensas em placas contendo seis poços para cultura celular (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), para avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica das CMLAs.

A presença da fosfatase alcalina e a produção de cálcio *in vitro* foram analisadas. A indução de diferenciação celular foi realizada 72 horas após o início do cultivo. Nesta ocasião, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para a diferenciação osteogênica ou somente com o meio (α-MEM 20% SFB ou SH, dependendo do grupo) para o controle de indiferenciação. O meio indutor era composto por α-MEM 20% SFB, 10µM de fosfato-2-ascorbato (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e 10mM de β-glicerofosfato (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 por 21 dias, e o meio foi trocado duas vezes por semana.

Para a visualização da produção de cálcio pelas células diferenciadas, primeiramente, as células foram fixadas com paraformoldeído 4% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas em água corrente e coradas por 15 minutos com Alizarina (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). O cálcio

produzido pelas células foi visualizado pela marcação avermelhada. Para o controle de indiferenciação, também, foi realizado o mesmo procedimento de coloração.

Para visualização da enzima fosfatase alcalina nas células, o poço da placa de cultura específico foi lavado com PBS 1X concentrado. Em seguida, foi utilizada a solução de coloração Naphthol AS-MX; N,N-Dimetilformamida (C_3H_7NO); *Fast red*; Tri-HCL (ScienceLab, Houston, TX, USA) e incubada por 30 minutos a 37℃. Logo após os poços foram lavados novamente com PBS 1X e fixados com para-formoldeído 4% (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) por 5 minutos. Por fim, foram lavados com água destilada. A presença de fosfatase alcalina pode ser observada em coloração cor-de-rosa. Para o controle de indiferenciação, também, foi realizado o mesmo procedimento de coloração.

3.9.4.2 Diferenciação Condrogênica

Após confluência celular de 70% em frasco de cultura das amostras dos grupos B e H, identificadas para o ensaio, procedeu-se a tripsinização e contagem em hemocitômetro das CMLAs. Alíquotas de 1 mL, contendo 3.000 células que foram ressuspensas em tubos cônicos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de 15 mL, para avaliação da capacidade de diferenciação condrogênica das CMLAs. Foram centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos, após, o meio sobrenadante foi eliminado. O botão celular restante foi cultivado com meio indutor de diferenciação condrogênica no próprio tubo, mantido em estufa de cultura celular a 37°C com 5% de CO_2

por 72 horas. O meio indutor foi trocado duas vezes por semana. O meio indutor era composto por α-MEM 20% SFB, suplementado com 10 ng/mL de TGF-β1 (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e 100 nM de dexametasona (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA).

Após 21 dias de cultivo, o meio de cultura foi retirado totalmente e o botão celular foi fixado com formol tamponado 10%, e emblocado em parafina para análise histológica. Foram realizados cortes de 3 µm e colocados sobre lâminas silanizadas. A coloração com hematoxilina e eosina foi usada para analisar e identificar a morfologia e tipo celular.

3.9.5 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão dos genes relacionados à indiferenciação das CMLAs em cultura e a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) foi utilizada. Para tanto, o RNA total foi extraído pelo método do Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) obtido a partir das dez amostras de células em cultura, após a primeira passagem, com confluência de 70%, sendo as cinco primeiras amostras de células cultivadas em meio com soro humano (grupo H) e as cinco amostras restantes, cultivadas em meio com soro fetal bovino (grupo B).

Após a remoção do meio de cultivo, foram adicionados às placas de 175 cm^2, 750 µL de Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A mistura foi homogeneizada e coletada com o auxílio de uma pipeta e a seguir congelada a - 80°C até o momento do uso.

Depois do descongelamento, foram adicionados às amostras, em gelo, 200 µL de clorofórmio puro (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA) e, a seguir, foi realizada agitação vigorosa por 15 segundos em *vórtex.* Na sequência, esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada por 12.000 x *g* por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo.

Em uma etapa posterior, foi realizada a precipitação do RNA, usando para cada tubo 500 µL de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas a -20°C por 16 horas e, após esse período, centrifugadas por 12.000 x *g* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentado ao *pellet*, 1 mL de etanol a 75%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 7.500 x *g* por 5 minutos a 4°C, ressuspensas com água dietil-pirocabonato (DEPC).

A síntese do cDNA (do inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*) foi realizada com a amplificação do gene de interesse, em uma única etapa. Para tal, foi utilizado o kit *Pure Taq Ready to Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), reconstituído com água DEPC, ao qual foram adicionados 0,2 µg de RNA total e 10 µM de cada seqüência iniciadora (*primers*), em um volume final de 50µL.

As amostras foram transcritas reversamente em termociclador PTC-200 (MJ Research, MA, USA), por 30 minutos a 50° C; e posteriormente amplificados por 30 ciclos com temperatura de anelamento de 57° C e extensão final por 8 minutos à 72° C.

Os seguintes controles foram usados: branco (reação na ausência de RNA), como controle de contaminação dos reagentes utilizados; as células MRC-5 (derivadas de fibroblastos pulmonares de paciente sadio), como controle negativo e as células NTERA-2 cl.D1 (derivadas de carcinoma embrionário pluripotente testicular), como controle positivo (ANEXO B).

Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídeo (0,1µg/mL), visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta .

Para a análise da expressão dos genes relacionados à indiferenciação celular foram selecionados genes específicos envolvidos nesse processo: NANOG, SOX2 e OCT-4 respectivamente. As seqüências dos *primers* utilizados encontram-se nos dados da Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos *primers* utilizados para a análise da expressão dos genes NANOG, SOX2 e OCT-4, das células mesenquimais do líquido amniótico

PRIMER	**SEQÜÊNCIAS 5'→3'**	**TAMANHO (pb)**
NANOG*	atgagtgtggatccagcttg (senso) ccatggatctgcttattcagg (antissenso)	191
SOX2**	cctccgggacatgatcag (senso) gaactggagggggagaa (antissenso)	178
OCT-4***	cgtgaagctggagaaggagaagcta (senso) caacatgtgtaagctgcggcccttg (antissenso)	247

* - NANOG – do inglês, *nanog homeobox*; ** - SOX2 - do inglês, *sex determining region Y-2*; *** - OCT-4 - do inglês, *octamer 4*; pb – pares de bases

3.10 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

A amostra necessária para realização deste estudo foi calculada, supondo-se significativa uma diferença de 1 log na base 10 entre o crescimento celular na amostra suplementada com soro bovino e a com soro humano; e com base no desvio padrão observado para o log 10 do número de células proliferadas no 8º dia. Verificou-se que uma amostra de apenas dois pacientes para cada tipo de soro já acarretaria poder e confiança dos testes acima de 95% com base na metodologia descrita em Fisher e Belle, em 1993[311].

3.11 CARACTERÍSTICA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO

As amostras de líquido amniótico utilizadas no presente estudo, provinham de cinco gestantes acompanhadas no ambulatório do Setor de Medicina Fetal da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da FMUSP, encaminhadas para realização de ultrassonografia morfológica e investigação de cariótipo fetal, durante o ano de 2008. Obedeciam aos critérios de inclusão do mesmo e nenhuma foi excluída.

A média da idade das gestantes, na ocasião da coleta de líquido amniótico era de 38 assim, a mais jovem contava 37 e a mais velha 40 anos. Eram quatro as primigestas e uma secundigesta, sem antecedentes de qualquer adversidade clínica ou obstétrica na gestação anterior. Todas as amostras foram coletadas estando as pacientes com gestação de 21

semanas. Não houve nenhum caso de transfixação da placenta por ocasião da amniocentese.

As amostras de líquido amniótico, coletadas das cinco gestantes (10 mL, cada), foram identificadas par a par, homogeneizadas e divididas aleatoriamente, para uso em dois grupos de estudo (5 mL cada). As células derivadas das amostras do primeiro grupo foram, posteriormente, cultivadas em meio com a suplementação de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum Standard – Gibco Division, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), denominado grupo B. As células derivadas das amostras do segundo grupo foram, posteriormente, cultivadas em meio com a suplementação de soro humano (Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo, SP, Brasil), denominado grupo H.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

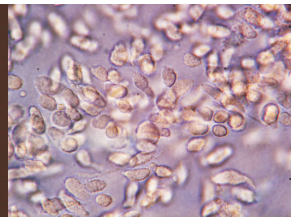
Para analisar a viabilidade das CMLAs quando cultivadas em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino ou humano, primeiramente, foram calculadas as médias de cada amostra. O valor obtido foi utilizado para comparar a viabilidade celular, em meio suplementado, entre os dois soros, com o uso do teste Wilcoxon pareado[312].

Os perfis médios foram traçados com os respectivos erros-padrão das amostras celulares, em meio suplementado com soro fetal bovino e humano, para cada um dos números de células iniciais (1.000, 5.000, 10.000, 15.000), e verificada a existência da proliferação celular com o uso de curvas de

crescimento, supondo matriz de correlação componente simétrica[313] para cada um deles, e comparadas as curvas, sendo o tipo de soro o fator aleatório, e o dia, o fator fixo.

Os seguintes *softwares* foram utilizados para análise dos dados: Excel 2003, SAS 8.0 e SPSS 15.0.

RESULTADOS



4.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

Ao redor do 4º dia, as culturas de CMLAs, por ocasião da primeira troca de meio de cultura, apresentaram, à microscopia ótica, uma população visível de células esparsas, pequenas em relação aos queratinócitos, observados na inoculação celular primária, com relação núcleo-citoplasmática grande, aderidas ao plástico do frasco de cultura. Apresentaram a característica de crescer em colônia e conforme se estabelecia confluência, as células tornaram-se mais afiladas, produzindo com o tempo material amorfo extracelular, organizando-se em multicamada (Figuras 3 e 4). O tempo médio para atingir a confluência de 70% foi de 11 dias, com desvio padrão de 3 dias, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos B e H.

Não houve falhas de cultura com as amostras obtidas no presente estudo nem contaminação fúngica ou bacteriana.

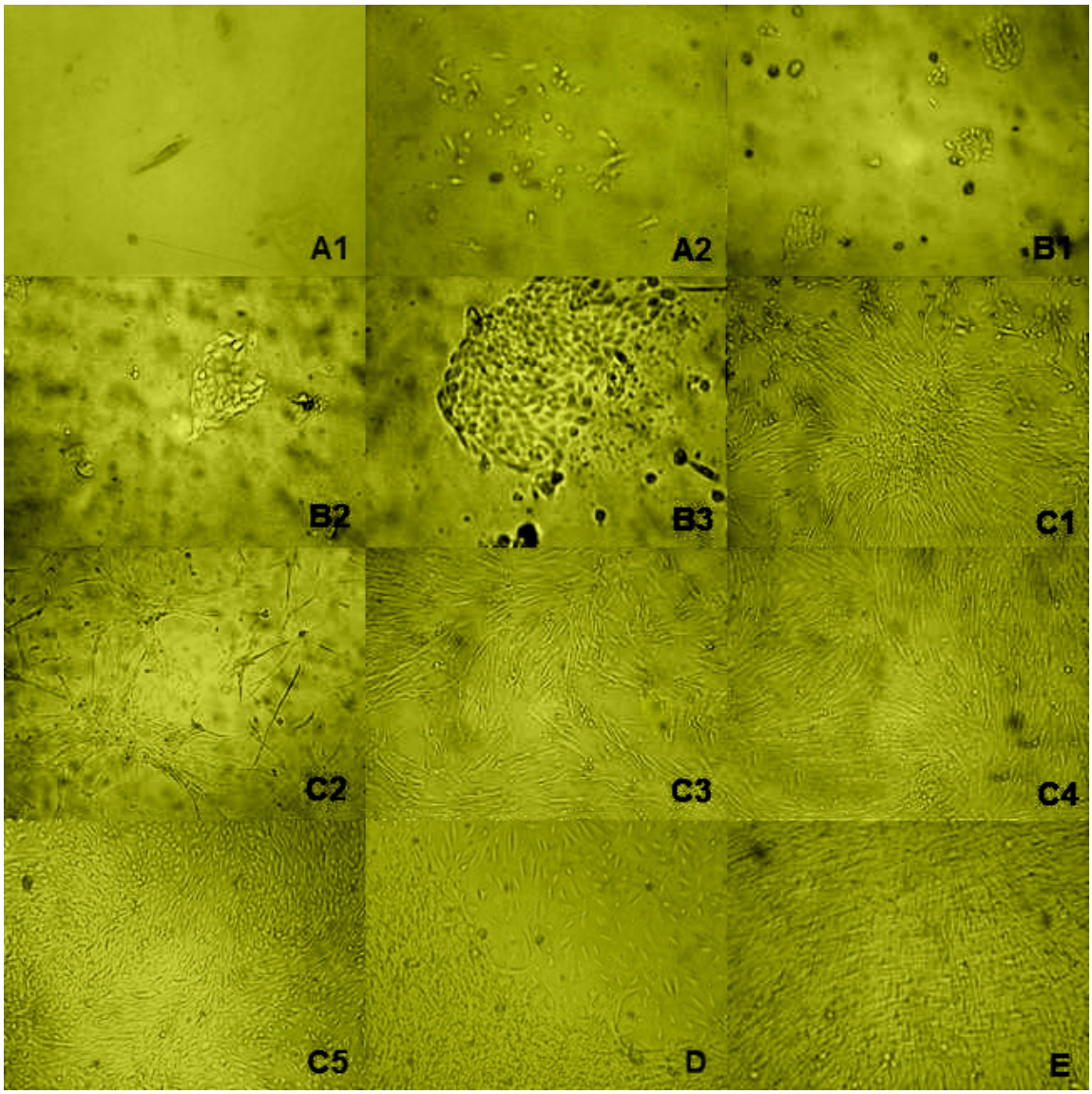


Figura 3 – Cinética das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementada por soro fetal bovino, observando-se adesão inicial das células ao frasco (**A1**, **A2**), crescimento em colônias (**B1**, **B2**, **B3**), confluência celular (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**), produção de material amorfo extracelular (**D**), e organização celular em multicamadas (**E**); aumento de 400X

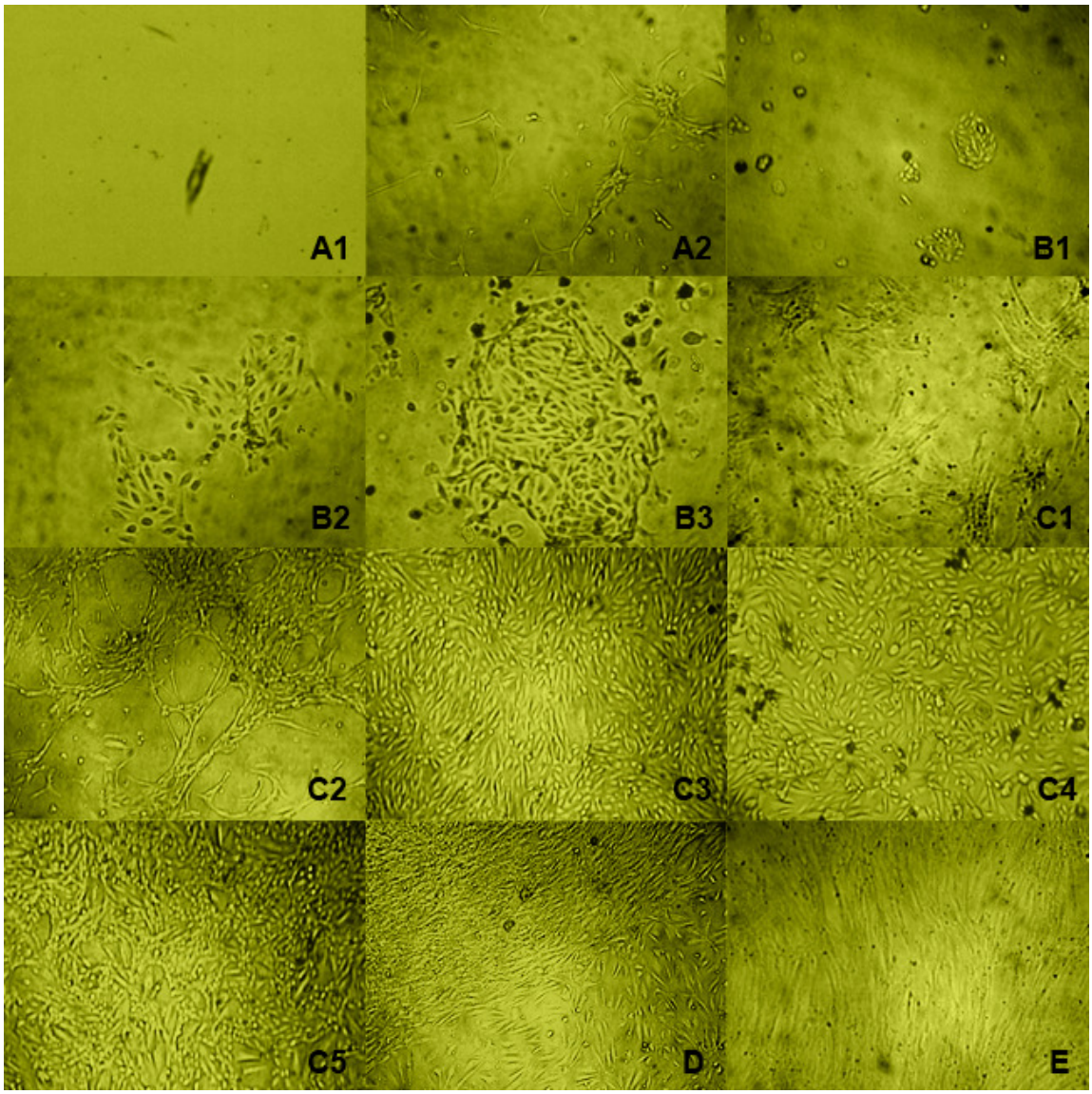


Figura 4 – Cinética das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementada por soro humano, observando-se adesão inicial das células ao frasco (**A1**, **A2**), crescimento em colônias (**B1**, **B2**, **B3**), confluência celular (**C1**, **C2**, **C3**, **C4**, **C5**), produção de material amorfo extracelular (D), e organização celular em multicamadas (**E**); aumento 400X

4.1.1 Avaliação da expansão das CMLAs em cultura, com meio suplementado por soro humano ou soro fetal bovino

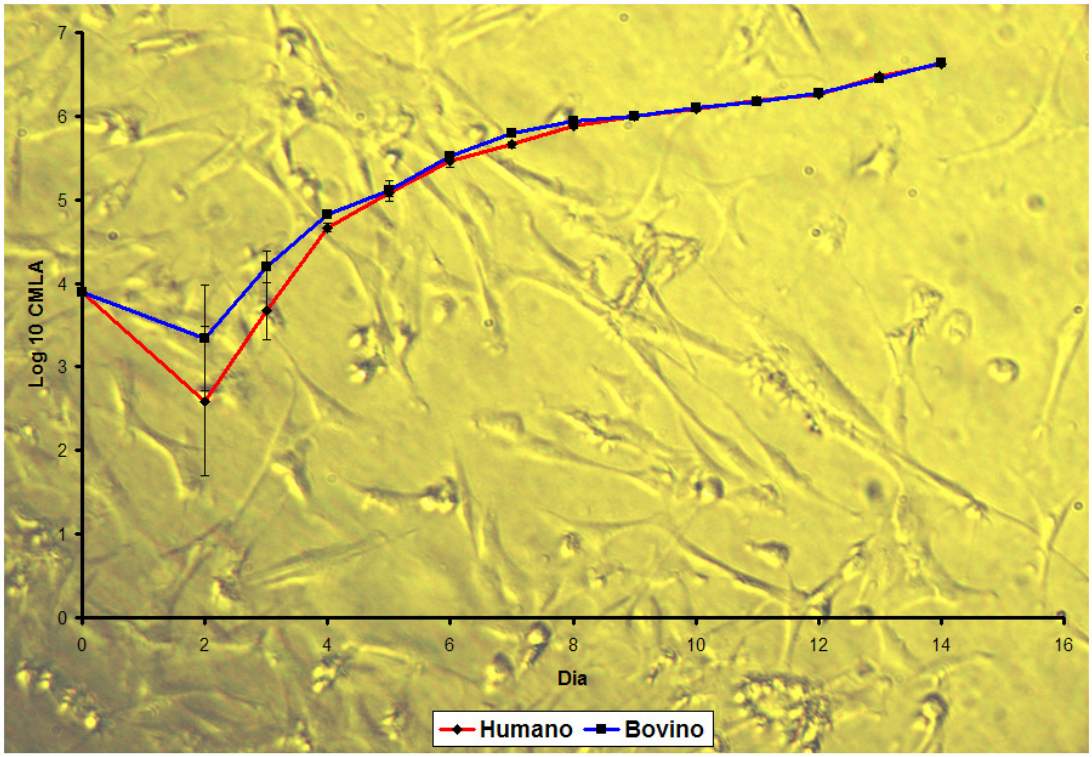
Não houve diferença estatística entre a expansão das CMLAs em meio de cultura, com suplementação de soro fetal bovino ou humano (p=0,715) (Tabela 2 e Gráfico 1). Não se observou diferença estatística entre elas, quando se considerou a evolução dia-a-dia (p=0,681). As inflexões nas curvas (ao atingir o *plateau*) ocorreram próximo ao 8º dia. As curvas de crescimento, individualizadas por diferentes densidades de inóculo celular inicial, encontram-se no ANEXO C.

Tabela 2 - Descrição do crescimento médio em log_{10} e desvio-padrão, das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, quando o meio foi suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia, demonstrando, dia-a-dia, a média de crescimento celular, o desvio-padrão e o número de amostras da análise

DIA	SORO					
	HUMANO			BOVINO		
	MÉDIA	DP	n	MÉDIA	DP	N
0	3,89	0	5	3,89	0	5
2	2,59	1,99	5	3,34	1,42	5
3	3,67	0,76	5	4,20	0,42	5
4	4,67	0,10	5	4,83	0,09	5
5	5,09	0,11	5	5,10	0,27	5
6	5,46	0,16	5	5,52	0,09	5
7	5,66	0,09	5	5,79	0,05	5
8	5,88	0,04	5	5,94	0,01	5
9	6,00	0,02	5	5,99	0,01	5
10	6,09	0,03	5	6,09	0,02	5
11	6,19	0,03	5	6,18	0,02	5
12	6,26	0,02	5	6,27	0,03	5
13	6,48	0,06	5	6,44	0,02	5
14	6,63	0,01	5	6,63	0,02	5

MÉDIA – média do crescimento celular em log_{10}; DP – desvio padrão; n – número de amostras

Gráfico 1 - Perfil médio do crescimento em log_{10} e erros-padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia



4.1.2 Avaliação da viabilidade celular das CMLAs em cultura, suplementada com soro humano ou soro fetal bovino

A média e a mediana da viabilidade celular nos grupos B e H (p=0,686) não variaram significativamente. os dados da Tabela 3 ilustram a análise.

Tabela 3 - Descrição da viabilidade das células mesenquimais do líquido amniótico, em meio, com soro fetal bovino e humano e o resultado da comparação entre elas

SORO	MÉDIA(%)	DP	MEDIANA(%)	MÍNIMO(%)	MÁXIMO(%)	n	p
SH	94,16	2,95	95,52	89,13	96,13	5	0,686
SFB	94,10	2,63	95,18	89,67	96,40	5	

SH – soro humano; SFB – soro fetal bovino; DP – desvio padrão; n – número de amostras

4.1.3 Avaliação morfológica das CMLAs em cultura, suplementada com soro humano ou soro fetal bovino

Tanto no grupo B como no grupo H, as células apresentaram-se, morfologicamente, em cultura como células afiladas com núcleo bem delimitado, com um ou dois nucléolos bem evidentes, citoplasma amplo, limites imprecisos e borda irregular (Figuras 5 e 6).

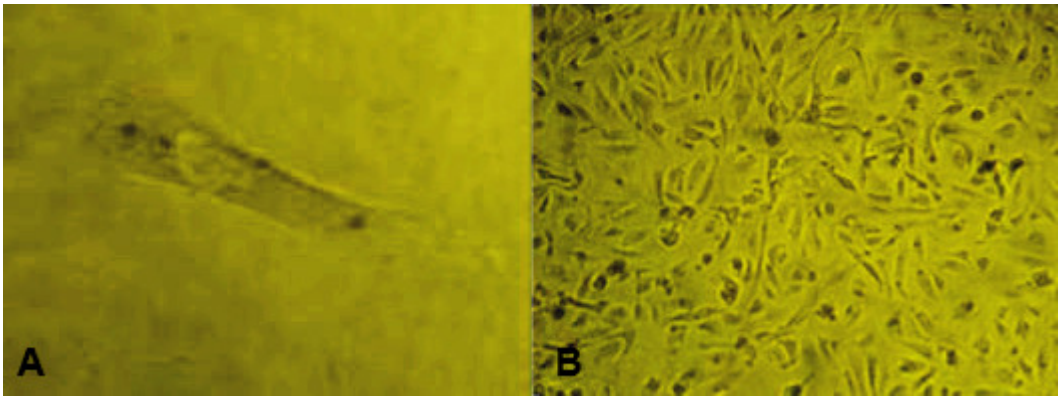


Figura 5 – Células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementada por soro fetal bovino, afiladas, com aspecto fibroblastóide (aumento 800X) (**A**), organizando-se em colônias (aumento 400X) (**B**)

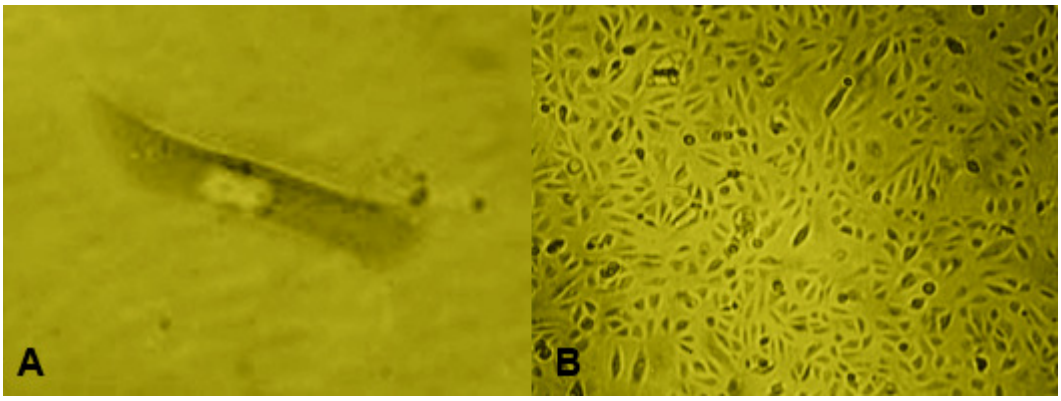


Figura 6 – Células mesenquimais do líquido amniótico em cultura suplementada por soro humano, afiladas, com aspecto fibroblastóide (aumento 800X) (**A**), organizando-se em colônias (aumento 400X) (**B**)

As CMLAs quando coradas por Leishmann apresentam-se como células fibroblastóides alongadas e fusiformes, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante à microscopia ótica, tanto naquelas derivadas do grupo B como do grupo H.

À microscopia eletrônica, foram observados filamentos de actina bem organizados em suas extremidades, com cisternas do reticulo endoplasmático rugoso dilatadas, corpos lisossomais e polirribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos em fileira, e grande quantidade de vacúolos lipídicos cheios ou vazios. Quando foram comparadas células derivadas do grupo B e H, notou-se maior quantidade de vacúolos lipídicos cheios no último grupo (Figura 7).

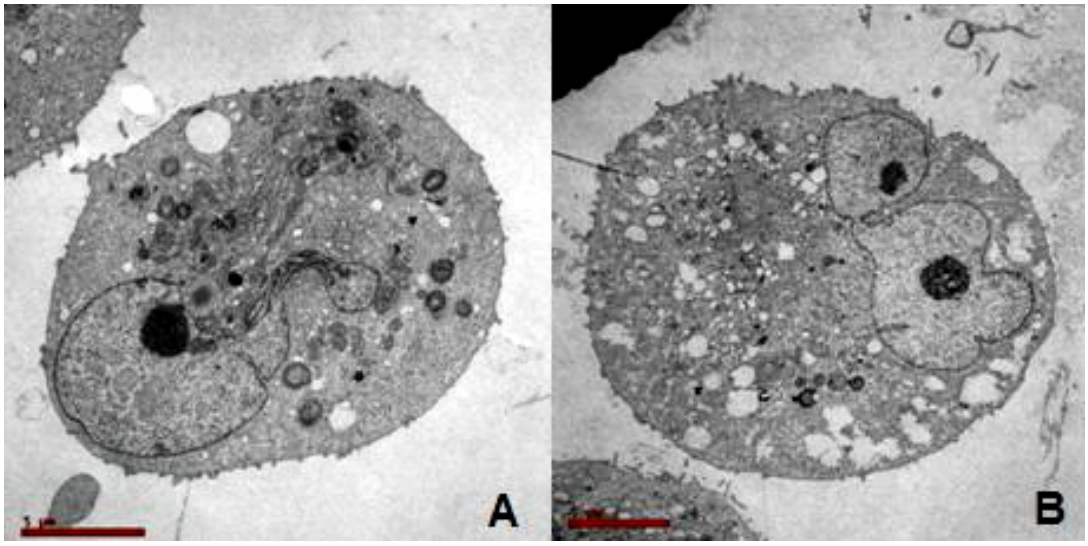


Figura 7 – Células mesenquimais do líquido amniótico, do grupo B (**A**) e do grupo H (**B**), visualizadas pelo microscópio eletrônico, com mesma ampliação (6000X), demonstrando maior número de vacúolos lipídicos cheios, naquelas suplementadas com SH

4.1.4 Imunofenotipagem

Os resultados demonstraram que as células possuem algumas características imunofenotípicas específicas de células-tronco mesenquimais, tanto para as células cultivadas com SH, bem como com SFB não ocorrendo diferença significativa entre os dois grupos. Em ambos, a expressão foi muito baixa (< 5%) para os marcadores leucocitários (CD14 e CD45), endoteliais (CD31 e CD106), de células-tronco neurais e progenitores endoteliais (CD133). Apresentaram baixa expressão (<20%) para os marcadores de células-tronco hematopoiéticas (CD34 e CD117) e alta expressão (>70%) para os antígenos característicos de células-tronco mesenquimais (CD29, CD44, CD90 e CD105).

Os resultados da imunofenotipagem das CMLAs cultivadas em meio de cultura suplementada com SH ou SFB estão representados na forma de histograma (Figuras 8 e 9) e em porcentagem das células que pelo tamanho e complexidade interna se localizaram no *gate* específico, previamente definido, que expressam cada um dos antígenos avaliados (Tabela 4).

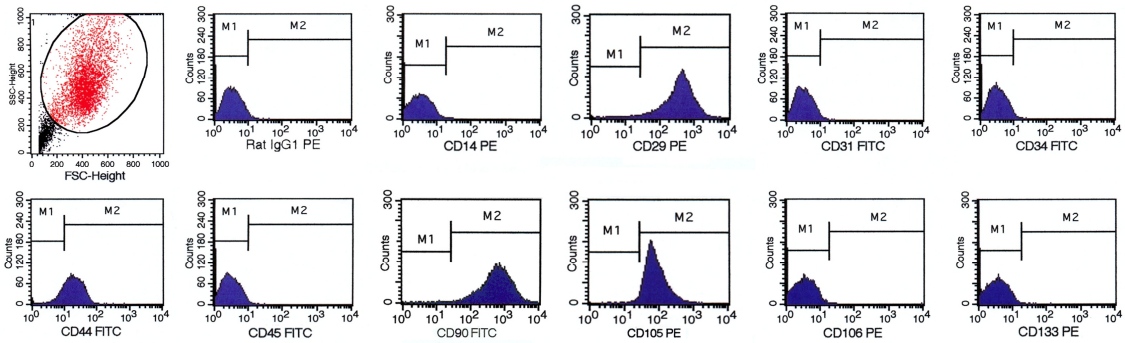


Figura 8 – Histogramas da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais do líquido amniótico, cultivadas em meio suplementado com soro humano, demonstrando as características de expressão dos antígenos de superfície dessas células

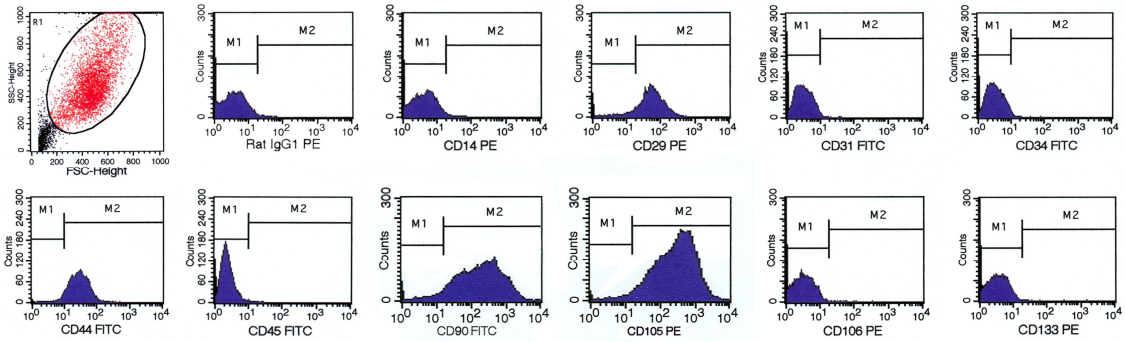


Figura 9 - Histogramas da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais do líquido amniótico, cultivadas em meio suplementado com soro fetal bovino, demonstrando as características de expressão dos antígenos de superfície dessas células

Tabela 4 – Médias das porcentagens de expressão dos diferentes antígenos de superfície das células mesenquimais do líquido amniótico, em meio de cultura suplementados com soro humano ou soro fetal bovino, no *gate* da citometria de fluxo

	CD14	CD29	CD31	CD34	CD44	CD45	CD90	CD105	CD106	CD117	CD133
SH	2,85	84,93	1,55	10,71	72,00	4,44	83,27	89,31	0,39	17,85	0,12
SFB	1,78	89,27	0,20	11,70	72,28	2,80	79,56	83,72	2,09	17,17	0,18

SH – soro humano; SFB – soro fetal bovino; CD – do inglês, *cluster of differentiation*

4.1.5 Diferenciação

Observou-se cor vermelha à microscopia ótica, em todas as culturas de amostras de ambos os grupos (B e H) e, em nenhum dos controles, quando coradas pela Alizarina, demonstrando produção de cálcio pelas células. Percebem-se, ainda, células contendo cristais de carbonato e oxalato de cálcio. Isso confirma a diferenciação osteogênica (Figura 10).

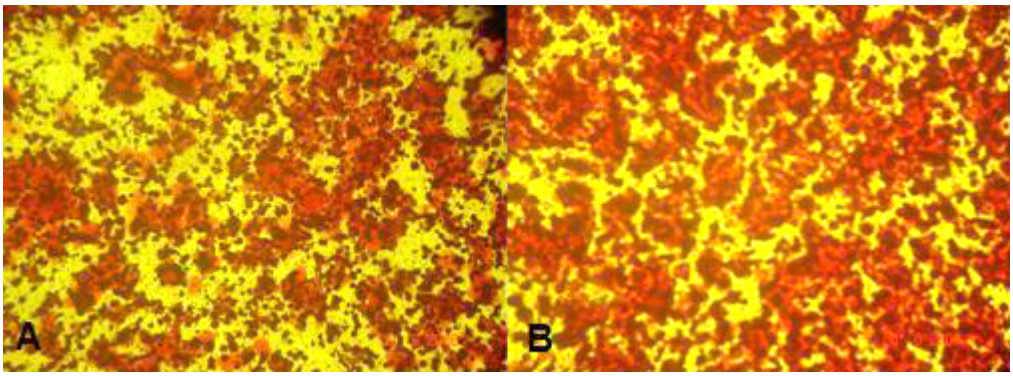


Figura 10 - Microscopia ótica, invertida, corando o cálcio produzido pelas células derivadas das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com meio suplementado com soro humano (**A**) e com soro fetal bovino (**B**), demonstrando diferenciação osteogênica; aumento 400X

A coloração para fosfatase alcalina mostrou-se fracamente positiva nos frascos de cultura celular com meio indutor de diferenciação osteogênica, tanto do grupo B como do grupo H, sem diferença significativa entre eles (Figura 11).

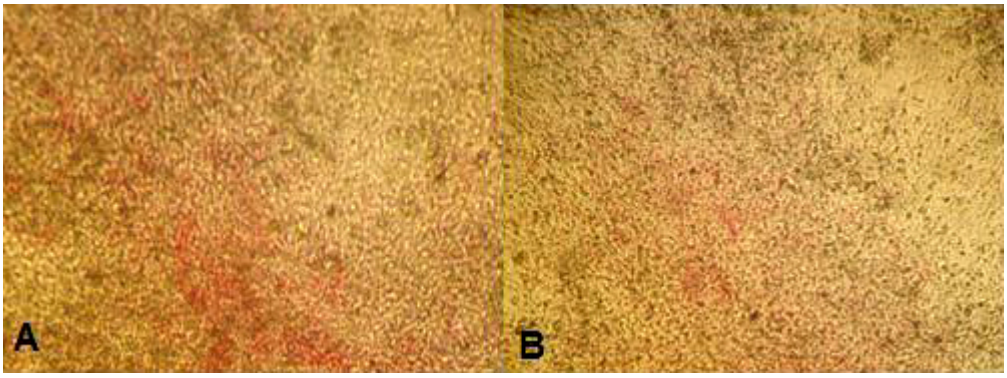


Figura 11 - Microscopia ótica, invertida, corando, discretamente, a fosfatase alcalina, demonstrando diferenciação osteogênica das células derivadas das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura, com meio suplementado com soro humano (**A**) e soro fetal bovino (**B**); aumento 400X

Depois de 21 dias de cultura das CMLAs com meio indutor de condrogênese, foi analisado o tamanho do botão celular, não se observando diferença significativa entre aqueles mantidos com SH e com SFB. À microscopia ótica, coradas pela hematoxilina e eosina, foram observadas lacunas celulares compostas de glicoaminoglicanas e glicoproteínas, compatíveis com extracelulares de cartilagem e células semelhantes a condrócitos, em todas as amostras dos dois grupos (B e H) e em nenhum dos controles, sem diferença significativa entre ambos (Figura 12).

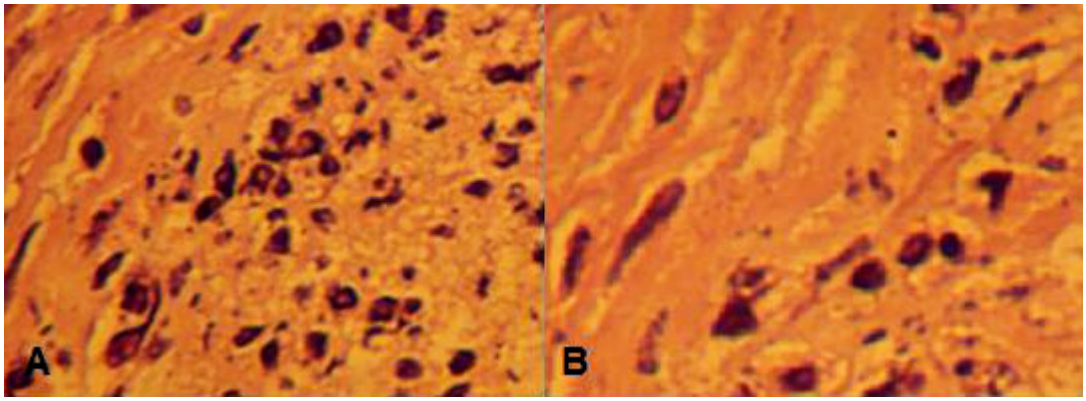


Figura 12 - Microscopia ótica, demonstrando condrócitos e lacunas condrocitárias, corados por hematoxilina, derivados das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com meio suplementado com soro humano (**A**) e soro fetal bovino (**B**); aumento 400X

4.1.6 Análise da expressão gênica

Quando se avaliou a expressão gênica dos transcritos NANOG, OCT-4 e SOX2, associados com a pluripotência e indiferenciação celular, observou-se que a maioria das amostras do grupo B e H demonstraram expressão dos mesmos. O grupo B apresentou expressão do NANOG em três quintos e o grupo H expressou em cinco quintos. Observou-se expressão do OCT-4 em quatro quintos em ambos os grupos e o SOX2 foi expresso no grupo B em quatro quintos, no grupo H em cinco quintos (ANEXO D). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 13 apresenta o resultado do ensaio de expressão gênica.

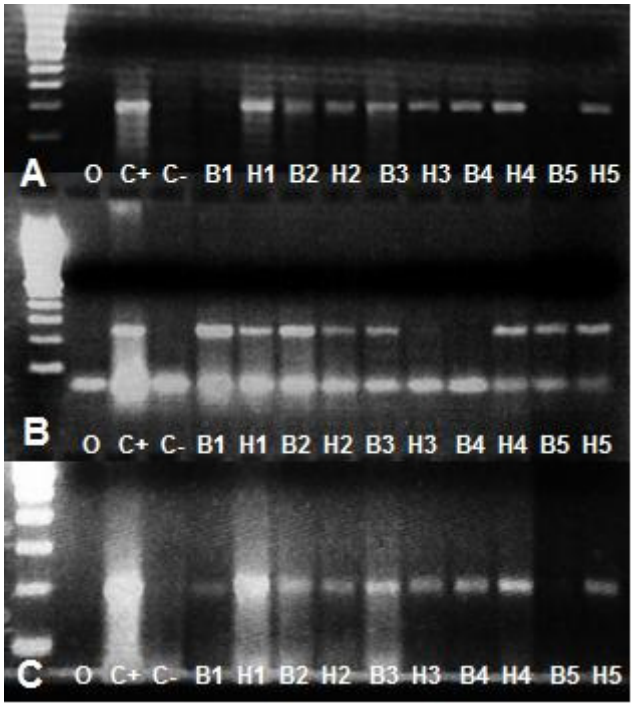
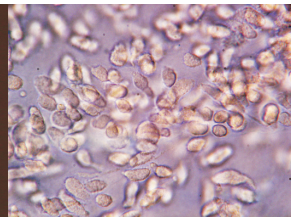


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose 2% demonstrando bandas de expressão dos genes NANOG* (**A**), OCT-4** (**B**) e SOX2*** (**C**) nas células mesenquimais do líquido amniótico, das cinco amostras do grupo B (B1,B2,B3,B4,B5), das cinco amostras do grupo H (H1,H2,H3,H4,H5), do controle negativo de contaminação das soluções (O), controle positivo de expressão, N-TERA-2 (C+), controle negativo de expressão, MRC-5 (C-)

* - NANOG – do inglês, *nanog homeobox*; ** - OCT-4 - do inglês, *octamer 4*; *** - SOX2 - do inglês, *sex determining region Y-2*

DISCUSSÃO



5.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A relevância do estudo de células do líquido amniótico vincula-se à própria evolução da Medicina Fetal. É muito maior a contribuição desse Setor da Obstetrícia na prevenção e no diagnóstico de alterações do desenvolvimento fetal do que em seu tratamento. Métodos inovadores para o tratamento de doenças diagnosticadas no ambiente intrauterino são perseguidos, e um deles, sem dúvida, é a terapia celular. Quanto aos tipos celulares úteis nessa proposta de tratamento, as células do líquido amniótico são, indubitavelmente, alternativa principal na atualidade.

Pesquisas em terapia celular para o feto são escassas no mundo todo, e em nosso País não é diferente. Na constatação dessa carência de métodos terapêuticos para o feto, de base celular, surgiu o estímulo para estudo de tal natureza.

Por contar com condições técnicas amplamente favoráveis no HCFMUSP, constituídas pela disponibilidade de material (líquido amniótico), obtido das amniocenteses para investigação de cariótipo fetal, já que a Clínica Obstétrica é centro de referência nacional em Medicina Fetal; pela disponibilidade de laboratório experiente em cultura celular, o Laboratório de Genética e Hematologia Molecular - LIM31; e pela devida habilitação do pesquisador executante, restava estabelecer metodologia adequada aos propósitos do presente estudo.

Inicialmente, procurou-se a padronização das tarefas no laboratório, em vista do ineditismo do uso dessas células no Serviço, investigando-se ambiente e composição do meio de cultura ideal para o tipo celular em questão, tripsinização adequada, tempo de troca de meio de cultura favorável, além de outras padronizações de métodos, necessárias para a fiel reprodução da pesquisa e análise subsequente dos resultados; o que justifica o intervalo entre a aprovação da pesquisa, pela comissão pertinente e sua finalização.

Todos os ensaios foram realizados pelo pesquisador, com a supervisão dos especialistas de cada laboratório onde ele foram realizados, em paralelo e simultaneamente, evitando-se possíveis interferências no ambiente de execução, tais como: alteração de temperatura, contaminações, mudanças no lote de fabricação dos produtos e vícios de procedimentos. A análise dos resultados é perdida quando realizada por pessoas diferentes.

5.2 AMOSTRAGEM, DESENHO DO ESTUDO E MÉTODOS UTILIZADOS

O cálculo amostral deste estudo determinou o uso do material de duas gestantes, para a análise do resultado, mas, utilizando-se apenas duas amostras, falha de cultura em alguma, hipótese provável, inviabilizaria a análise estatística da pesquisa. Por esse motivo, associado ao fato da dificuldade de repetição dos ensaios de criação de curvas de crescimento celular, optou-se pela realização dos mesmos, com amostras de cinco

gestantes, permitindo a análise estatística dos resultados, mesmo com falha de crescimento celular em algumas amostras.

O líquido amniótico deveria ser proveniente de gestações entre 16 e 22 semanas, pelo fato de ser este o intervalo preconizado para a amniocentese clássica, evitando-se o aumento do risco materno-fetal de nova punção. Quando o procedimento for realizado antes dessa idade, poderá levar a maior risco, embora, teoricamente, possa oferecer outra população celular, possivelmente mais primitiva. A escolha das amostras de líquido amniótico, obtidas por ocasião do parto, certamente diminuiria o risco de punção pré-natal, com a obtenção de células com imunofenótipo, potencial de expansão e diferenciação semelhante[227]. Porém, como a proposta inicial desta pesquisa era o estudo das CMLAs para manipulação no período pré-natal, a obtenção das amostras do líquido amniótico por ocasião do parto, embora factível, e com menor risco, seria tardia. Para outras aplicações, no neonato, infante ou mesmo adulto, torna-se interessante, todavia. A análise dessas células, obtidas por ocasião do parto, encontra-se atualmente em realização no Serviço, em associação com o Laboratório de Investigação Médica 31.

Não se realizou anestesia local para a amniocentese, pois, de acordo com estudo anterior, 96% das pacientes submetidas a esse procedimento não referem dor ou citam dor mínima durante e após o mesmo[308]. No caso de placenta anterior, era prevista a punção transplacentária, visto que não aumenta os riscos do procedimento[309]. Em trabalho paralelo, com dados não publicados, observou-se que as amostras obtidas de amniocentese

contaminadas com sangue, resultantes de acidente na punção, resultam em índice maior de falha de cultura. Portanto, resolveu-se incluir nos fatores de exclusão aquelas amostras que, por visualização direta, apresentavam aspectos sugestivos de contaminação com sangue. Entretanto, todas as gestantes, aptas a ser incluídas no trabalho, até o número amostral determinado, apresentavam gestação de 21 semanas e placenta posterior e sem contaminação por sangue, o que diminuiu ainda mais a variabilidade das amostras.

As amostras de líquido amniótico não poderiam ser provenientes de gestantes com intercorrências clínicas ou obstétricas, e os fetos não poderiam ser portadores de alteração estrutural ou de cariótipo, para prevenir a interferência de fatores externos ao crescimento ou mesmo à modificação dos tipos celulares previamente encontrados, e colocados em cultura.

No entanto, observou-se que nenhuma amostra precisou ser descartada no presente estudo, pelo fato do estudo cromossômico, obtido no retorno ao Ambulatório de Obstetrícia, e o laudo pediátrico, obtido ao nascimento, não terem demonstrado alteração de cariótipo ou de alteração estrutural aparente.

Quanto ao meio utilizado neste estudo, a escolha da modificação α do *Minimum Essential Medium Eagle* (α-MEM) decorreu do fato de que o mesmo proporcionou o melhor índice de proliferação das CMLAs, quando comparado com outros meios de cultura testados, não demonstrando

diferença significativa em relação à suplementação nesse meio, de fator de crescimento de fibroblasto, em estudo inicial (dados não publicados).

Quando se comparou a modificação α do MEM com o MEM original, observou-se que nessa modificação, em geral, são mantidas a concentração de sais inorgânicos, vitaminas e aminoácidos essenciais, retirando glicina e valina e acrescentando aminoácidos não essenciais. Quando se comparou a modificação α, utilizada neste estudo, com a modificação de Dulbecco, utilizada na maioria dos estudos internacionais com CMLAs[74;222;232], observou-se acréscimo de ferro e manutenção de outros sais inorgânicos, aumento em duas vezes da concentração de aminoácidos e aumento em quatro vezes da concentração de vitaminas (ANEXO E). Essas diferenças nos componentes podem explicar a crescimento desigual dessas células nesses meios de cultura (observado no estudo inicial), necessitando de estudo detalhado dos compontentes para se estabeler meio ideal para as CMLAs, não sendo objetivo do presente estudo.

Em comum, observa-se que fibroblastos crescem com facilidade nos meios de cultura acima, e as CMLAs, semelhantes morfologicamente aos primeiros, também, apresentam a mesma caracterísica, quando em cultura, nesses meios.

Também diferenciando este estudo dos demais, não se mostrou necessária a utilização do fator do crescimento de fibroblastos ou de qualquer outro fator de crescimento celular ou hormônios, além daqueles já disponíveis no soro, seja humano ou fetal bovino, não alterando seu potencial de expansão e diferenciação. Na literatura disponível estudada

sobre o assunto, utiliza-se o fator de crescimento de fibroblastos[222;232] ou quando não, adiciona-se à cultura primária o meio Chang[219;224], sabidamente suplementado com hormônios[314], para o crescimento das CMLAs.

No presente estudo, não se mostrou necessária a adição de gelatina, fibronectina ou colágeno, para facilitar a aderência celular ao frasco de cultura. Outros, entretanto, utilizam-se desse método. O grupo de Dario Fauza faz uso de colágeno[232;315], provavelmente por utilizar um meio diferente, relacionado à menor potencial de expansão das CMLAs.

Nesta pesquisa, o soro humano usado, obtido do estoque regular do Banco de Sangue e Hemo-derivados da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo, não apresentava nenhuma padronização em relação à concentração de proteínas e lípides. Como a maior influência no crescimento celular em cultura é exercida pelos componentes proteicos do soro, foi realizada padronização desses componentes do soro humano, baseada na concentração proteica do soro fetal bovino.

O método usado para a mensuração do conteúdo proteico (método de Lowry)[310] é bastante preciso e útil para a proposta. A maioria dos estudos encontrados na literatura, de análise do crescimento de células mesenquimais em meio suplementado por soro humano, é formada por *pool* de doadores (soro alogênico) e obtido comercialmente, sem referência de padronização do conteúdo proteico, quando comparado com soro fetal bovino. Em estudo do crescimento de células mesenquimais de medula óssea em meio suplementado por soro humano alogênico, demonstra-se sua inviabilidade, com morte celular[266]. O fato pode ser explicado pela

presença de fatores de incompatibilidade humoral interpessoal, de grande importância no estudo de transplantes de células e tecidos. Neste estudo, não se observou influência desse fator em relação às CMLAs, de maneira similar ao que percebem Kunisaki e colaboradores[232].

Teoricamente, diferenças individuais relacionadas à composição dos soros dos doadores humanos podem influenciar no crescimento celular em cultura, sobretudo em relação à presença de diferentes concentrações de hormônios e fatores de crescimento.

Em estudo paralelo, encaminhado para publicação, analisou-se a proliferação das CMLAs em meio suplementado com soro humano de cinco diferentes doadores, mas não se observou alteração significativa na expansão celular, imunofenotipagem, diferenciação e expressão gênica. A concentração de fatores de crescimento e hormônios nos soros de doadores utilizados não parece apresentar variação suficiente para influenciar tal crescimento. O único estudo encontrado na literatura, com uso de soro humano no meio de cultura para CMLAs, utiliza soro comercial de *pool* de doadores de um único lote, mas não compara diferenças individuais de doadores ou de distintos lotes dos soros, disponíveis comercialmente[232].

Yokoyama e colaboradores estudam o crescimento das CMEMs de medula óssea, em meio com suplementação de soro fetal bovino de diferentes lotes, isto é, com *pool* de doadores diferentes, mas não observam diferença nesse crescimento[265]. Neste estudo, utilizou-se o mesmo lote de soro fetal bovino, para não acrescentar viés à análise do resultado.

Ao se comparar o crescimento das CMEMs de medula óssea, em meio suplementado por soro fetal bovino ou humano, relata-se semelhança nesse aspecto, quando se emprega dosagem de 10% para o soro[281]. Outro relato, também, fazendo essa comparação demonstra menor potencial de crescimento das CMEMs com soro humano[84]. Acredita-se que a falta de padronização dos métodos, dos meios de cultura, dos lotes utilizados, sua procedência e mesmo o uso de diferentes frascos de cultura celular dificultam a comparação e a reprodutibilidade dos experimentos, fato que se refere não só às CMEMs, mas às células-tronco, em geral.

Na literatura pesquisada, o único estudo semelhante ao nosso que, compara as propriedades das CMLAs em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou por soro humano, utiliza meio de cultura diferente do que o empregado neste estudo e associado a fator de crescimento de fibroblastos[232]. Não apresenta diferença significativa no crescimento das CMLAs, quando se varia a suplementação do soro no meio de cultura. Neste estudo, também, não se encontrou diferença significativa em relação à suplementação do soro, ressalvando-se as diferenças entre este estudo e o acima descrito, quanto ao meio utilizado e suplementação de fator de crescimento.

Relata-se, ainda, distinção no potencial de diferenciação das CMLAs, por influência da suplementação, no meio de cultura, por soro humano ou soro bovino, que será discutido adiante.

A contagem celular foi realizada manualmente em hemocitômetro, o que permitiu uma análise mais detalhada, porém, menos reprodutível.

A passagem celular foi feita quando se obtinha confluência celular de 70% nos frascos de cultura, pois foi com esse padrão de proliferação celular que, nos experimentos iniciais, foram obtidas a manutenção do padrão morfológico e a expansão das células mesenquimais de líquido amniótico.

Os ensaios de crescimento celular em cultura foram realizados em triplicata, para se evitar erro de dosagem de inóculo primário (número inicial de células). Foram analisados por 14 dias, pois em padronização inicial mostrou-se que nesse tempo as células já tinham atingido a fase de *plateau* de crescimento celular.

5.3 ENSAIOS COM AS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

5.3.1 Expansão das células mesenquimais do líquido amniótico em cultura

As CMLAs apresentam-se como opção preferencial como fonte celular mesenquimal para aplicações em terapia fetal. Primeiro, pela facilidade e oportunidade de sua obtenção. Segundo, pelo maior potencial de expansão exibido pelas mesmas, em comparação com outras fontes de células mesenquimais, tanto fetais[222;223;228] como as CMEMs de medula óssea de adulto[229]. Esse maior potencial de expansão pode ser explicado pelo encontro de proteínas específicas relacionadas à manutenção e crescimento celular, vias energéticas, metabolismo proteico, apoptose, sinais de transdução, transcrição e transporte de transcritos exclusivos,

encontrados na análise proteômica de amostras de CMLAs e não naquelas de CMEMs de medula óssea [229].

Fator importante relacionado à cultura das CMLAs, com o propósito de aplicação clínica em humanos, é a padronização rigorosa das condições do ambiente, desde concentração de oxigênio até fatores nutricionais do meio, visto que o tipo celular cultivado pode variar, dependendo desses fatores. Em condições de hipóxia, observa-se alteração das características de expansão de células do líquido amniótico[316], como do padrão de expressão gênica de outras células mesenquimais, diferentes daqueles observados em condições normais de oferta de oxigênio[317]. Células do líquido amniótico em cultura, quando submetidas a meio com baixa concentração de nutrientes apresentam padrão de crescimento incomum, com formação de agregados, em multicamada, com perda de inibição de contato, senescência, além de tornarem-se poliploides[226]. Nessas condições, ficam submetidas, frequentemente, a baixo pH e em ambiente com acúmulo de metabólitos, condição com frequência associada à transformação celular em cultura, potencial causa da formação de tumores *in vivo*[226].

Não se confirmou a hipótese estatística inicial de que haveria diferença entre o crescimento das CMLAs em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano, prevalecendo a hipótese nula, isto é, não houve diferença estatística entre o crescimento dessas células, variando o tipo de soro (soro fetal bovino ou humano) como suplementação ao meio de cultura (p=0,715) (Tabela 2 e Gráfico 1). Em relação à variação do número inicial de células em cultura, também não houve diferença na curva de

crescimento celular, achado diferente de estudo anterior, onde, em meio diferente do utilizado neste estudo, observou-se um potencial maior de expansão, quando se empregou inóculo celular inicial menor[209].

Ao se analisar visualmente os gráficos das curvas de crescimento celular, observa-se que, quando o inóculo celular inicial foi de 1.000 ou 15.000, houve variação maior que nas outras densidades de inóculo (5.000 e 10.000), quando se analisam os dias 2 e 4. Além disso, há maior variação de crescimento celular nos dias 2 e 4 em relação aos dias subsequentes de todas as curvas. Mas, essa variação é só visual e não é estatisticamente significante.

A comparação do crescimento das CMLAs do presente estudo com outros estudos é difícil pela diferença de método adotado. Kaviani e colaboradores[222] avaliam a crescimento celular das CMLAs, em meio suplementado por soro fetal bovino pelo método de fluorescência, obtém alíquotas do frasco de cultura em espaço de 2 horas cada e, também, pela análise do DNA total da amostra, relacionando-se com a contagem celular. Entretanto, não se considera a possibilidade de poliploidia. Kunisaki e colaboradores avaliam o potencial de expansão celular, sem se preocupar em construir curva de crescimento celular[232].

Na construção da curva existem limites à expansão celular pela limitação de meio nutricional e de espaço. Portanto a análise comparativa é relativa nesse caso. No entanto, observa-se no presente estudo, uma taxa de expansão logarítmica máxima de seis vezes, atingida ao redor do 8º dia de cultura celular, independente da densidade de inóculo inicial. No estudo

de Kunisaki e colaboradores[232], observa-se no oitavo dia, taxa de expansão logarítmica de duas vezes. A diferença pode ser explicada pelo uso de métodos diferentes para isolamento e expansão celular. Como já relatado anteriormente, em estudos iniciais não publicados, observou-se que o meio que proporcionou a melhor taxa de expansão para as CMLAs foi o α-MEM e que, de todos os meios pesquisados, o D-MEM (utilizado no estudo em comparação) era o que mostrava a pior taxa de expansão. Outra dificuldade, em relação à comparação, diz respeito à possibilidade de se estar analisando células que apresentam semelhantes antígenos de superfície (perfil mesenquimal), porém, de diferentes populações celulares do líquido amniótico.

A viabilidade celular das CMLAs em meio de cultura, nas duas suplementações (soro fetal bovino e soro humano), resultou excelente, com mediana ao redor de 94% de viabilidade celular, sem diferença significativa, nos dois grupos (Tabela 3). Steigman e colaboradores relatam viabilidade das CMLAs, em soro bovino, ao redor de 88%, com mesmo método de avaliação[315].

5.3.2 Morfologia das células mesenquimais do líquido amniótico

Pela microscopia ótica, a avaliação morfológica das CMLAs, apresentou-se sem diferença significativa, entre os grupos (soro fetal bovino e humano) (Figuras 5 e 6), em concordância com o observado por Kunisaki e colaboradores[232], mas, quando foi realizada pela microscopia eletrônica,

com observação mais detalhada das organelas citoplasmáticas, ficou aparente a presença de um número maior de vacúolos lipídicos naquele grupo em que o meio de cultura foi suplementado por soro humano (Figura 7). Provavelmente, o fato ocorreu, pela falta de padronização do conteúdo lipídico das amostras de soro humano, em relação ao soro fetal bovino, favorecendo uma maior oferta de lípides e por consequência, um maior acúmulo nos vacúolos das células, em meio com soro humano. Isto não foi suficiente para causar alteração nos padrões de crescimento, diferenciação e expressão gênica dessas células.

5.3.3 Imunofenotipagem

Neste estudo, observa-se que o imunofenótipo das CMLAs, em meio de cultura, suplementado por soro fetal bovino ou humano, é semelhante (Figuras 8 e 9 e Tabela 4). Apresenta os mesmos marcadores antigênicos de superfície de membrana celular, compatíveis com células mesenquimais, sem alta expressão dos marcadores hematopoiéticos ou endoteliais, à semelhança do que observaram Kunisaki e colaboradores[232]. Diferente desse, entretanto, percebeu-se neste estudo uma pequena expressão de marcadores hematopoiéticos, como o CD34 e CD177 (Tabela 4). O fato pode estar relacionado ao uso de diferentes meios de cultura para os dois estudos. Neste trabalho, não se observou positividade para o CD133, relacionada às células-tronco neurais e progenitores endoteliais à semelhança do que relataram De Coppi e colaboradores[219], e em oposição

ao que descrevem Prusa e colaboradores[211]. Esse achado pode ser determinado pela presença provável de diferentes populações celulares originalmente no líquido amniótico, além da escolha de distintos meios de cultura celular.

O estudo das CMLAs ainda precisa de maior aprofundamento, objetivando determinar se, embora com mesmos marcadores de superfície, relacionados à linhagem mesenquimal, as células descritas nos diversos estudos encontrados na literatura pertencem à mesma população, ou a diferentes populações celulares do líquido amniótico.

5.3.4 Diferenciação

5.3.4.1 Diferenciação Osteogênica

Neste estudo, a diferenciação osteogênica foi conseguida, utilizando-se meio indutor com fosfato-2-ascorbato (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e β-glicerofosfato (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), conforme descrito por outros autores [84;228]. A comprovação dessa diferenciação ocorreu pela demonstração da produção de cálcio pelas células coradas pela Alizarina (Figura 10). A confirmação dessa diferenciação, pela expressão gênica de transcritos relacionados, encontra-se em execução no Laboratório de Investigação Médica 37 (dados não publicados). Além da marcação pela Alizarina, comprovou-se a diferenciação osteogênica pela presença da fosfatase alcalina (Figura 11), proteína que expressa a atividade de mineralização da matriz óssea[318].

Quando se comparou o potencial de diferenciação osteogênica das CMLAs em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e humano, não se observou diferença significativa, diferentemente do observado com CMEMs de medula óssea, em que se relatou maior potencial quando cultivadas em meio suplementado com soro humano[84;282].

Perda óssea pode ocorrer por problemas congênitos ou adquiridos, como cirurgia, trauma ou tumores. Sua correção pode necessitar de transplante ósseo ou de substituto, re-estabelecendo a integridade estrutural e funcional do esqueleto. Nem sempre se consegue osso autólogo para a correção, sobretudo em pacientes pediátricos, oncológicos ou osteoporóticos. As CMLAs, conforme demonstrado neste estudo, apresentam potencial de diferenciação osteogênica, o que as habilita para o reparo ósseo, a exemplo do que fez Horwitz, inoculando CMEMs de medula óssea, sistemicamente, em crianças portadoras de osteogênese imperfeita[319;320].

Imagina-se também, com o diagnóstico precoce dessa doença, o tratamento intrauterino, com CMLAs modificadas geneticamente, ou mesmo de doador, visto que essas células apresentam vantagem em relação às CMEMs, por causarem menor reação imune. Le Blanc e colaboradores[107] utilizaram, para tal propósito, CMEMs de medula óssea. Outro uso seria em engenharia tecidual, com biopróteses povoadas por células ósseas diferenciadas das CMLAs ou não diferenciadas, em biopróteses osteoindutoras na reconstrução de pequenos e grandes segmentos ósseos.

5.3.4.2 Diferenciação Condrogênica

Neste estudo, a diferenciação condrogênica foi conseguida empregando-se meio indutor com TGF-β1 (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e dexametasona (Sigma Chemical St. Louis, MO, USA), conforme descrito por outros autores [228;246], considerando-se seu aspecto histológico (Figura 12).

Quando se comparou o potencial de diferenciação condrogênica das CMLAs, quando em meio de cultura suplementado por soro fetal bovino ou humano, não se encontrou diferença significativa, em oposição ao encontrado com células mesenquimais obtidas da sinóvia, na qual se encontra maior potencial condrogênico quando em cultivo suplementado com soro humano[281].

Yokoyama e colaboradores observaram, estudando a diferenciação condrogênica das CMEMs de medula óssea, que a concentração maior de soro fetal bovino aumentava o potencial de diferenciação condrogênica dessas células[265]. Nesta pesquisa, não foram estudadas diferentes concentrações de soro, sendo que a comparação se realizou somente com mesma concentração de soro fetal bovino e humano.

Estudos de diferenciação condrogênica de CMEMs com as distintas isoformas de TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3) resultam em melhor potencial condrogênico com TGF-β2 e TGF-β3, isolados ou em conjunto, quando se utiliza o TGF-β1[88;321;322]. Quando se estuda a diferenciação condrogênica de CMLAs, observa-se maior produção de glicosaminoglicanas e colágeno tipo II com o TGF-β1 do que com o TGF-

β3[246]. Quando se compara a matrix extracelular produzida pela diferenciação das CMEMs e CMLAs, observa-se que a última produz menor quantidade da mesma[246]. Pode-se especular que diferentes meios indutores produzem distintas cartilagens para diversas aplicações.

Normalmente, lesões de cartilagem articular são irreversíveis, pela natureza avascular e menor relação célula/matriz do tecido cartilaginoso, associado com a pequena atividade metabólica dos condrócitos maduros[323;324]. As lesões da cartilagem, que não atingem o osso subcondral, estimulam pouco as células mesenquimais da medula óssea a se deslocarem para o local da lesão, dificultando seu reparo. Aquelas que atingem o osso subcondral, mesmo com migração das células mesenquimais da medula óssea para a lesão, geralmente, produzem fibrocartilagem para reparo[325;326]. O uso de condrócitos maduros torna-se inviável, pois apresentam baixa taxa de proliferação *in vivo;* quando expandidos *in vitro* mostram perda de sua função[327]. Uma solução teórica seria o uso de células mesenquimais para o reparo da cartilagem[328]. Dentre elas, considera-se que as CMLAs, pelo seu grande potencial de diferenciação condrogênica, baixa imunigenicidade e facilidade de obtenção devem ser opção interessante.

O uso da CMLAs para a construção de tecido cartilaginoso é apenas o primeiro passo para sua aplicação clínica, pois precisa de uma melhor avaliação, como qual tipo de cartilagem será formada, em vista de sua composição de colágeno, glicosaminoglicanas, elastina e matriz extracelular[228], ou mesmo, da composição do neo-osso e sua interação com

o osso remanescente[329]. Ambos devem ser avaliados quanto a elasticidade e resistência, em vista da aplicação que se deseja. O segundo passo é verificar-se qual bioprótese deve ser empregada, observando-se o tempo de degradação e a capacidade de adaptação celular a ela. Só vencidas estas etapas, estudos clínicos poderão ser realizados.

5.3.5 Expressão gênica

A análise da expressão gênica de uma célula ajuda a entender os mecanismos em que ela está envolvida naquele momento, e sua potencialidade. Células mesenquimais de diferentes origens apresentam expressão gênica distinta, e as CMLAs, *in vivo*, parecem apresentar interação com o útero, através de hiperexpressão de receptores de ocitocina e trombina[330]. A análise da expressão dessas células, quando isoladas e expandidas *in vitro*, pode sugerir sua origem e potencialidade, por análise comparativa.

Neste estudo, a análise de expressão gênica das CMLAs em cultura, suplementadas por soro humano ou soro fetal bovino, foi efetuada com os padrões já estabelecidos e oferecidos comercialmente (N TERA-2 cl.D1, MRC-5) (ANEXO B), à semelhança do que fizeram Tsai e colaboradores[224] ao avaliarem a expressão gênica do OCT-4 por essas células, em meio de cultura suplementado com soro bovino, diferente do usado neste estudo. Ampliando o que fez o grupo acima mencionado, que confirmou o estudo de Prusa e colaboradores[206], analisou-se a expressão dos três genes quando

expressos em conjunto, são considerados essenciais à pluripotência e manutenção do estado indiferenciado das células (OCT-4, SOX2 e NANOG)[285].

Sabe-se que, nas células-tronco embrionárias, a ação do OCT-4 é dose dependente que em maior ou menor concentração induz diferenciação[288]. Esta concentração ótima é regulada pela ação de genes reguladores[296], entre eles, o NANOG[286;289] e o SOX2[299;300]. Boyer e colaboradores propõem que, em células-tronco embrionárias, o OCT-4, SOX2 e NANOG colaboram na formação de um circuito regulatório, contribuindo para a pluripotência e autorrenovação das células-tronco embrionárias[285]. Neste estudo, demonstrou-se a presença desses transcritos (Figura 13 e ANEXO D), porém a transposição dessa afirmação para as CMLAs carece de comprovação.

Pode-se ainda, experimentalmente, demonstrar-se a efetiva pluripotência de uma célula, verificando sua colaboração no desenvolvimento embrionário e formação de quimeras, após sua injeção em blastocistos[291]. É possível também se comprovar a pluripotência de células humanas à semelhança do que ocorre com células-tronco embrionárias humanas, pela formação de teratomas após transplante em camundongos SCID (do inglês, *severe combined immunodeficiency*)[291].

Outros testes menos específicos podem comprovar a pluripotência, como a formação de corpos embriônicos *in vitro* ou a presença de marcadores moleculares, representando os três folhetos germinativos, ou ainda por meio de protocolos que comprovem sua diferenciação em

linhagens celulares específicas[291]. Quanto às CMLAs, alguns relatos comprovam sua diferenciação[219], enquanto outro descreve a formação de corpos embriônicos[331], porém testes mais específicos são necessários para comprovar sua pluripotência. Podem ser necessárias condições especiais de cultura, tais como, cocultura com outras células e adição de determinadas citocinas, para que ocorra diferenciação espontânea das CMLAs, a exemplo do que se verifica com as células-tronco embrionárias[24]. Neste estudo, a comprovação da expressão dos genes OCT-4, SOX2 e NANOG é um dado a mais, que estimula a realização pronta dos testes de pluripotência.

5.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A utilização de tecidos e células embrionárias e fetais é objeto de intenso debate ético. A fonte de células-tronco embrionárias humanas é a massa celular interna do blastocisto, que inviabiliza o desenvolvimento embrionário subsequente a essa retirada, portanto, constituindo-se em interrupção ao possível desenvolvimento de novo ser. Se o embrião, nessa fase, ainda não implantado no útero, for considerado como novo ser humano, será motivo de controvérsia, pois envolve discussão sobre quando se inicia a vida. Por outro lado, o transplante de tecido fetal originado de aborto legal pode apresentar questionamentos, pois tanto pode ser considerado aproveitamento nobre de material descartado, como não justificado, por se tratar de potencial ser humano. O uso de tecidos

originados de aborto espontâneo tende a gerar menos discussões de cunho moral, porém, geralmente é inapropriado para uso experimental e clínico, pois, com frequência, ocorrem anomalia cromossômica, infecção e anóxia tecidual[332].

A obtenção de células do sangue fetal, factível teoricamente, implica procedimento de risco, a cordocentese, resultando em pequeno número de células mesenquimais. Sua coleta por ocasião do parto, embora, sem riscos, pode ser considerada tardia por não permitir o tratamento pré-natal. Por outro lado, o uso de células fetais presentes no líquido amniótico, gera menos questionamentos éticos. Elas podem ser obtidas por meio de procedimentos diagnósticos pré-natais de rotina, amparados por extensa bibliografia e aceitos pela população. Seu uso justifica-se, pelo fato de não aumentar o risco materno-fetal. Estas células em uso autólogo não apresentam nenhum entrave ético, conquanto seja alternativa válida para tratamento perinatal de doença fetal. Entretanto, o uso heterólogo, merece considerações éticas análogas àquelas do transplante de tecido fetal.

A vantagem principal é que se eliminarão as discussões paralisantes sobre a destruição de embriões para isolamento de células-tronco embrionárias, assim, se as células isoladas do líquido amniótico, obtidas por procedimento diagnóstico pré-natal de rotina, apresentarem características de células-tronco embrionárias, além de diferentemente dessas, não levarem à formação de tumores quando transplantadas, como demonstrado por De Coppi e colaboradores[219].

Em nosso meio, não existe atualmente, detalhamento regulatório de seu uso, em especifico, em terapia fetal. Em outros países, sociedades e autoridades nacionais procuram abordar o tema com recomendações éticas[333;334].

5.5 APLICAÇÕES

Dentre as células mesenquimais fetais, as CMLAs apresentam-se como ideais ao uso em terapia celular autóloga, pela sua facilidade de obtenção, sem aumentar o risco inerente ao procedimento de amniocentese para diagnóstico genético pré-natal, podendo ser obtidas em tempo hábil para manipulação durante a gestação. Mostram-se com característica de rápida proliferação, manutenção de indiferenciação em cultura, grande potencial de diferenciação, além de apresentarem marcadores de pluripotência, podendo ser utilizadas em uma séria enorme de aplicações, como terapia celular simples, gênica e engenharia de tecidos. Apresentam também vantagem, em relação às outras células mesenquimais, para aplicação em terapia celular alogênica. Possuem menor imunogenicidade, pelo fato de não expressar em os antígenos de superfície HLA Classe II[201;335].

Podem ser usadas como adjuvante à infusão de outras células, com fins terapêuticos. Sabe-se que a coinfusão de células mesenquimais do doador pode causar menor incidência de reação enxerto-receptor[336;337],

quando se propõe transplante no feto, seja ele de células (por exemplo, células-tronco hematopoiéticas) ou de neotecidos construídos durante a gestação, para aplicações de terapia intrauterina. O uso de células mesenquimais da medula óssea como coadjuvante em transplantes de células-tronco hematopoiéticas, após terapia mieloablativa, mostrou-se factível e seguro[338], podendo servir de exemplo teórico a essa proposição de uso. Observa-se aumento da hematopoiese pela produção de citocinas pelas células mesenquimais, além das propriedades imunomoduladoras dessas células, já anteriormente descritas[106;339;340].

Descreve-se o uso de células mesenquimais de medula óssea para o tratamento de infarto do miocárdio[341]e, em vista do maior potencial proliferativo e do perfil imunológico especial das CMLAs, pode-se antever seu uso em cardiologia, como demonstram os experimentos iniciais em animais, com inoculação local e em coenxerto[216;255]. O resultado desfavorável verificado em publicação anterior[256], com rejeição das CMLAs, quando inoculadas em miocárdio e formação de tumoração, com aspecto condrogênico, merece melhor avaliação. Neste aspecto, é importante que seja repetido o experimento, pelo mesmo centro e por outros, visto ser o único na literatura que demonstra tal resultado adverso.

O uso das CMLAs em engenharia tecidual, na confecção de válvulas cardíacas, pode trazer benefícios tanto a adultos, como já demonstrado em trabalho anterior[258], como a Medicina Fetal, quando se detecta, no pré-natal, malformação estrutural cardíaca, necessitando de reparo após o nascimento. Tanto quanto em Cardiologia, em Nefro/Urologia as CMLAs

apresentam aplicações muito interessantes, já que se demonstrou que podem dar origem a estruturas renais[261].

Da mesma maneira, em Neurologia, como demonstram Pan e colaboradores[249-251] e Rehni e colaboradores[252] podem ser úteis em regeneração tecidual. A regeneração pulmonar é outro aspecto muito relevante em Medicina Fetal e Obstetrícia (hipoplasia pulmonar, prematuridade), mas quais as CMLAs podem ser extremamente úteis e já demonstraram, em animal adulto, seu potencial de plasticidade, diferenciando-se de maneira adequada, em resposta à lesão, em diferentes compartimentos do pulmão[260].

Em doenças de origem genética, as células mesenquimais mostraram-se vantajosas, entre outras, em terapêutica de osteogênese imperfeita[108;320] e esclerose amiotrófica lateral[342]. Pode-se inferir que estudos com CMLAs também devem apresentar resultados satisfatórios.

Outro uso para as CMLAs é em terapia gênica. Em estudo anterior, em ratos, demonstrou-se que as CMEMs modificadas geneticamente para hiperexpressarem gens osteogênicos, como a BMP-2 (do inglês, *bone morphogenetic protein-2*), quando inoculadas, além de facilitarem sua diferenciação osteogênica, também, recrutaram células mesenquimais do receptor, causando formação óssea *in vivo*[343].

Em outro estudo, Liu e colaboradores[236] demonstram que CMLAs de camundongo podem ser transfectadas sem perder seu imunofenótipo e potencial de diferenciação. Os vetores gênicos mais utilizados são os adenovírus, os retrovírus e os lentivírus, porém podem desenvolvem

citotoxicidade, resposta imune, mutagênese insercional e pequena capacidade de conter sequências gênicas[344].

O emprego de baculovírus parece alternativa viável, ainda não se conhece efeito citopático a seu uso, além de permitir inserção de grandes seqüências. CMLAs humanas foram transfectadas por adenovírus, não se observando alteração de seu imunofenótipo, capacidade proliferativa, potencial de diferenciação, além de não terem expressado os antígenos de superfície HLA-DR, o que pode significar ausência de reações imunes ao vetor no transplante das CMLAs[262].

Em comparação com CMEMs de medula óssea, mostraram potencial de transfecção maior[262]. O uso dos vetores acima, baculovírus e adenovirus com vetores em CMLAs humanas, em meio suplementado por soro humano, merece ser testado e, posteriormente, avaliado em aplicações específicas.

Ao pensar em engenharia tecidual, com a utilização das CMLAs, em fase pré-clínica, o grupo liderado por Fauza, no *Children's Hospital* de Boston, ligado à *Harvard Medical School*, inicialmente isola e caracteriza essas células[222]. A seguir, seguindo recomendações do FDA, para aplicações em humanos, substitui a formulação do meio de cultura, comparando com o meio tradicionalmente utilizado em cultura celular[232].

Em uma terceira fase, visto que pode existir uma lacuna entre a coleta do líquido amniótico e a utilização dessas células, já expandidas, após o nascimento, em engenharia tecidual, criopreservam e após 3 a 5 meses, descongelam e constatam manutenção das propriedades de expansão e imunofenótipo das CMLAs, seguindo ainda, as normas da mesma agência

reguladora nos Estados Unidos da América, para uso dessas células em *humanos*[315].

Ao sinalizar o início das aplicações clínicas em humanos, além desse grupo pioneiro, outras iniciativas nesse mesmo sentido existem. O emprego de CMLAs para tratamento de insuficiência renal grave, por nefropatia de refluxo, em crianças, faz parte de um projeto de estudo multicêntrico, multinacional da União Europeia de terapia baseada em células-tronco (KIDSTEM)[345]. Outro projeto europeu tem como foco o tratamento de doenças congênitas, utilizando-se de engenharia tecidual e células-tronco, dentre elas, as CMLAs, congregando dez centros de pesquisa e cinco empresas privadas, de nove países da Europa (EUROSTEC -*Soft tissue engineering for congenital birth defects in children*)[335].

Em paralelo, quando se iniciar a fase clínica do transplante das CMLAs em humanos, o acompanhamento da migração dessas células, *in vivo*, poderá ser realizado através de ressonância nuclear magnética, se confirmados os resultados obtidos com esta técnica em camundongos[257].

Confirmada a eficácia do uso das CMLAs em terapia celular em humanos, após uso ainda inicial das mesmas, em modelos animais de várias doenças, abre-se o caminho para o futuro armazenamento dessas células para tratamento autólogo em fases mais tardias da vida ou ainda para tratamento alogênico pela procura de compatibilidade doador-receptor.

5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Demonstrou-se a viabilidade de se coletar, cultivar e expandir células mesenquimais fetais, tanto do líquido amniótico[346;347], do líquido pleural fetal[348], e de urina fetal[349], utilizando-se meio de cultura seletivo. Em outros centros de pesquisa do exterior, já foram analisados o potencial de crescimento, as características de imunofenótipo, a capacidade de diferenciação e a expressão do OCT-4 por essas células, que se mostraram concordantes com este estudo.

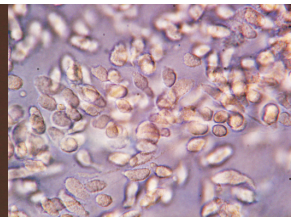
Em estudo realizado pela equipe liderada por Dario Fauza, na *Harvard Medical School*[232], em parte semelhante ao nosso, substitui-se, no meio de cultura, a suplementação com soro fetal bovino por soro humano. Esta substituição foi realizada com o objetivo de evitar as possíveis reações imunológicas, relacionadas à presença de proteínas bovinas, às contaminações bacterianas e à possibilidade de transmissão de príons ao receptor. Não se encontra alteração significativa no crescimento em cultura e no imunofenótipo. Ao ampliar o conhecimento atual sobre as CMLAs, este estudo, por primeiro na literatura nacional e internacional, analisa seu isolamento e expansão em meio de cultura sem o uso de outros fatores de crescimento, além do soro, e avalia o potencial de diferenciação e a expressão gênica das CMLAs em meio suplementado por soro humano.

A comprovação de que apresentam o mesmo potencial de crescimento, em meio de cultura suplementado, tanto com soro humano, como com soro fetal bovino, apresentando o mesmo imunofenótipo e com

características de diferenciação semelhantes, torna-as potenciais candidatas ao uso clínico em terapia celular, gênica, e na engenharia tecidual, confirmados esses estudos por outros centros.

Ainda, a demonstração de que as CMLAs apresentam expressão dos três genes OCT-4, SOX2 e NANOG, se confirmadas por novos estudos, não só reafirmarão trabalhos anteriores, que sugerem sua pluripotência[219], como permitirão imaginar novos projetos para se estabelecer os mecanismos da manutenção da indiferenciação e pluripotência, vislumbrando para o futuro, aplicações antes só imaginadas com o uso de células-tronco embrionárias.

CONCLUSÕES



O presente estudo, avaliando as células mesenquimais do líquido amniótico (CMLAs) em meio de cultura, comparando a suplementação com soro fetal bovino (SFB) e com soro humano (SH), permitiu concluir que:

1. não houve diferença significativa em seu isolamento e cultura;

2. as curvas de crescimento celular construídas não demonstraram diferença significativa no padrão de expansão celular, quando variou a suplementação do meio de cultura com soro humano ou fetal bovino;

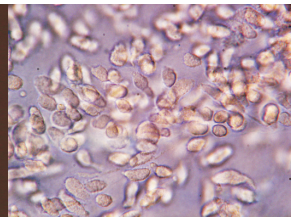
3. quanto à morfologia:
   a. não apresentou variação quando as células foram avaliadas ao microscópio ótico;
   b. variou com a presença de maior número de vacúolos lipídicos, nos casos de meio de cultura suplementados com soro humano, quando as células foram avaliadas ao microscópio eletrônico;

4. não foi encontrada diferença significativa no padrão de imunofenótipo, em relação aos marcadores de superfície pesquisados; e

5. ocorreu diferenciação osteogênica e condrogênica em ambos os grupos;

6. nas duas suplementações do meio de cultura, observaram-se expressão dos transcritos dos genes OCT-4, NANOG e SOX2.

ANEXOS



ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA
1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "Cultura com soro humano e expansão de amniócitos”

PESQUISADOR: Marco Antonio Borges Lopes

CARGO/FUNÇÃO: Professor doutor MS3 FMUSPp

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL N: CREMESP 71533

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Obstetrícia e Ginecologia, Disciplina de Obstetrícia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO**X** RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA :2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Pelo fato de você ter idade maior que 35 anos, você apresenta um aumento do risco de seu bebê nascer com algum defeito nas células do seu corpo, como síndrome de Down. Porisso, seu médico sugeriu a coleta de uma pequena porção do líquido que envolve o seu bebê, para analisar as células nele contidas. A coleta será realizada através da introdução de uma agulha no seu abdomen, sem atingir o seu bebê. Na maioria das vezes essa coleta não apresenta problemas, mas aproximadamente de cada duzentas coletas realizadas, uma pode apresentar complicações como sangramento vaginal, rompimento da bolsa d'água, infecção, enjôos, ou até mesmo acontecer aborto ou não se conseguir realizar a coleta. O líquido coletado será enviado ao laboratório para analisar seu conteúdo e confirmar se seu bebê tem problemas nos cromossomos ou não. Estamos convidando você para participar de uma pesquisa para observar se as células do líquido amniótico conseguem crescer fora do corpo humano e se multiplicar. A finalidade dessa multiplicação é conseguir células formadoras de tecidos humanos para ajudar bebês que nasceram com defeitos e necessitam de correção. Como de hábito, o material estudado será descartado após o estudo. Esse estudo não aumenta o risco inicial da coleta do líquido que envolve o seu bebê para estudar os cromossomos, pois só usará uma parte do líquido já colhido.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. O paciente terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, dirigindo-se a Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

Você poderá a qualquer momento, se informar a respeito do andamento da pesquisa, dirigindo-se ao nosso hospital.

2. O paciente ou seu representante legal terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Você poderá deixar de participar a qualquer momento do estudo, sem que isso prejudique o seu tratamento neste hospital.

3. Os pesquisadores responsáveis salvaguardam a confidencialidade, sigilo e privacidade dos dados.

Seus dados pessoais, relacionados ao estudo, serão resguardados pelos médicos pesquisadores.

4. Haverá a disponibilidade de assistência para o tratamento pré-natal e pós-natal no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do HCFMUSP e na dependência de disponibilidade tanto do sujeito quanto do serviço, o atendimento obstétrico.

Na dependência da disponibilidade, seu tratamento pré-natal, parto e pós-natal poderá ser realizado no Hospital das Clínicas da FMUSP.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Sérgio Duarte e Marco Antonio Borges Lopes: Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Endereço: Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 10º andar, São Paulo, SP, Fone: (11) 30696209.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de .

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B

CÉLULAS MRC-5

A linhagem celular MRC-5 foi derivada de tecido pulmonar normal de um feto humano de 14 semanas, de sexo masculino, por J.P. Jacobs em setembro de 1966.

Apresenta capacidade de duplicação em cultura de 42 a 46 vezes, antes de atingir senescência.

O meio de cultura dessa linhagem celular é o α-MEM suplementado por soro fetal bovino 10%.

CÉLULAS NTERA-2 cl.D1

A linhagem celular NTERA-2 cl.D1 é derivada de carcinoma embrionário pluripotente testicular, obtida de metástase pulmonar em humano masculino de 22 anos, estabelecida em 1980, por xenoenxerto da linhagem Tera-2 em camundongo. Apresenta potencial de diferenciação pluripotente.

O meio de cultura dessa linhagem celular é o D-MEM suplementado por soro fetal bovino 10%.

ANEXO C

Gráfico 2 – Perfil médio do crescimento em log_{10} e erros-padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 1 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia

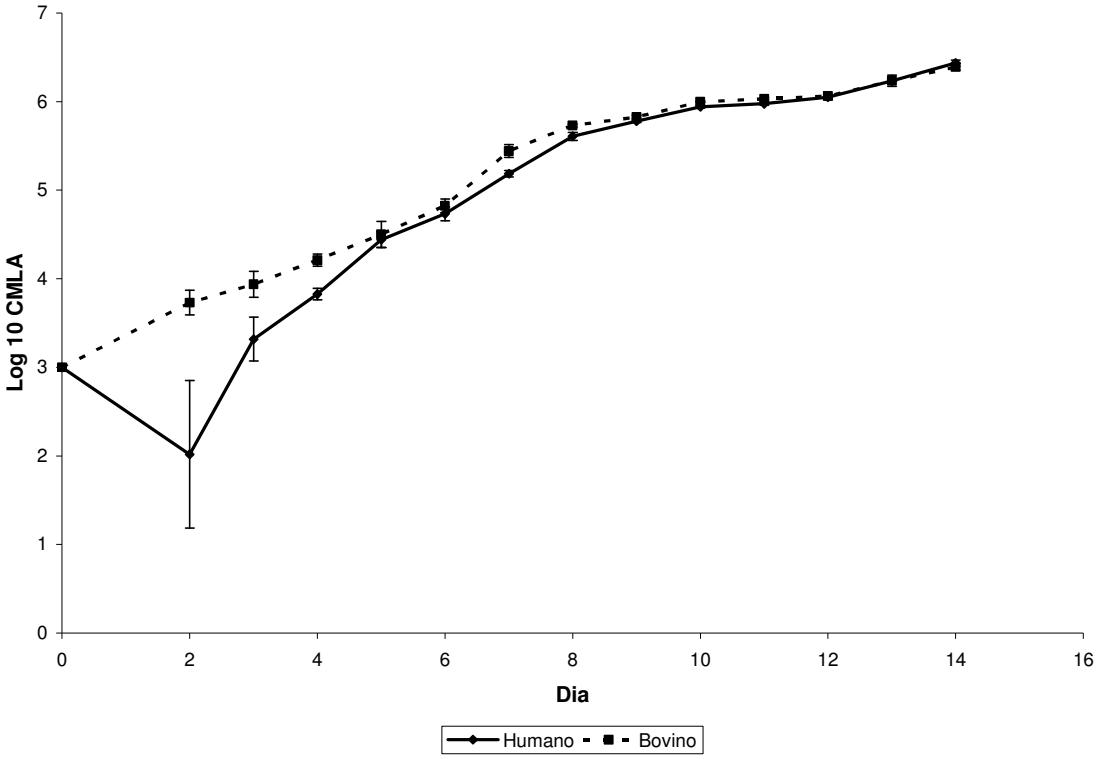


Gráfico 3 – Perfil médio do crescimento em log_{10} e erros-padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 5 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia

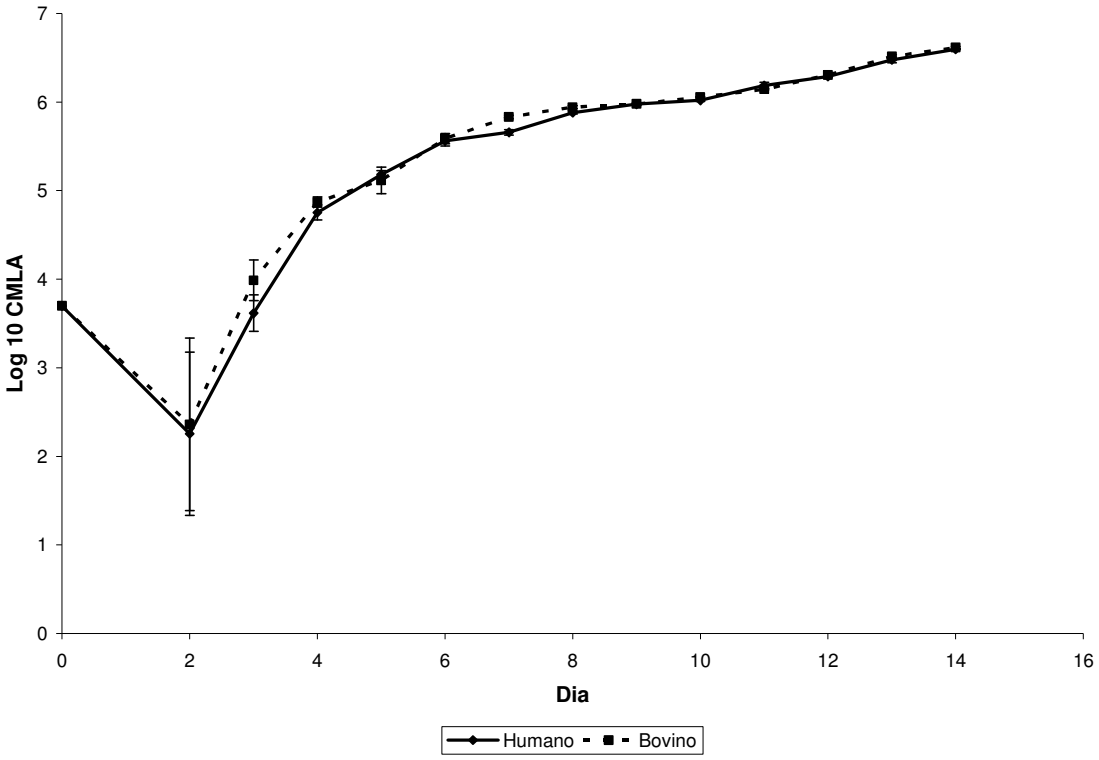


Gráfico 4 – Perfil médio do crescimento em log_{10} e erros-padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 10 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia

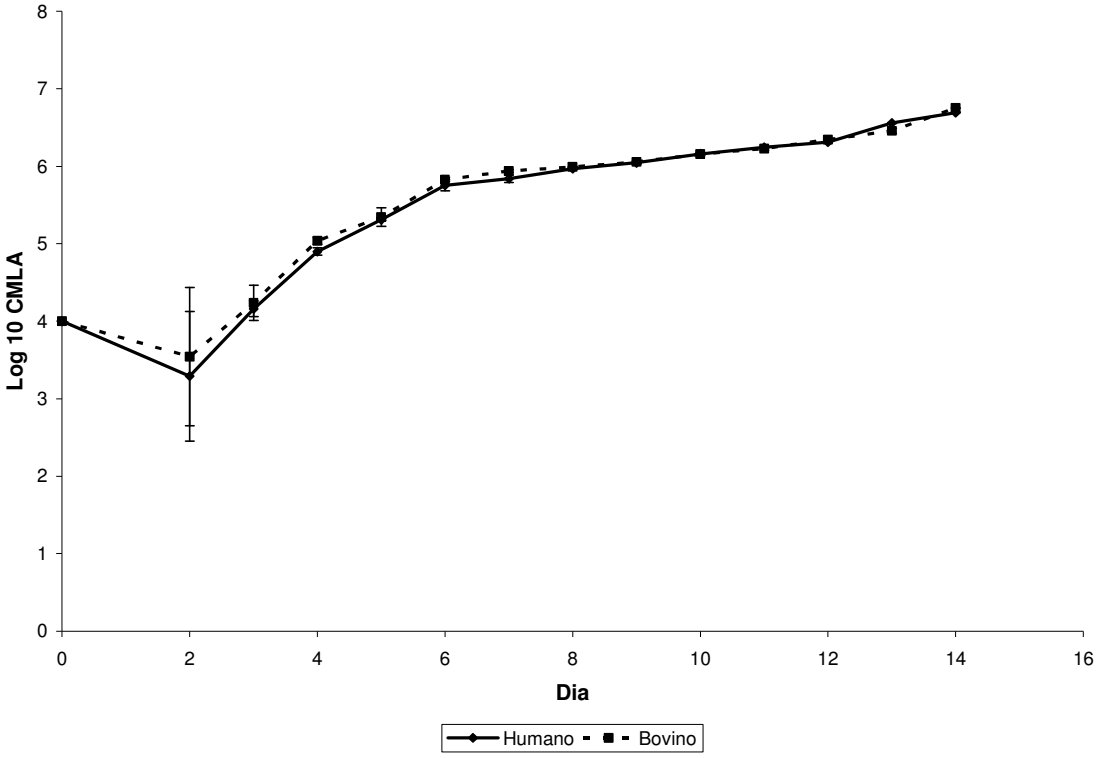
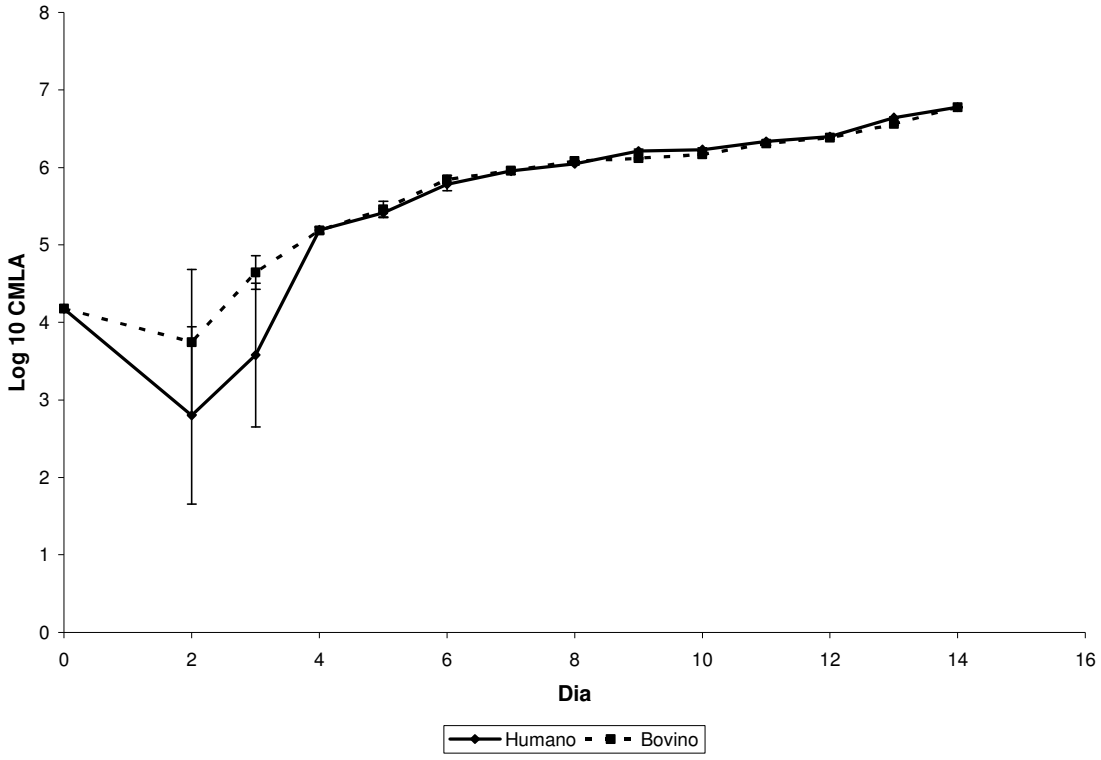


Gráfico 5 – Perfil médio do crescimento em log_{10} e erros-padrão das células mesenquimais do líquido amniótico, em cultura, com inóculo inicial de 15 000 células, quando suplementado com soro humano e com soro fetal bovino, até o 14º dia



ANEXO D

Tabela 5 – Tabela de comparação entre a expressão dos genes NANOG, OCT-4 e SOX2 nas cinco amostras de células mesenquimais do líquido amniótico do grupo B (complementado com soro bovino), além do controle negativo de RNA (branco), para análise da contaminação do preparado; N-TERA-2, como controle positivo; e as células MRC-5, como controle negativo da expressão gênica

	NANOG	**OCT-4**	**SOX-2**
BRANCO (H_2O)	-	-	-
N-TERA-2	+	+	+
MRC-5	-	-	-
H1	+	+	+
H2	+	+	+
H3	+	-	+
H4	+	+	+
H5	+	+	+
TOTAL	**5/5**	**4/5**	**5/5**

H1 – amostra 1 do grupo H, H2 – amostra 2 do grupo H, H3 – amostra 3 do grupo H, H4 – amostra 4 do grupo H, H5 – amostra 5 do grupo H

Tabela 6 – Tabela de comparação entre a expressão dos genes NANOG, OCT-4 e SOX2 nas cinco amostras do grupo H (complementado com soro humano), além do controle negativo de RNA (branco), para análise da contaminação do preparado; N-TERA-2, como controle positivo; e as células MRC-5, como controle negativo da expressão gênica

	NANOG	**OCT-4**	**SOX-2**
BRANCO (H_2O)	-	-	-
N-TERA-2	+	+	+
MRC-5	-	-	-
B1	-	+	+
B2	+	+	+
B3	+	+	+
B4	+	-	+
B5	-	+	-
TOTAL	**3/5**	**4/5**	**4/5**

B1 – amostra 1 do grupo B, B2 – amostra 2 do grupo B, B3 – amostra 3 do grupo B, B4 – amostra 4 do grupo B, B5 – amostra 5 do grupo B

ANEXO E

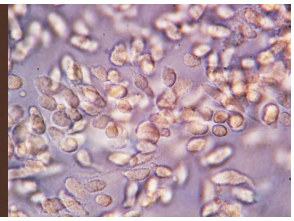
Tabela 7 – Tabela de comparação entre a concentração dos componentes dos meios de cultura celular *Minimum Essential Medium Eagle*, modificação α do *Minimum Essential Medium Eagle* e modificação Dullbecco do *Minimum Essential Medium Eagle*, utilizados em ensaios de isolamento e expansão das células mesenquimais do líquido amniótico

COMPONENTES	MEM (g/L)	α-MEM (g/L)	D-MEM (g/L)
Cloreto de cálcio (anidro)	0,20000	0,20000	0,20000
Nitrato férrico $9H_2O$	-	-	0,00010
Sulfato de magnésio (anidro)	0,09767	0,09767	0,09767
Cloreto de potássio	0,40000	0,40000	0,40000
Cloreto de sódio	6,80000	6,80000	6,40000
Fosfato de sódio monobásico (anidro)	0,12200	0,12200	0,10900
L-alanina	-	0,02500	-
L-arginina HCl	0,12600	0,12600	0,08400
L-asparagina H_2O	-	0,05000	-
L-ácido aspártico	-	0,03000	-
L-cisteína HCl H_2O	-	0,10000	-
L-cistina 2HCl	0,03130	0,03130	0,06260
L-ácido glutâmico	-	0,07500	-
L-glutamina	0,29200	0,29200	0,58400
Glicina	-	0,05000	0,03000
L-histidina HCl H_2O	0,04200	0,04200	0,04200
L-isoleuceina	0,05200	0,05200	0,10500
L-leucina	0,05200	0,05200	0,10500
L-lisina HCl	0,07250	0,07250	0,14600
L-metionina	0,01500	0,01500	0,03000
L-fenilalanina	0,03200	0,03200	0,06600
L-prolina	-	0,04000	-
L-serina	-	0,02500	0,04200
L-treonina	0,04800	0,04800	0,09500
L-triptofano	0,01000	0,01000	0,01600
L-tirosina 2Na $2H_2O$	0,05190	0,05190	0,10379
L-valina	0,04600	0,04600	0,09400
L-ácido ascórbico	-	0,05000	-
Biotina	-	0,00010	-

COMPONENTES (continuação)	MEM (g/L)	α-MEM (g/L)	D-MEM (g/L)
Cloreto de colina	0,00100	0,00100	0,00400
Ácido fólico	0,00100	0,00100	0,00400
Mio-inositol	0,00200	0,00200	0,00720
Niacinamida	0,00100	0,00100	0,00400
D-ácido pantotênico (hemicálcio)	0,00100	0,00100	0,00400
Piridoxal HCl	0,00100	0,00100	0,00400
Riboflavina	0,00010	0,00010	0,00040
Tiamina HCl	0,00100	0,00100	0,00400
Vitamina B12	-	0,00136	-
Glicose	1,00000	1,00000	1,00000
Vermelho de fenol sódio	0,01100	0,01100	0,01590
Ácido pirúvico sódio	-	0,11000	0,11000
Ácido tióctico	-	0,00020	-

MEM – *Minimum Essential Medium Eagle*; α-MEM – modificação α do *Minimum Essential Medium Eagle*; D-MEM – modificação Dullbecco do *Minimum Essential Medium Eagle*

REFERÊNCIAS



1. Rezende J. Obstetrícia, Conceito, Etimologia, Propósitos, Súmula Histórica. Obstetrícia. 10a. ed. 2005.

2. Khoury MJ. Genetic susceptibility to birth defects in humans: from gene discovery to public health action. Teratology 2000 Jan;61(1-2):17-20.

3. Barrow M.V. A brief history of the teratology of the early 20th century. Teratology 1971;4:119.

4. Yoon PW, Rasmussen SA, Lynberg MC, Moore CA, Anderka M, Carmichael SL, et al. The National Birth Defects Prevention Study. Public Health Rep 2001;116 Suppl 1:32-40.

5. Organização Pan-Americana de Saúde. Prevenção e controle de enfermidades genéticas e os defeitos congênitos: relatório de um grupo de consulta. 1984.

6. Taucher SC. Genetic services in Chile. Community Genet 2004;7(2-3):121-5.

7. WHO (World Health Organization). World Health Report. 1999.

8. Jones KL. Dysmorphology. Nelson's Textbook of Pediatrics 17th edition , 616-623. 2004. Berman, R. E., Kliegman R.N., and Jenson, H. B.

9. Penchaszadeh VB, Christianson AL, Giugliani R, Boulyjenkov V, Katz M. Services for the prevention and management of genetic disorders and birth defects in developing countries. Community Genet 1999;2(4):196-201.

10. Rosano A, Botto LD, Botting B, Mastroiacovo P. Infant mortality and congenital anomalies from 1950 to 1994: an international perspective. J Epidemiol Community Health 2000 Sep;54(9):660-6.

11. Congenital Malformations Surveillance Report. A report from the National Birth Defects Prevention Network. Teratology 2002;66 Suppl 1:S1-219.

12. Years of potential life lost before ages 65 and 85--United States, 1989-1990. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1992 May 8;41(18):313-5.

13. Lee K, Khoshnood B, Chen L, Wall SN, Cromie WJ, Mittendorf RL. Infant mortality from congenital malformations in the United States, 1970-1997. Obstet Gynecol 2001 Oct;98(4):620-7.

14. Victora CG, Barros FC. Infant mortality due to perinatal causes in Brazil: trends, regional patterns and possible interventions. Sao Paulo Med J 2001 Jan 4;119(1):33-42.

15. Ruano R, Duarte S, Zugaib M. Percutaneous Laser Ablation of Sacrococcygeal Teratoma in a Hydropic Fetus with Severe Heart Failure - Too Late for a Surgical Procedure? Fetal Diagn Ther 2009 Jan 8;25(1):26-30.

16. Ruano R, Pimenta EJ, Duarte S, Zugaib M. Four-dimensional ultrasonographic imaging of fetal lower urinary tract obstruction and guidance of percutaneous cystoscopy. Ultrasound Obstet Gynecol 2009 Feb;33(2):250-2.

17. Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1964 Jan;51:29-36.

18. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. Trends Cell Biol 2002 Nov;12(11):502-8.

19. Parker GC, nastassova-Kristeva M, Broxmeyer HE, Dodge WH, Eisenberg LM, Gehling UM, et al. Stem cells: shibboleths of development. Stem Cells Dev 2004 Dec;13(6):579-84.

20. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". Exp Hematol 2004 Jul;32(7):585-98.

21. Lakshmipathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. Stem Cells 2004;22(4):531-43.

22. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2002;369-91.

23. Young HE, Black AC, Jr. Adult stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 2004 Jan;276(1):75-102.

24. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

25. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981 Dec;78(12):7634-8.

26. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. Nature 1984 May 17;309(5965):255-6.

27. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. Exp Cell Res 1984 May;152(1):212-9.

28. Wobus AM, Guan K, Pich U. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. Methods Mol Biol 2001;158:263-86.

29. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 1985 Jun;87:27-45.

30. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La FR, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003 May 23;300(5623):1251-6.

31. Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. Realistic prospects for stem cell therapeutics. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2003;398-418.

32. Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. Methods Mol Biol 2002;185:127-56.

33. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 2005 Apr;85(2):635-78.

34. Moore TB, Sakamoto KM. Topics in pediatric leukemia--hematopoietic stem cell transplantation. MedGenMed 2005;7(1):19.

35. Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, Hong R, Good RA. Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet 1968 Dec 28;2(7583):1366-9.

36. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1989 Oct 26;321(17):1174-8.

37. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. Braz J Med Biol Res 2000 Aug;33(8):881-7.

38. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997 Apr 4;276(5309):71-4.

39. Fehrer C, Lepperdinger G. Mesenchymal stem cell aging. Exp Gerontol 2005 Dec;40(12):926-30.

40. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966 Dec;16(3):381-90.

41. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970 Oct;3(4):393-403.

42. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp 1988;136:42-60.

43. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991 Sep;9(5):641-50.

44. Horwitz EM, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2005;7(5):393-5.

45. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol 2004 May;32(5):414-25.

46. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human

first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001 Oct 15;98(8):2396-402.

47. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood) 2001 Jun;226(6):507-20.

48. Santos MA, O'Donoghue K, Wyatt-Ashmead J, Fisk NM. Fetal cells in the maternal appendix: a marker of inflammation or fetal tissue repair? Hum Reprod 2008 Jul 10.

49. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. N Engl J Med 1998 Apr 23;338(17):1186-91.

50. Nelson JL, Furst DE, Maloney S, Gooley T, Evans PC, Smith A, et al. Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. Lancet 1998 Feb 21;351(9102):559-62.

51. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Sci 1992 Jun;102 (Pt 2):341-51.

52. Ahrens N, Tormin A, Paulus M, Roosterman D, Salama A, Krenn V, et al. Mesenchymal stem cell content of human vertebral bone marrow. Transplantation 2004 Sep 27;78(6):925-9.

53. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2004 Apr;36(4):585-97.

54. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. Bone Marrow Transplant 2006 May;37(10):967-76.

55. Sabatini F, Petecchia L, Tavian M, Jodon dV, V, Rossi GA, Brouty-Boye D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. Lab Invest 2005 Aug;85(8):962-71.

56. Almeida-Porada G, El SD, Porada C, Zanjani ED. Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. Exp Hematol 2002 Dec;30(12):1454-62.

57. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001 Apr;7(2):211-28.

58. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec 2001 Sep 1;264(1):51-62.

59. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005 Aug;52(8):2521-9.

60. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 2001 Aug;44(8):1928-42.

61. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. Arthritis Rheum 2004 May;50(5):1522-32.

62. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res 2003 Sep;36(9):1179-83.

63. Covas DT, Piccinato CE, Orellana MD, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siqueira R, et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. Exp Cell Res 2005 Oct 1;309(2):340-4.

64. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy 2004;6(6):543-53.

65. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004 Mar 1;103(5):1669-75.

66. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, et al. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. Biochem Biophys Res Commun 2004 Jul 16;320(1):273-8.

67. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. Ann Hematol 2004 Dec;83(12):733-8.

68. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003;21(1):105-10.

69. Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, et al. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J Lab Clin Med 2003 May;141(5):342-9.

70. Okita JR, Sagawa N, Casey ML, Snyder JM. A comparison of human amnion tissue and amnion cells in primary culture by morphological and biochemical criteria. In Vitro 1983 Feb;19(2):117-26.

71. Bilic G, Ochsenbein-Kolble N, Hall H, Huch R, Zimmermann R. In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. Am J Obstet Gynecol 2004 Jan;190(1):87-92.

72. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der KC, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells 2004;22(7):1338-45.

73. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der KC, Noort WA, Claas FH, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. Blood 2003 Aug 15;102(4):1548-9.

74. Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. Cell Prolif 2007 Feb;40(1):75-90.

75. Tagami M, Ichinose S, Yamagata K, Fujino H, Shoji S, Hiraoka M, et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in

human mesenchymal stem cell. Cell Tissue Res 2003 Apr;312(1):31-40.

76. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol 1999 Nov;107(2):275-81.

77. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004 Apr;36(4):568-84.

78. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev 2006 May;20(3):161-71.

79. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. Stem Cells Dev 2004 Aug;13(4):436-48.

80. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem 1997 Feb;64(2):278-94.

81. Colter DC, Class R, Digirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Mar 28;97(7):3213-8.

82. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol 2000 Aug;28(8):875-84.

83. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J Cell Physiol 1999 Oct;181(1):67-73.

84. Stute N, Holtz K, Bubenheim M, Lange C, Blake F, Zander AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exp Hematol 2004 Dec;32(12):1212-25.

85. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

86. Ringden O, Le BK. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. APMIS 2005 Nov;113(11-12):813-30.

87. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2004 Nov;95(5):209-14.

88. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res 2001 Aug 15;268(2):189-200.

89. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am 1998 Jul;80(7):985-96.

90. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1998 Mar;16(2):155-62.

91. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res 1998 Jan 10;238(1):265-72.

92. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. J Cell Sci 2000 Apr;113 (Pt 7):1161-6.

93. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med 2001 Jun;7(6):259-64.

94. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, et al. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 2001 Oct;68(4-5):235-44.

95. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res 2002 Sep 15;69(6):908-17.

96. Woodbury D, Kramer BC, Reynolds K, Marcus AJ, Coyne TM, Black IB. Long-term cryopreserved amniocytes retain proliferative capacity and differentiate to ectodermal and mesodermal derivatives in vitro. Mol Reprod Dev 2006 Nov;73(11):1463-72.

97. Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Vacanti JP, Fauza DO. Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered from bone marrow-

derived mesenchymal progenitor cells. J Pediatr Surg 2003 Jun;38(6):984-7.

98. Jackson L, Gibas LM, Barr MA. Preparation of metaphase spreads from chorionic villus samples. Curr Protoc Hum Genet 2001 May;Chapter 8:Unit.

99. Kobayashi H, Gao Y, Ueta C, Yamaguchi A, Komori T. Multilineage differentiation of Cbfa1-deficient calvarial cells in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2000 Jul 5;273(2):630-6.

100. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. Ann N Y Acad Sci 2001 Jun;938:221-9.

101. Tomita T, Takeuchi E, Toyosaki-Maeda T, Oku H, Kaneko M, Takano H, et al. Establishment of nurse-like stromal cells from bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: indication of characteristic bone marrow microenvironment in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 1999 Sep;38(9):854-63.

102. Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. Ann Thorac Surg 2003 Jan;75(1):204-9.

103. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. Circulation 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II253-II258.

104. Gojo S, Umezawa A. Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts. Hum Cell 2003 Mar;16(1):23-30.

105. Gojo S, Gojo N, Takeda Y, Mori T, Abe H, Kyo S, et al. In vivo cardiovasculogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2003 Aug 1;288(1):51-9.

106. Le BK, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. Cytotherapy 2005;7(1):36-45.

107. Le BK, Gotherstrom C, Ringden O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, et al. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. Transplantation 2005 Jun 15;79(11):1607-14.

108. Guillot PV, Abass O, Bassett JH, Shefelbine SJ, Bou-Gharios G, Chan J, et al. Intrauterine transplantation of human fetal mesenchymal stem

cells from first-trimester blood repairs bone and reduces fractures in osteogenesis imperfecta mice. Blood 2008 Feb 1;111(3):1717-25.

109. Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. Best Pract Res Clin Haematol 2004 Sep;17(3):387-99.

110. Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. Stem Cells 2003;21(4):389-404.

111. Fine A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview. CMAJ 1994 Nov 1;151(9):1261-8.

112. Fauza DO, Fishman SJ, Mehegan K, Atala A. Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: skin replacement. J Pediatr Surg 1998 Feb;33(2):357-61.

113. Fauza DO, Fishman SJ, Mehegan K, Atala A. Videofetoscopically assisted fetal tissue engineering: bladder augmentation. J Pediatr Surg 1998 Jan;33(1):7-12.

114. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg 1988 Jan;23(1 Pt 2):3-9.

115. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. Stem Cells 2007 Mar;25(3):646-54.

116. Sano K, Cusick RA, Lee H, Pollok JM, Kaufmann PM, Uyama S, et al. Regenerative signals for heterotopic hepatocyte transplantation. Transplant Proc 1996 Jun;28(3):1857-8.

117. Qu J, Chehroudi B, Brunette DM. The use of micromachined surfaces to investigate the cell behavioural factors essential to osseointegration. Oral Dis 1996 Mar;2(1):102-15.

118. Fuchs JR, Pomerantseva I, Ochoa ER, Vacanti JP, Fauza DO. Fetal tissue engineering: in vitro analysis of muscle constructs. J Pediatr Surg 2003 Sep;38(9):1348-53.

119. Fuchs JR, Terada S, Hannouche D, Ochoa ER, Vacanti JP, Fauza DO. Engineered fetal cartilage: structural and functional analysis in vitro. J Pediatr Surg 2002 Dec;37(12):1720-5.

120. Fauza DO, Marler JJ, Koka R, Forse RA, Mayer JE, Vacanti JP. Fetal tissue engineering: diaphragmatic replacement. J Pediatr Surg 2001 Jan;36(1):146-51.

121. Kirkwood KJ, Billington WD. Expression of serologically detectable H-2 antigens on mid-gestation mouse embryonic tissues. J Embryol Exp Morphol 1981 Feb;61:207-19.

122. Numazaki K, Goldman H, Wong I, Wainberg MA. Maturation of human fetal and infantile thymic cells in tissue culture. In Vivo 1989 Mar;3(2):101-7.

123. Groscurth P, Erni M, Balzer M, Peter HJ, Haselbacher G. Cryopreservation of human fetal organs. Anat Embryol (Berl) 1986;174(1):105-13.

124. Dekel B, Burakova T, Ben-Hur H, Marcus H, Oren R, Laufer J, et al. Engraftment of human kidney tissue in rat radiation chimera: II. Human fetal kidneys display reduced immunogenicity to adoptively transferred human peripheral blood mononuclear cells and exhibit rapid growth and development. Transplantation 1997 Dec 15;64(11):1550-8.

125. Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, et al. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat Med 1997 Mar;3(3):350-3.

126. Borlongan CV, Stahl CE, Cameron DF, Saporta S, Freeman TB, Cahill DW, et al. CNS immunological modulation of neural graft rejection and survival. Neurol Res 1996 Aug;18(4):297-304.

127. Ourednik J, Ourednik W, Mitchell DE. Remodeling of lesioned kitten visual cortex after xenotransplantation of fetal mouse neopallium. J Comp Neurol 1998 May 25;395(1):91-111.

128. Reinholt FP, Hultenby K, Tibell A, Korsgren O, Groth CG. Survival of fetal porcine pancreatic islet tissue transplanted to a diabetic patient: findings by ultrastructural immunocytochemistry. Xenotransplantation 1998 Aug;5(3):222-5.

129. Dunnett SB, Nathwani F, Bjorklund A. The integration and function of striatal grafts. Prog Brain Res 2000;127:345-80.

130. Amos TA, Gordon MY. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation--a review. Cell Transplant 1995 Nov;4(6):547-69.

131. Hurst A.F., Tenner W.E., Osman A.A. Addison's disease with severe anemia treated by suprarenal grafting. Proc R Soc Med , 15-19. 1922.

132. Fichera G. Implanti omoplastici feto-umani nei cancro e nel diabete. Tumori , 434. 1928.

133. Thomas ED, Lochte HL, Jr., Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med 1957 Sep 12;257(11):491-6.

134. Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehncrona S, Gustavii B, Frackowiak R, et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. Science 1990 Feb 2;247(4942):574-7.

135. Lindvall O, Widner H, Rehncrona S, Brundin P, Odin P, Gustavii B, et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. Ann Neurol 1992 Feb;31(2):155-65.

136. Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. Neuroreport 1997 Sep 29;8(14):iii-iix.

137. Lindvall O, Hagell P. Clinical observations after neural transplantation in Parkinson's disease. Prog Brain Res 2000;127:299-320.

138. Hoffer BJ, Granholm AC, Stevens JO, Olson L. Catecholamine-containing grafts in parkinsonism: past and present. Clin Res 1988 Apr;36(3):189-95.

139. Kopyov OV, Jacques S, Lieberman A, Duma CM, Eagle KS. Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. Exp Neurol 1998 Jan;149(1):97-108.

140. Tabbal S, Fahn S, Frucht S. Fetal tissue transplantation [correction of transplanation] in Parkinson's disease. Curr Opin Neurol 1998 Aug;11(4):341-9.

141. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. Lancet 1995 Jul 22;346(8969):214-9.

142. Lu L, Shen RN, Broxmeyer HE. Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. Crit Rev Oncol Hematol 1996 Mar;22(2):61-78.

143. Harboe M, Pande H, Brandtzaeg P, Tveter KJ, Hjort PF. Synthesis of donor type gamma-G-globulin following thymus transplantation in hypo-gamma-globulinaemia with severe lymphocytopenia. Scand J Haematol 1966;3(5):351-74.

144. August CS, Rosen FS, Filler RM, Janeway CA, Markowski B, Kay HE. Implantation of a foetal thymus, restoring immunological competence

in a patient with thymic aplasia (Digeorge's syndrome). Lancet 1968 Dec 7;2(7580):1210-1.

145. Gluckman E, Auerbach AD, Horowitz MM, Sobocinski KA, Ash RC, Bortin MM, et al. Bone marrow transplantation for Fanconi anemia. Blood 1995 Oct 1;86(7):2856-62.

146. Vilmer E, Sterkers G, Rahimy C, Denamur E, Elion J, Broyart A, et al. HLA-mismatched cord-blood transplantation in a patient with advanced leukemia. Transplantation 1992 May;53(5):1155-7.

147. Giardini C, Polchi P, Lucarelli G, Galimberti M, Angelucci E, Baronciani D, et al. Marrow transplantation for children with acute leukemia: experience of Pesaro. Acta Haematol 1989;82(1):7-11.

148. Kochupillai V, Sharma S, Francis S, Nanu A, Mathew S, Bhatia P, et al. Fetal liver infusion in aplastic anaemia. Thymus 1987;10(1-2):95-102.

149. Wengler GS, Lanfranchi A, Frusca T, Verardi R, Neva A, Brugnoni D, et al. In-utero transplantation of parental CD34 haematopoietic progenitor cells in a patient with X-linked severe combined immunodeficiency (SCIDXI). Lancet 1996 Nov 30;348(9040):1484-7.

150. Fuchs JR, Terada S, Ochoa ER, Vacanti JP, Fauza DO. Fetal tissue engineering: in utero tracheal augmentation in an ovine model. J Pediatr Surg 2002 Jul;37(7):1000-6.

151. Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Udagawa T, Jennings RW, et al. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. J Pediatr Surg 2004 Jun;39(6):834-8.

152. Fuchs JR, Hannouche D, Terada S, Zand S, Vacanti JP, Fauza DO. Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. Stem Cells 2005 Aug;23(7):958-64.

153. Flake AW, Zanjani ED. In utero hematopoietic stem cell transplantation. A status report. JAMA 1997 Sep 17;278(11):932-7.

154. Harrison MR. Fetal surgery. Am J Obstet Gynecol 1996 Apr;174(4):1255-64.

155. Irwin BH, Vane DW. Complications of intrauterine intervention for treatment of fetal obstructive uropathy. Urology 2000 May 1;55(5):774.

156. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Matsuoka R, Okai T, et al. Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. Am J Obstet Gynecol 2003 Feb;188(2):480-4.

157. Babochkina T, Mergenthaler S, Dinges TM, Holzgreve W, Hahn S. Direct detection of fetal cells in maternal blood: a reappraisal using a combination of two different Y chromosome-specific FISH probes and a single X chromosome-specific probe. Arch Gynecol Obstet 2005 Dec;273(3):166-9.

158. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2000 Sep;92(1):103-8.

159. Bianchi DW, Simpson JL, Jackson LG, Elias S, Holzgreve W, Evans MI, et al. Fetal gender and aneuploidy detection using fetal cells in maternal blood: analysis of NIFTY I data. National Institute of Child Health and Development Fetal Cell Isolation Study. Prenat Diagn 2002 Jul;22(7):609-15.

160. Papadopulos NA, Klotz S, Raith A, Foehn M, Schillinger U, Henke J, et al. Amnion cells engineering: a new perspective in fetal membrane healing after intrauterine surgery? Fetal Diagn Ther 2006;21(6):494-500.

161. Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS, Rao GN. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. Cornea 2005 Aug;24(6):643-53.

162. Khokhar S, Natung T, Sony P, Sharma N, Agarwal N, Vajpayee RB. Amniotic membrane transplantation in refractory neurotrophic corneal ulcers: a randomized, controlled clinical trial. Cornea 2005 Aug;24(6):654-60.

163. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. BMC Dev Biol 2007;7:11.

164. Koh SH, Kim KS, Choi MR, Jung KH, Park KS, Chai YG, et al. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. Brain Res 2008 Jul 2.

165. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. Stem Cells 2004;22(7):1330-7.

166. Ma L, Feng XY, Cui BL, Law F, Jiang XW, Yang LY, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. Chin Med J (Engl) 2005 Dec 5;118(23):1987-93.

167. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells 2003;21(1):50-60.

168. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. Neurosci Lett 1996 May 3;209(1):9-12.

169. Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. Neuroreport 1997 Nov 10;8(16):3435-8.

170. Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, et al. Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. J Hum Genet 2000;45(3):171-6.

171. Takahashi N, Enosawa S, Mitani T, Lu H, Suzuki S, Amemiya H, et al. Transplantation of amniotic epithelial cells into fetal rat liver by in utero manipulation. Cell Transplant 2002;11(5):443-9.

172. Okawa H, Okuda O, Arai H, Sakuragawa N, Sato K. Amniotic epithelial cells transform into neuron-like cells in the ischemic brain. Neuroreport 2001 Dec 21;12(18):4003-7.

173. Sankar V, Muthusamy R. Role of human amniotic epithelial cell transplantation in spinal cord injury repair research. Neuroscience 2003;118(1):11-7.

174. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004 Dec;18(6):877-91.

175. Duchatel F, Oury JF, Mennesson B, Muray JM. Complications of diagnostic ultrasound-guided percutaneous umbilical blood sampling: analysis of a series of 341 cases and review of the literature. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1993 Dec 15;52(2):95-104.

176. Jauniaux E, Rodeck C. Use, risks and complications of amniocentesis and chorionic villous sampling for prenatal diagnosis in early pregnancy. Early Pregnancy 1995 Dec;1(4):245-52.

177. Tongsong T, Wanapirak C, Kunavikatikul C, Sirirchotiyakul S, Piyamongkol W, Chanprapaph P. Fetal loss rate associated with cordocentesis at midgestation. Am J Obstet Gynecol 2001 Mar;184(4):719-23.

178. Midtrimester amniocentesis for prenatal diagnosis. Safety and accuracy. JAMA 1976 Sep 27;236(13):1471-6.

179. An assessment of the hazards of amniocentesis. Report to the Medical Research Council by their Working Party on Amniocentesis. Br J Obstet Gynaecol 1978;85 Suppl 2:1-41.

180. Multicentre randomised clinical trial of chorion villus sampling and amniocentesis. First report. Canadian Collaborative CVS-Amniocentesis Clinical Trial Group. Lancet 1989 Jan 7;1(8628):1-6.

181. Nomura RM, Miyadahira S, Francisco RP, Okatani D, Zugaib M. Assessment of fetal maturity in high risk pregnancies: analysis according to gestational age. Rev Assoc Med Bras 2001 Oct;47(4):346-51.

182. Zugaib M., Miyadahira S, Nomura RM, Francisco RP. Vitalidade fetal. 155-160. 2000. São Paulo, Ed. Atheneu.

183. Barbati A, Di Renzo GC. Main clinical analyses on amniotic fluid. Acta Biomed 2004;75 Suppl 1:14-7.

184. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. Br Med Bull 1983 Oct;39(4):348-54.

185. Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. Methods Cell Biol 1982;26:11-34.

186. Johnston P, Salk D, Martin GM, Hoehn H. Cultivated cells from mid-trimester amniotic fluids: IV. Cell type indentification via one and two-dimensional electrophoresis of clonal whole cell homogenates. Prenat Diagn 1982 Apr;2(2):79-88.

187. Polgar K, Adany R, Abel G, Kappelmayer J, Muszbek L, Papp Z. Characterization of rapidly adhering amniotic fluid cells by combined immunofluorescence and phagocytosis assays. Am J Hum Genet 1989 Nov;45(5):786-92.

188. van Zwieten MC, Willems DL, Litjens LL, Schuring-Blom HG, Leschot N. How unexpected are unexpected findings in prenatal cytogenetic diagnosis? A literature review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2005 May 1;120(1):15-21.

189. Brace RA. Amniotic fluid volume and its relationship to fetal fluid balance: review of experimental data. Semin Perinatol 1986 Apr;10(2):103-12.

190. Seeds AE. Current concepts of amniotic fluid dynamics. Am J Obstet Gynecol 1980 Nov 1;138(5):575-86.

191. Trounson A. A fluid means of stem cell generation. Nat Biotechnol 2007 Jan;25(1):62-3.

192. Kurjak A, Kirkinen P, Latin V, Ivankovic D. Ultrasonic assessment of fetal kidney function in normal and complicated pregnancies. Am J Obstet Gynecol 1981 Oct 1;141(3):266-70.

193. Duenhoelter JH, Pritchard JA. Fetal respiration: quantitative measurements of amnionic fluid inspired near term by human and rhesus fetuses. Am J Obstet Gynecol 1976 Jun 1;125(3):306-9.

194. Olver RE, Strang LB. Ion fluxes across the pulmonary epithelium and the secretion of lung liquid in the foetal lamb. J Physiol 1974 Sep;241(2):327-57.

195. Mescher EJ, Platzker AC, Ballard PL, Kitterman JA, Clements JA, Tooley WH. Ontogeny of tracheal fluid, pulmonary surfactant, and plasma corticoids in the fetal lamb. J Appl Physiol 1975 Dec;39(6):1017-21.

196. Minei LJ, Suzuki K. Role of fetal deglutition and micturition in the production and turnover of amniotic fluid in the monkey. Obstet Gynecol 1976 Aug;48(2):177-81.

197. Muller F, Dommergues M, Ville Y, Lewin F, valez-Morichon N, Nihoul-Fekete C, et al. Amniotic fluid digestive enzymes: diagnostic value in fetal gastrointestinal obstructions. Prenat Diagn 1994 Oct;14(10):973-9.

198. Macek M, Hurych J, Rezacova D. [Collagen synthesis in long-term cultures of amniotic fluid]. Cesk Pediatr 1973 Sep;28(9):478-80.

199. Hurych J, Macek M, Beniac F, Rezacova D. Biochemical characteristics of collagen produced by long term cultivated amniotic fluid cells. Hum Genet 1976 Mar 12;31(3):335-40.

200. Priest RE, Priest JH, Moinuddin JF, Keyser AJ. Differentiation in human amniotic fluid cell cultures: I: Collagen production. J Med Genet 1977 Jun;14(3):157-62.

201. Whitsett CF, Priest JH, Priest RE, Marion J. HLA typing of cultured amniotic fluid cells. Am J Clin Pathol 1983 Feb;79(2):186-94.

202. Torricelli F, Brizzi L, Bernabei PA, Gheri G, Di LS, Nutini L, et al. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. Ital J Anat Embryol 1993 Apr;98(2):119-26.

203. Streubel B, Martucci-Ivessa G, Fleck T, Bittner RE. [In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook]. Wien Med Wochenschr 1996;146(9-10):216-7.

204. Erlich H, Bugawan T, Begovich AB, Scharf S, Griffith R, Saiki R, et al. HLA-DR, DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes. Eur J Immunogenet 1991 Feb;18(1-2):33-55.

205. Milunsky A, Bender CS. Failure of amniotic-fluid cell growth with toxic tubes. N Engl J Med 1979 Jul 5;301(1):47-8.

206. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? Hum Reprod 2003 Jul;18(7):1489-93.

207. Mosquera A, Fernandez JL, Campos A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosalvez J. Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. J Med Genet 1999 Jun;36(6):494-6.

208. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. Stem Cells 2004;22(5):675-82.

209. Sessarego N, Parodi A, Podesta M, Benvenuto F, Mogni M, Raviolo V, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: solid perspectives for clinical application. Haematologica 2008 Mar;93(3):339-46.

210. Tsai MS, Hwang SM, Tsai YL, Cheng FC, Lee JL, Chang YJ. Clonal amniotic fluid-derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. Biol Reprod 2006 Mar;74(3):545-51.

211. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bettelheim D, Lubec G, Pollack A, et al. Neurogenic cells in human amniotic fluid. Am J Obstet Gynecol 2004 Jul;191(1):309-14.

212. Kunisaki SM, Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan DA, Vacanti JP, et al. Diaphragmatic repair through fetal tissue engineering: a comparison between mesenchymal amniocyte- and myoblast-based constructs. J Pediatr Surg 2006 Jan;41(1):34-9.

213. Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, et al. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. Cell 1990 Oct 5;63(1):203-11.

214. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. Nucleic Acids Res 1992 Sep 11;20(17):4613-20.

215. Shamblott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad

range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2001 Jan 2;98(1):113-8.

216. Sartore S, Lenzi M, Angelini A, Chiavegato A, Gasparotto L, De CP, et al. Amniotic mesenchymal cells autotransplanted in a porcine model of cardiac ischemia do not differentiate to cardiogenic phenotypes. Eur J Cardiothorac Surg 2005 Nov;28(5):677-84.

217. Zangrossi S, Marabese M, Broggini M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, et al. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. Stem Cells 2007 Jul;25(7):1675-80.

218. Amniotic fluid harbours multipotent stem cells. Reprod Biomed Online 2007 Mar;14(3):395.

219. De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol 2007 Jan;25(1):100-6.

220. Laundon CH, Priest JH, Priest RE. The characterization of hCG regulation in cultured human amniotic fluid cells. Prenat Diagn 1981 Oct;1(4):269-75.

221. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. Med Sci Monit 2002 Nov;8(11):RA253-RA257.

222. Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. J Pediatr Surg 2001 Nov;36(11):1662-5.

223. Kaviani A, Guleserian K, Perry TE, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO. Fetal tissue engineering from amniotic fluid. J Am Coll Surg 2003 Apr;196(4):592-7.

224. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod 2004 Jun;19(6):1450-6.

225. Held KR, Sonnichsen S. The effect of oxygen tension on colony formation and cell proliferation of amniotic fluid cells in vitro. Prenat Diagn 1984 May;4(3):171-9.

226. Genari SC, Wada ML. Effects of nutritional stress conditions on the ploidy and behavior of human amniotic cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2000 Mar;36(3):147-50.

227. You Q, Cai L, Zheng J, Tong X, Zhang D, Zhang Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. Int J Gynaecol Obstet 2008 Nov;103(2):149-52.

228. Kunisaki SM, Fuchs JR, Steigman SA, Fauza DO. A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. Tissue Eng 2007 Nov;13(11):2633-44.

229. Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, et al. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2007 Dec;16(6):931-52.

230. Kaviani A., Young A., Fuchs J.R. Reduced immunogenicity of mesenchymal amniocytes during expansion in vitro: implications for heterologous tissue engineering applications. Journal of the American College of Surgeons 2002;195(S40).

231. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004 Mar 1;103(5):1669-75.

232. Kunisaki SM, Armant M, Kao GS, Stevenson K, Kim H, Fauza DO. Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. J Pediatr Surg 2007 Jun;42(6):974-9.

233. Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J, et al. Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. J Pediatr Surg 2008 Jun;43(6):1164-9.

234. Kaviani A, Jennings RW, Fauza DO. Amniotic fluid-derived fetal mesenchymal cells differentiate into myogenic precursors in vitro. Journal of the American College of Surgeons S29, 195. 2002.

235. Sancho S, Mongini T, Tanji K, Tapscott SJ, Walker WF, Weintraub H, et al. Analysis of dystrophin expression after activation of myogenesis in amniocytes, chorionic-villus cells, and fibroblasts. A new method for diagnosing Duchenne's muscular dystrophy. N Engl J Med 1993 Sep 23;329(13):915-20.

236. Liu ZS, Xu YF, Feng SW, Li Y, Yao XL, Lu XL, et al. Baculovirus-transduced mouse amniotic fluid-derived stem cells maintain differentiation potential. Ann Hematol 2008 Dec 6.

237. Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, et al. Mesenchymal stem cells promote engraftment

of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. Exp Hematol 2002 Aug;30(8):870-8.

238. Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatiotis S, et al. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. Cell Res 2006 Apr;16(4):329-36.

239. McLaughlin D, Tsirimonaki E, Vallianatos G, Sakellaridis N, Chatzistamatiou T, Stavropoulos-Gioka C, et al. Stable expression of a neuronal dopaminergic progenitor phenotype in cell lines derived from human amniotic fluid cells. J Neurosci Res 2006 May 15;83(7):1190-200.

240. Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, Peng L, Chen JH, et al. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. Cell Biol Int 2008 Nov;32(11):1439-48.

241. De Gemmis P, Lapucci C, Bertelli M, Tognetto A, Fanin E, Vettor R, et al. A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2006 Oct;15(5):719-28.

242. Chang YJ, Shih DT, Tseng CP, Hsieh TB, Lee DC, Hwang SM. Disparate mesenchyme-lineage tendencies in mesenchymal stem cells from human bone marrow and umbilical cord blood. Stem Cells 2006 Mar;24(3):679-85.

243. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 2006 May;24(5):1294-301.

244. Peister A, Porter BD, Kolambkar YM, Hutmacher DW, Guldberg RE. Osteogenic differentiation of amniotic fluid stem cells. Biomed Mater Eng 2008;18(4-5):241-6.

245. Kunisaki SM, Jennings RW, Fauza DO. Fetal cartilage engineering from amniotic mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev 2006 Apr;15(2):245-53.

246. Kolambkar YM, Peister A, Soker S, Atala A, Guldberg RE. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells. J Mol Histol 2007 Oct;38(5):405-13.

247. Kunisaki SM, Freedman DA, Fauza DO. Fetal tracheal reconstruction with cartilaginous grafts engineered from mesenchymal amniocytes. J Pediatr Surg 2006 Apr;41(4):675-82.

248. De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A, Gasparotto L, Piccoli M, Taiani J, et al. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. J Urol 2007 Jan;177(1):369-76.

249. Pan HC, Yang DY, Chiu YT, Lai SZ, Wang YC, Chang MH, et al. Enhanced regeneration in injured sciatic nerve by human amniotic mesenchymal stem cell. J Clin Neurosci 2006 Jun;13(5):570-5.

250. Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY, et al. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. J Clin Neurosci 2007 Nov;14(11):1089-98.

251. Pan HC, Chen CJ, Cheng FC, Ho SP, Liu MJ, Hwang SM, et al. Combination of G-CSF Administration and Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cell Transplantation Promotes Peripheral Nerve Regeneration. Neurochem Res 2008 Aug 9.

252. Rehni AK, Singh N, Jaggi AS, Singh M. Amniotic fluid derived stem cells ameliorate focal cerebral ischaemia-reperfusion injury induced behavioural deficits in mice. Behav Brain Res 2007 Oct 1;183(1):95-100.

253. Cipriani S, Bonini D, Marchina E, Balgkouranidou I, Caimi L, Grassi ZG, et al. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. Cell Biol Int 2007 Aug;31(8):845-50.

254. Iacovitti L, Donaldson AE, Cai J. Human amniotic fluid stem cells do not generate dopamine neurons in vitro or after transplantation in vivo. Stem Cells Dev 2008 Dec 2.

255. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. Transplantation 2005 Mar 15;79(5):528-35.

256. Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, Callegari A, Gasparotto L, Taiani J, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. J Mol Cell Cardiol 2007 Apr;42(4):746-59.

257. Delo DM, Olson J, Baptista PM, D'Agostino RB, Jr., Atala A, Zhu JM, et al. Non-invasive longitudinal tracking of human amniotic fluid stem cells in the mouse heart. Stem Cells Dev 2008 Dec;17(6):1185-94.

258. Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Breymann C, Mol A, Genoni M, et al. Prenatally fabricated autologous human living heart valves

based on amniotic fluid derived progenitor cells as single cell source. Circulation 2007 Sep 11;116(11 Suppl):I64-I70.

259. Schmidt D, Achermann J, Odermatt B, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Cryopreserved amniotic fluid-derived cells: a lifelong autologous fetal stem cell source for heart valve tissue engineering. J Heart Valve Dis 2008 Jul;17(4):446-55.

260. Carraro G, Perin L, Sedrakyan S, Giuliani S, Tiozzo C, Lee J, et al. Human amniotic fluid stem cells can integrate and differentiate into epithelial lung lineages. Stem Cells 2008 Nov;26(11):2902-11.

261. Perin L, Giuliani S, Jin D, Sedrakyan S, Carraro G, Habibian R, et al. Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. Cell Prolif 2007 Dec;40(6):936-48.

262. Grisafi D, Piccoli M, Pozzobon M, Ditadi A, Zaramella P, Chiandetti L, et al. High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. Stem Cells Dev 2008 Oct;17(5):953-62.

263. Orciani M, Emanuelli M, Martino C, Pugnaloni A, Tranquilli AL, Di PR. Potential role of culture mediums for successful isolation and neuronal differentiation of amniotic fluid stem cells. Int J Immunopathol Pharmacol 2008 Jul;21(3):595-602.

264. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006 Feb;24(2):462-71.

265. Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion. J Biosci Bioeng 2008 Jul;106(1):46-50.

266. Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. Stem Cells 2005 Oct;23(9):1357-66.

267. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. Stem Cells 2006 May;24(5):1409-10.

268. Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, et al. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. Differentiation 2007 Apr;75(4):279-91.

269. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! Stem Cells 2007 Jul;25(7):1603-9.

270. Cobo F, Talavera P, Concha A. Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. Virology 2006 Mar 30;347(1):1-10.

271. Cobo F, Stacey GN, Cortes JL, Concha A. Environmental monitoring in stem cell banks. Appl Microbiol Biotechnol 2006 May;70(6):651-62.

272. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet 1996 Apr 6;347(9006):921-5.

273. Klein R, Dumble LJ. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. Lancet 1993 Mar 20;341(8847):768.

274. Dedrick VA. Determining the safety of medical devices containing animal tissues: the new European standards. J Regul Affairs ProfSoc 1997;2:20.

275. MacDermott RP, Bragdon MJ. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. Behring Inst Mitt 1983 May;(72):122-8.

276. Kievits F, Boerenkamp WJ, Ivanyi P. H-2-dependent binding of xenogeneic beta 2-microglobulin from culture media. J Immunol 1988 Jun 15;140(12):4253-5.

277. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. Blood 1997 Feb 1;89(3):776-9.

278. Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. Cancer Immunol Immunother 2000 Jun;49(3):152-6.

279. Tuschong L, Soenen SL, Blaese RM, Candotti F, Muul LM. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. Hum Gene Ther 2002 Sep 1;13(13):1605-10.

280. Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther 2004 May;9(5):747-56.

281. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. Arthritis Rheum 2008 Feb;58(2):501-10.

282. Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. Stem Cells 2007 May;25(5):1270-8.

283. Kadonaga JT. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. Cell 2004 Jan 23;116(2):247-57.

284. Mannervik M, Nibu Y, Zhang H, Levine M. Transcriptional coregulators in development. Science 1999 Apr 23;284(5414):606-9.

285. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. Cell 2005 Sep 23;122(6):947-56.

286. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. Cell 2003 May 30;113(5):643-55.

287. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell 1998 Oct 30;95(3):379-91.

288. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet 2000 Apr;24(4):372-6.

289. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 2003 May 30;113(5):631-42.

290. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006 Aug 25;126(4):663-76.

291. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 2008 Feb 22;132(4):567-82.

292. Qin D, Li W, Zhang J, Pei D. Direct generation of ES-like cells from unmodified mouse embryonic fibroblasts by Oct4/Sox2/Myc/Klf4. Cell Res 2007 Nov;17(11):959-62.

293. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, ntosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

294. Xi R, Xie T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. Science 2005 Dec 2;310(5753):1487-9.

295. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature 1990 Mar 29;344(6265):435-9.

296. Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. Cell Res 2002 Dec;12(5-6):321-9.

297. Pan G, Qin B, Liu N, Scholer HR, Pei D. Identification of a nuclear localization signal in OCT4 and generation of a dominant negative mutant by its ablation. J Biol Chem 2004 Aug 27;279(35):37013-20.

298. Pan G, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. FASEB J 2006 Aug;20(10):1730-2.

299. Ambrosetti DC, Basilico C, Dailey L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. Mol Cell Biol 1997 Nov;17(11):6321-9.

300. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. J Biol Chem 2005 Jul 1;280(26):24731-7.

301. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev 2003 Jan 1;17(1):126-40.

302. Li J, Pan G, Cui K, Liu Y, Xu S, Pei D. A dominant-negative form of mouse SOX2 induces trophectoderm differentiation and progressive polyploidy in mouse embryonic stem cells. J Biol Chem 2007 Jul 6;282(27):19481-92.

303. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4

expression in mouse embryonic stem cells. Nat Cell Biol 2007 Jun;9(6):625-35.

304. Zhou Q, Chipperfield H, Melton DA, Wong WH. A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2007 Oct 16;104(42):16438-43.

305. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet 2006 Apr;38(4):431-40.

306. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Cell Res 2007 Jan;17(1):42-9.

307. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. Nature 2006 Nov 16;444(7117):364-8.

308. de Crespigny L, Robinson HP, Ngu A. Pain with amniocentesis and transabdominal CVS. Aust N Z J Obstet Gynaecol 1990 Nov;30(4):308-9.

309. Bombard AT, Powers JF, Carter S, Schwartz A, Nitowsky HM. Procedure-related fetal losses in transplacental versus

nontransplacental genetic amniocentesis. Am J Obstet Gynecol 1995 Mar;172(3):868-72.

310. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 Nov;193(1):265-75.

311. Fisher LD, van Belle G. Bioestatistics - a methodology to health sciences. 991. 1993.

312. Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 2a. edition, 493. 1980.

313. Singer JM, Andrade D.F. Handbook of statistics - bio-environmental and public health statistics. v.18, 115-160. 2000. Sen, P. K. and Rao, C. R.

314. Chang HC, Jones OW, Masui H. Human amniotic fluid cells grown in a hormone-supplemented medium: suitability for prenatal diagnosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1982 Aug;79(15):4795-9.

315. Steigman SA, Armant M, Bayer-Zwirello L, Kao GS, Silberstein L, Ritz J, et al. Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. J Pediatr Surg 2008 Jun;43(6):1164-9.

316. Sikkema-Raddatz B, Suijkerbuijk R, van d, V, Stoepker M, Buys CH, te Meerman GJ. An absolute procedure to test the growth potential of medium and the influence of decreased oxygen tension in primary amniotic fluid cell cultures. Prenat Diagn 2006 Sep;26(9):855-60.

317. Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. Stem Cells 2007 May;25(5):1166-77.

318. Dean DD, Schwartz Z, Bonewald L, Muniz OE, Morales S, Gomez R, et al. Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of beta-glycerophosphate and ascorbic acid. Calcif Tissue Int 1994 May;54(5):399-408.

319. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci U S A 2002 Jun 25;99(13):8932-7.

320. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med 1999 Mar;5(3):309-13.

321. Kojima K, Ignotz RA, Kushibiki T, Tinsley KW, Tabata Y, Vacanti CA. Tissue-engineered trachea from sheep marrow stromal cells with transforming growth factor beta2 released from biodegradable microspheres in a nude rat recipient. J Thorac Cardiovasc Surg 2004 Jul;128(1):147-53.

322. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. Biochem Biophys Res Commun 2004 Jul 30;320(3):914-9.

323. Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials 2000 Mar;21(5):431-40.

324. Waese EY, Kandel RA, Stanford WL. Application of stem cells in bone repair. Skeletal Radiol 2008 Jul;37(7):601-8.

325. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 1993 Apr;75(4):532-53.

326. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. Eur Cell Mater 2005;9:23-32.

327. Mano JF, Reis RL. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. J Tissue Eng Regen Med 2007 Jul;1(4):261-73.

328. Ahmed N, Stanford WL, Kandel RA. Mesenchymal stem and progenitor cells for cartilage repair. Skeletal Radiol 2007 Oct;36(10):909-12.

329. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. J Cell Mol Med 2006 Jan;10(1):7-19.

330. Tsai MS, Hwang SM, Chen KD, Lee YS, Hsu LW, Chang YJ, et al. Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. Stem Cells 2007 Oct;25(10):2511-23.

331. Wang H, Chen S, Cheng X, Dou Z, Wang H. [Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2008 Sep;24(9):1582-7.

332. Annas GJ, Elias S. The politics of transplantation of human fetal tissue. N Engl J Med 1989 Apr 20;320(16):1079-82.

333. Greely HT, Hamm T, Johnson R, Price CR, Weingarten R, Raffin T. The ethical use of human fetal tissue in medicine. Stanford University Medical Center Committee on Ethics. N Engl J Med 1989 Apr 20;320(16):1093-6.

334. Gershon D. Fetal tissue research. New panel for ethical issues. Nature 1991 Jan 17;349(6306):184.

335. Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kolble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. BJOG 2009 Jan;116(2):166-72.

336. Maitra B, Szekely E, Gjini K, Laughlin MJ, Dennis J, Haynesworth SE, et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. Bone Marrow Transplant 2004 Mar;33(6):597-604.

337. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. Lancet 2008 May 10;371(9624):1579-86.

338. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-

derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. Bone Marrow Transplant 1995 Oct;16(4):557-64.

339. Gotherstrom C, Ringden O, Westgren M, Tammik C, Le BK. Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. Bone Marrow Transplant 2003 Aug;32(3):265-72.

340. Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, Le BK. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. Am J Obstet Gynecol 2004 Jan;190(1):239-45.

341. Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. Chin Med J (Engl) 2004 Oct;117(10):1443-8.

342. Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R, et al. Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. Neurol Res 2006 Jul;28(5):523-6.

343. Gazit D, Turgeman G, Kelley P, Wang E, Jalenak M, Zilberman Y, et al. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. J Gene Med 1999 Mar;1(2):121-33.

344. Rodino-Klapac LR, Chicoine LG, Kaspar BK, Mendell JR. Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges. Arch Neurol 2007 Sep;64(9):1236-41.

345. Siegel N, Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschlager M. Human amniotic fluid stem cells: a new perspective. Amino Acids 2007 Aug 21.

346. Duarte S, Debes AA, Lopes MAB, Bydlowski SP, Zugaib M. Cinética dos amniócitos em cultura. Anais do XI Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia . 2005.

347. Duarte S, Debes AA, Lopes MAB, Bydlowski SP, Zugaib M. Teste do Azul do Nilo como preditor de êxito em cultura e expansão de amniócitos. Anais do XIII Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia . 2008.

348. Duarte S, Debes AA, Lopes MAB, Bydlowski SP, Zugaib M. Cultura e expansão de células mesenquimais de líquido pleural fetal. Anais do 51o.Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia . 2005.

349. Duarte S, Debes AA, Lopes MAB, Bydlowski SP, Zugaib M. Cultura e expansão das células mesenquimais urinárias fetais. Anais do XIII Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia . 2008.