LILIAN RENATA FIORELLI ARAZAWA

**Obtenção de células-tronco provenientes do fluido
menstrual: transporte, isolamento, caracterização, expansão
e criopreservação**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Obstetrícia e
Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada
Baracat

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Fiorelli Arazawa, Lilian Renata

Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual : transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação / Lilian Renata Fiorelli Arazawa. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Edmund Chada Baracat.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Células mesenquimais estromais
3.Menstruação 4.Ciclo menstrual 5.Imunofenotipagem 6.Criopreservação

USP/FM/DBD-330/14

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda minha querida família:

Ao meu pai **Alfredo Inácio Fiorelli** por me apoiar em todas minhas decisões e com suas orientações me fazer refletir e me transformar sempre em uma pessoa melhor;

À minha mãe **Sonia Maria Baldini** que com toda sua calma e paciência sempre me ajudou a encontrar um ponto de equilíbrio e seguir meu caminho com mais serenidade;

Aos meus irmãos **Ricardo Alexandre Fiorelli** e Priscilla Alessandra Fiorelli que sempre serão os grandes companheiros de minha vida pois juntos conseguimos sempre força para vencer os obstáculos impostos;

Ao meu querido marido **Sidney Tomyo Nishida Arazawa** que me surpreende a cada dia, que me encanta com seu romantismo, companheirismo e cuidado, está sempre ao meu lado e me dá forças para seguir em frente;

À minha futura filhinha **Melissa Naomi Fiorelli Arazawa**, que ainda nem nasceu mas já me faz todos os dias uma pessoa feliz e abençoada!

Agradecimentos

Agradeço à toda minha família, **pai, mãe, irmão, irmã** e **marido**, pelo apoio em todas as etapas de minha formação e agora na elaboração desta dissertação de mestrado. Ao meu pai **Alfredo Inácio Fiorelli** que mesmo na correria do dia dia sempre encontrava tempo para auxiliar em algumas dúvidas, cedendo inclusive espaço físico para o armazenamento dos materiais no início do trabalho. Ao meu marido **Sidney Tomyo Nishida Arazawa**, por todo apoio, conforto e paciência durante a elaboração desta dissertação.

Ao Doutor **Luiz Eduardo Vieira Diniz** por me inspirar na escolha da carreira como Ginecologista e me proporcionar enorme apoio desde o início de minha carreira.

Ao Professor Doutor **Edmund Chada Baracat** por sempre confiar em meu trabalho e me proporcionar excelentes oportunidades não só no presente estudo mas como Ginecologista no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e na graduação em medicina na FMUSP, pela qual sou apaixonada. Eu o admiro muito como orientador, chefe, como pessoa e me inspira como profissional.

Ao meu chefe Doutor **Jorge Milhem Haddad** que me auxiliou desde a elaboração do projeto inicial, execução e conclusão do trabalho, além de sempre me possibilitar grandes oportunidades no Setor de Uroginecologia.

À Doutora ***Maria Helena Nicola*** e toda sua equipe do Laboratório Cryopraxis por possibilitar a existência deste trabalho com ajuda tanto material, financeira e pessoal na execução da parte laboratorial do presente estudo.

Aos Professores ***Aparecida Maria Pacetta, Rodrigo de Aquino Castro, Antonio Pedro Flores Auge e Luciana Lamarao Damous*** que admiro muito e que com toda sua sabedoria avaliaram este trabalho e fizeram críticas construtivas que o tornaram um trabalho melhor elaborado.

A todas ***voluntárias*** do presente estudo que participaram ativamente do processo de coleta de material tornando o trabalho possível.

A todos, muito obrigada!

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e

*Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

	Lista de abreviaturas	
	Lista de figuras, tabelas e gráficos	
	Resumo	
	Summary	
1	Introdução	1
	1.1 História do Estudo da Célula	2
	1.2 Células-tronco.....	3
	1.3 Células-tronco mesenquimais	6
	1.4 Fluido menstrual e as células-tronco.....	7
	1.5 Métodos de identificação das células-tronco.....	10
2	Objetivos	
	2.1 Geral	14
	2.2 Específicos	14
3	Casuística e métodos	
	3.1 Tipo de Estudo	15
	3.2 Casuística	15
	3.3 Local de estudo	19
	3.4 Coleta de fluido menstrual.....	20
	3.5 Descrição dos Procedimentos	21
	3.5.1 Procedimento de Coleta e Acondicionamento.....	21
	3.5.2 Procedimento de Transporte	25
	3.5.3 Procedimento de Recebimento do fluido menstrual coletado.....	25
	3.5.4 Processamento	26
	3.5.5 Análise imunofenotípica	28
	3.5.6 Cultivo	30
	3.5.7 Criopreservação	31
	3.6 Análise Estatística	31
	3.7 Aspectos Éticos	31
	3.7.1 Riscos e Benefícios	32

	3.8 Patrocinador	32
4	Resultados	33
5	Discussão	49
6	Conclusões	55
8	Referências	56
7	Anexos	68

LISTA DE ABREVIATURAS

Lista de abreviaturas

AABB	Associação Americana de Bancos de Sangue
ACHO	Anticoncepcional Hormonal Oral
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovírus
DIU	Dispositivo Intrauterino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Dubeco's Phosphate Buffer Salina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	Federal Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
h	horas
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hTERT	Transcriptase Reversa Telomerase Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula Humana
LTB	Laqueadura Tubária Bilateral
MEM	Meio mínimo essencial
mL	mililitros

Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pMIGR1	<i>bicistronic murine stem cell virus-derived retroviral Vector</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SSEA-4	<i>stage-specific mouse embryonic antigen-4</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TRA 1-60	podocalixina

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Lista de figuras

Figura 1	Células-tronco no desenvolvimento embrionário.	4
Figura 2	Tipos de linhagens celulares originárias das células-tronco mesenquimais.....	6
Figura 3	Algoritmo do estudo.....	21
Figura 4	Dispositivo utilizado para coleta do fluido menstrual.....	22
Figura 5	Instrução do uso do coletor de fluido menstrual	23
Figura 6	Etapas iniciais do processamento do fluido menstrual.....	27
Figura 7A	Cinco dias de cultivo. Células fibroblastóides ao centro, hemácias (seta branca) e células epiteliais (seta preta).....	42
Figura 7B	Nove dias de cultivo evidenciando a formação de um <i>cluster</i> de células (10X).....	43
Figura 8 A	Dezenove dias de cultivo apresentando colônia em semi-confluência.....	44
Figura 8 B	Cultivo com 23 dias em confluência (10X).....	45
Figura 9	Cultura com 1 dia após a passagem #1 em semi-confluência (10X).....	46
Figura 10	Cultivo com 1 dia após passagem #2 apresentou confluência (10X).....	47

Lista de tabelas

Tabela 1	Comparação das características das células-tronco mesenquimais de diferentes fontes.....	9
Tabela 2	Marcadores de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes.....	11
Tabela 3	Comparação entre os diferentes marcadores de células-tronco.....	12
Tabela 4	Principais características do perfil das voluntárias.....	18
Tabela 5	Análise dos resultados sorológicos das 20 voluntárias incluídas no estudo.....	19
Tabela 6	Marcadores pesquisados por imunofenotipagem	29
Tabela 7	Perfil do material obtido do fluido menstrual em cada coleta.....	35
Tabela 8	Análise dos resultados microbiológicos das 40 amostras obtidas no estudo.....	35
Tabela 9	Avaliação isolada das pacientes sem uso de hormônio.....	37
Tabela 10	Análise de correlação de todas as pacientes	39
Tabela 11	Análise de correlação das paciente sem hormônio ou DIU com diferentes parâmetros.....	40
Tabela 12	Disponibilidade de células tronco nas amostras iniciais e após a cultura.....	48

Lista de gráficos

Gráfico 1	Avaliação de aplicação do coletor.....	33
Gráfico 2	Avaliação de retirada do coletor.....	34
Gráfico 3	Avaliação de incômodo ou dor com o coletor.....	34

RESUMO

Resumo

Fiorelli Arazawa LR. *Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual – coleta, transporte, caracterização, isolamento, expansão e criopreservação* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: As células-tronco mesenquimais são capazes de regenerar diferentes tipos de tecidos, no entanto, a maioria dos métodos para sua obtenção são invasivos. Recentemente, foi descoberta a existência destas células no sangue menstrual. **OBJETIVO:** Padronizar as técnicas de coleta e transporte do fluido menstrual, bem como a caracterização, isolamento, expansão e criopreservação de células-tronco do fluido menstrual e avaliar a disponibilidade de células tronco mesenquimais no fluido menstrual. **MÉTODOS:** No período de agosto de 2011 a março de 2012 foram selecionadas 20 voluntárias com ciclo menstrual regular, sem doença ginecológica. O fluido menstrual foi coletado no dia de maior fluxo e submetido a imunofenotipagem e cultivo celular. Foram realizadas duas passagens em meio de cultura até atingir semi-confluência das células-tronco, as quais foram, em seguida, criopreservadas. **RESULTADOS:** Os parâmetros analisados apresentaram os seguintes valores médios: volume de fluido menstrual $6,90 \pm 5,60$ mL; tempo de transporte $17,20 \pm 5,50$ h; número de células totais $3,95 \times 10^6 \pm 3,88 \times 10^6$ com $76,05\% \pm 24,57$ de células viáveis. Após a cultura, as células mesenquimais aumentaram de $0,14\% \pm 0,26$ para

96,19%±2,14. Na primeira passagem de cultura, após 15 a 21 dias, as colônias formaram grupos que atingiram a confluência, que a partir da segunda passagem ocorreu em cerca de 3 dias. As células-tronco mesenquimais criopreservadas eram viáveis. CONCLUSÃO: As células-tronco do fluido menstrual podem ser obtidas sem métodos invasivos. O fluido menstrual pode ser transportado em condições ideais de temperatura até 24 horas após a coleta. As células tronco mesenquimais podem ser caracterizadas por imunofenotipagem, isoladas, cultivadas e expandidas e, em seguida, criopreservadas. O fluido menstrual contém células tronco mesenquimais viáveis e apropriadas para cultivo.

Descritores: Células-tronco; células mesenquimais estromais; menstruação; ciclo menstrual; imunofenotipagem; criopreservação.

SUMMARY

Summary

Fiorelli Arazawa LR. *Obtaining stem cells from menstrual fluid – collection, transportation, characterization, isolation, expansion and cryopreservation* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: Mesenchymal stem cells may renovate different tissues, but techniques to obtain these cells are invasive. Recently, those cells were detected in menstrual blood. OBJECTIVE: Patterning techniques of collection, transportation, characterization, isolation, expansion and cryopreservation of stem cells in menstrual fluid. METHODS: From August 2011 to March 2012 twenty volunteers were selected with regular menstrual cycle without gynecological diseases. They collected menstrual fluid on the most intense flux day to analysis by immunophenotyping and cellular culture. Culture was made in 2 stages until reached semi-confluence of stem cells and these cells were cryopreserved. RESULTS: Average of menstrual fluid volume was $6,90 \pm 5,60$ mL, transportation time was $17,20 \pm 5,50$ h, and total number of cells was $3,95 \times 10^6 \pm 3,88 \times 10^6$ with $76,05\% \pm 24,57$ were viables. After culture, mesenchymal stem cells increased from $0,14\% \pm 0,26$ to $96,19\% \pm 2,14$. After 15 to 21 days of culture in first passage, colonies formed clusters that reached confluence. In second passage, it happens after 3 days of culture and stem cells were cryopreserved. CONCLUSION: Stem cells of menstrual fluid may be easily obtained without invasive methods. Menstrual

fluid can be transported in good conditions of temperature up to 24 hours of collection. Mesenchymal stem cells of menstrual fluid may be characterized by immunophenotyping, as well as it is possible to isolated, cultivate and cryopreserved them. Menstrual fluid has viable and proper for culture mesenchymal stem cells.

Keywords: Stem cell; mesenchymal stromal cells; menstruation; menstrual cycle; immunophenotyping; cryopreservation.

1 INTRODUÇÃO

1 Introdução

Existe grande diversidade de células nos tecidos adultos, sendo que todas são originadas a partir de uma única célula indiferenciada após a fecundação do oócito com o espermatozóide. Esta célula se divide primeiramente formando células idênticas, e posteriormente se diferencia em diferentes grupos celulares que ao longo do desenvolvimento embrionário origina todos os tecidos.

No entanto, nos tecidos adultos ainda persistem células indiferenciadas com capacidade de se multiplicar e se diferenciar, participando do processo de regeneração e integridade dos tecidos. Estas são conhecidas como células-tronco adultas.

As células-tronco apresentam capacidade de formar qualquer tecido e, por este motivo, têm sido estudadas pelo eventual potencial terapêutico para diversas doenças. As iniciativas datam da década de 1960, quando foi anunciado o primeiro transplante de medula óssea bem sucedido, utilizando-se células-tronco originárias desta região^{1,2}. Atualmente sabe-se que as células-tronco podem ser procedentes de diferentes tecidos, com destaque para músculo estriado, tecido adiposo, cordão umbilical ou até de embriões.

Há ainda muitos desafios na obtenção, cultivo e propostas de novas terapias com o uso de células-tronco. Contudo, antes é importante compreender melhor a complexidade do estudo destas células ao longo dos anos.

1.1 História do estudo da célula

Com a invenção do microscópio em 1665 por Robert Hooke³, iniciou-se o desenvolvimento da Teoria Celular, quando a célula passou a ser entendida como unidade da vida. Em 1839, Theodor Schwann e Mathias Schleiden⁴ adicionaram à Teoria Celular o conceito Neonuclear; na qual cada célula tem todas as características essenciais à vida em seu núcleo. Mais do que isso, em 1855, o alemão Rudolph Virchow⁵ afirmou que todas as células são originárias de células (*omnis cellula e cellula*). Contudo, apenas em 1953, James Watson e Francis Crick⁶, conseguiram provar qual a real estrutura que carregava todas as informações genéticas de uma célula: o ácido desoxirribonucleico (DNA), que reside no núcleo da célula.

A maioria das células do ser humano adulto tem a capacidade de se multiplicar e formar novas células idênticas à original, esta capacidade reside no próprio DNA. Contudo, antes disso, estas células foram originárias de uma célula primordial, as chamadas células-tronco.

Em 1963, Becker, McCulloch e Till⁷ demonstraram a existência de células-tronco em tecido adulto, mais especificamente na medula óssea. Em seguida, em 1967, Cole e Edwards⁸ provaram pioneiramente a existência de células-tronco em estágio embrionário (células-tronco embrionárias). Em 1996, Campbel et al.⁹ demonstraram ser possível desenvolver indivíduos inteiros a partir de células-tronco: desenvolveram o primeiro clone de ovelha a partir de célula-tronco mamária.

Novas fontes de células-tronco foram descobertas. Caroline Gargett,

em 2006, identificou células-tronco no endométrio de ratas¹⁰, e logo após em endométrio humano¹¹, justificando a contínua renovação do endométrio mesmo após a menstruação, gestação ou trauma local. Apesar de se acreditar que estas células permaneciam apenas na camada basal do endométrio, que não é eliminada na menstruação, em 2008, Amit Patel¹² mostrou que existiam células-tronco também no sangue menstrual.

Como se pode observar, o estudo da célula-tronco não é recente, contudo ainda existem muitos mistérios. Apesar do anseio dos pesquisadores é preciso ter muita cautela e seguir sempre os princípios éticos em pesquisa.

1.2 Células-tronco

Por definição, as células-tronco são aquelas com capacidade de autorrenovação por divisão assimétrica, ou seja, capacidade de originar células diferentes da original. Além disso, pode se diferenciar em múltiplas linhagens celulares e capacidade de regeneração de tecidos¹³.

O aprimoramento no conhecimento dos métodos para o crescimento e diferenciação dessas células em cultura, possibilitou o desenvolvimento de pesquisas nessa área. Atualmente, podem-se dividir as células-tronco em dois grupos: as embrionárias e as derivadas de tecidos de adultos, como as isoladas de tecido adiposo, de músculo estriado, além do estroma da medula óssea e do sangue de cordão umbilical¹³.

Células-tronco embrionárias podem ser adquiridas preferencialmente

de células na fase de mórula ou da massa celular interna presente na fase de blastocisto¹⁴ (Figura 1).

Figura 1 - Células-tronco no desenvolvimento embrionário.

Na fase de gástrula ocorre a diferenciação em endoderme, mesoderme e ectoderme e, a partir de então, a diferenciação nos tecidos¹⁴.

As células-tronco embrionárias dividem-se indefinidamente e são capazes de permanecer em cultura na sua forma indiferenciada por longos períodos até que sejam fornecidos os estímulos para a diferenciação. Contudo, sua utilização terapêutica é limitada por questões

técnicas e éticas¹⁴.

Assim, as células-tronco derivadas de tecidos adultos são as mais pesquisadas e empregadas com a finalidade de substituição, reparo, ou incremento da função biológica de tecidos ou órgãos lesados¹⁵.

As células-tronco adultas podem ser divididas de acordo com a sua origem embrionária. Dos tecidos originários da ectoderme observam-se células-tronco nos dentes, epitélio mamário¹⁶, epiderme¹⁷, epitélio olfatório¹⁸, sistema nervoso periférico¹⁹ (células *crest* ou células-tronco neuronais) e até no cérebro adulto²⁰. O uso de células-tronco da epiderme na reconstituição de pele em queimados é promissor, apesar de não ter bom efeito funcional e cosmético por não reconstituir folículo piloso, glândulas sebáceas e sudoríparas¹⁷. Já se verificou também que o uso de células-tronco olfatórias pode restaurar algumas lesões da medula espinal permitindo a reabilitação da respiração e movimentação¹⁸.

Quanto aos tecidos originários da endoderme, pode-se encontrar células-tronco no fígado²¹, pâncreas²², trato gastrointestinal²³, pulmão²⁴, timo²⁵ e bexiga²⁶. Todas estas células ainda estão em estudo para possíveis usos terapêuticos.

Os tecidos derivados da mesoderme contêm células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas²⁷. Podem ser encontradas na medula óssea²⁸, músculo esquelético²⁹, ligamento cruzado³⁰, tecido adiposo³¹, rim³², sangue periférico³³, sangue do cordão umbilical³⁴, tubas uterinas³⁵ e mais recentemente no sangue menstrual¹².

1.3 Células-tronco mesenquimais

Dentre as células-tronco mesenquimais, as da medula óssea e do sangue de cordão umbilical são as mais estudadas e usadas em transplantes autólogos e alógenos^{13,15,36}. Nestes transplantes, é possível gerar os tecidos ósseo, cartilaginoso, neural e muscular a partir das células mesenquimais. Em menor quantidade, é possível produzir células do sangue a partir das células hematopoéticas³⁷. A biodisponibilidade de células-tronco mesenquimais diminui com o aumento da idade. A Figura 2 mostra os tipos de tecidos que podem ser originados das células-tronco mesenquimais.

Figura 2 - Tipos de linhagens celulares originárias das células-tronco mesenquimais. (Adaptado de Caplan AI.³⁸)

As células-tronco mesenquimais têm alta plasticidade, ou seja,

capacidade de formar células e tecidos de linhagens diferentes do tecido onde foram originadas^{39,40}. Podem ser utilizadas na engenharia de regeneração de tecidos como osso, cartilagem, medula, músculo, gordura, tendão, vascular, neuronal; terapia gênica e serem usadas com materiais sintéticos para próteses⁴¹.

A vantagem das células-tronco do fluido menstrual é a possibilidade de aquisição por métodos menos invasivos à paciente. Têm a capacidade de se diferenciar em linhagens dos tecidos condrogênico, adipogênico, osteogênico, neurogênico, endotelial, epitelial, hepático, pancreático e cardiomiócitos^{11,12, 42-47}.

1.4 Fluido menstrual e as células-tronco

Ao longo do ciclo menstrual ocorrem modificações no endométrio devido à ação hormonal. Logo após a menstruação, inicia-se a fase proliferativa, quando o estrogênio produzido pelos ovários se liga aos receptores de estrogênio do endométrio (REalfa), que ativam células-tronco endometriais estimulando a proliferação da camada funcional. Além disso, o estrogênio desenvolve as artérias espiraladas e aumenta os receptores para progesterona no endométrio. Na fase secretora, a progesterona produzida pelo corpo lúteo estimula a formação de glândulas no endométrio e acúmulo de glicogênio.

Quando não ocorre a fertilização, a queda hormonal aumenta a produção de prostaglandinas locais (PGF2alfa) que ocasiona constrição das artérias espiraladas, necrose e degradação da camada funcional do

endométrio e, então, a menstruação. A menstruação é composta de células sanguíneas predominantemente de origem arterial (apenas 25% é venosa), prostaglandinas, fibrinolisa e células endometriais, dentre elas, as células-tronco em menor quantidade. Mesmo nas pacientes com endométrio inativo, seja na pós-menopausa ou em uso de contraceptivos hormonais é possível observar a mesma constituição celular da camada funcional do endométrio, sem perda de clogenicidade das células-tronco^{48,49}.

Até os dias atuais os estudos com células-tronco do sangue menstrual utilizaram no máximo três doadoras e o número de células isoladas por amostra foi variável, mesmo com a coleta realizada no dia de maior fluxo menstrual. Contudo, estudos preliminares mostraram que, em relação às outras fontes de células-tronco mesenquimais, possui média menor de tempo de duplicação, maior potencial clonogênico em cultura e pode ser submetida a número maior de passagens de cultura sem entrar em senescência (Tabela 1)⁵⁰.

A senescência é definida pelo aumento da atividade da enzima beta-galactosidase, quando a célula diminui sua capacidade de diferenciação celular. Enquanto as células-tronco derivadas da medula óssea começam a entrar em senescência a partir da 7ª passagem em cultura, isto ocorre somente após a 26ª passagem nas derivadas do sangue menstrual. Estas características conferem alta biodisponibilidade destas células-tronco mesenquimais.

Tabela 1 - Comparação das características das células-tronco mesenquimais de diferentes fontes. (Adaptado de Rossignoli et al. 2013⁵⁰)

Tipo de célula	Fonte	Nº de células por amostra	Tempo de duplicação	Potencial clonogênico	Nº de passagens até senescência
CTM-MO	Aspirado de medula óssea	60-600 CTM em 1 mL de sangue ¹⁵	61,2h ⁵¹	3,9%	7 ⁵²
CTM-SP	Sangue periférico	1-13 CTM em 1 milhão de células mononucleares ⁵³	NA	NA	NA
CTM-D	Dente adulto	NA	30h ⁵⁴	NA	NA
CTM-CU	Cordão umbilical ao nascimento	5x10 ⁴ -5x10 ⁵ CTM em 1cm ³ de tecido de cordão umbilical ⁵⁵	24h ⁵⁶	NA	16 ⁵⁶
CTM-TA	Lipossucção, lipectomia, lipoplastia	5x10 ³ CTM em 1g de tecido ⁵³	45,2h ⁵¹	10% ⁵⁷	8 ⁵²
CTM-SM ⁵⁰	Sangue menstrual de 3 pacientes	Variável	27,6h	14,4%	26

CTM = células-tronco mesenquimais; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; D = dente; CU = cordão umbilical; TA = tecido adiposo; SM = sangue menstrual; NA = não avaliado.

As células obtidas de fluido menstrual foram testadas com sucesso em animais na regeneração de membros inferiores⁴³ e em acidente vascular cerebral⁴⁴. Hida et al.⁴⁷ demonstraram que transplante de células-tronco do sangue menstrual em miocárdio de ratos pós-infarto possibilitou a regeneração do miocárdio com restauro da função cardíaca. Em humanos, essas células provaram ser seguras quando transplantadas por via intravenosa e intratecal em quatro pacientes com esclerose múltipla sem que tenham sido relatados efeitos adversos⁵⁸.

1.5 Métodos de identificação das células-tronco

Um dos principais marcadores das células-tronco embrionárias é o *Oct4* (*Octamer-binding transcription factor 4*), uma proteína envolvida na autorrenovação das células-tronco embrionárias. Verificou-se que a ausência de expressão desta proteína implica na perda desta função e consequentemente na diferenciação da célula⁵⁹. Esta proteína também está relacionada à proliferação tumoral¹⁷. Outros marcadores foram identificados, como SSEA-4 (*stage-specific mouse embryonic antigen-4*), TRA 1-60 (podocalixina), GCTM-2, TRA1-81, SSEA-3, CD90, CD133 e CD117^{25, 60-62}.

As células-tronco mesenquimais adultas possuem os mesmos marcadores celulares mesmo em diferentes fontes (Tabela 2).

Tabela 2 - Marcadores de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes. (Adaptado de Rossignoli et al. 2013⁵⁰)

Marcadores	CD14	CD45	CD73	CD90	CD105	CD146	CD31	HLA-DR
CTM-MO ^{63,64}	-	-	+++	+++	+++	++	-	-
CTM-SP ⁶⁵	-	-	NA	+++	++	NA	-	-
CTM-D ⁵⁴	-	-	+++	+++	+++	NA	-	-
CTM-CU ^{63,66}	-	-	+++	+++	+++	NA	-	-
CTM-TA ^{63,66}	-	-	+++	+++	++	NA	-	-
CTM-SM ⁵⁰	-	-	+++	+++	++	+++	-	-

CTM = células-tronco mesenquimais; MO = medula óssea; SP = sangue periférico; D = dente; CU = cordão umbilical; TA = tecido adiposo; SM = sangue menstrual; NA = não avaliado.

É de extrema importância conhecer os marcadores das diversas células-tronco, para diferenciar, por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas das mesenquimais. A Tabela 3 resume os principais marcadores avaliados para identificar cada tipo de célula; em negrito os principais marcadores que diferenciam as células-tronco do sangue menstrual com os outros tipos celulares.

Tabela 3 - Comparação entre os diferentes marcadores de células-tronco. (Adaptado de Patel et al. 2008¹², Dominici et al. 2006⁶⁷ e Al-Nbaheen et al. 2013⁶⁸)

Células-tronco	Marcadores celulares
Embrionárias	<i>Oct 4</i> , SSEA-4, TRA 1-60. GCTM-2, TRA1-81, SSEA-3, CD90, CD133, CD117
Adultas Mesenquimais	SH2, SH3, SH4, CD73*, CD90, CD105
- Similar embrionárias	<i>Oct 4</i> , SSEA-4, CD133
- Sangue Menstrual ¹⁵	CD9, CD29, CD38, CD44, CD49f, CD90*, CD105*, CD117, CD146, CD166, LIN, MHC I, MHC II
- Marcador negativo	CD14*, CD19*, CD34*, CD45*, HLA-DR*
Adultas Hematopoiéticas	CD1, CD14, CD31, CD45*
Adultas endoteliais	CD45- *, CD34+ *, CD31+ *, CD133+ *
Fibroblastos	CD45- *, CD34- *, CD14- *, HLA-DR- *, CD105- *, CD73- *, CD90- *
*Principais marcadores para diferenciar as células mesenquimais, hematopoiéticas, endoteliais e fibroblastos.	

As células-tronco do sangue menstrual mantêm o potencial de diferenciação e apresentam alta capacidade proliferativa, a qual pode estar ligada aos marcadores de superfície das células embrionárias retidos nessas células, como por exemplo, CD133, SSEA-4 e Oct-4^{12, 43,}

Com base nas descrições acima, torna-se imperiosa a padronização de métodos, testes, processos e sistemas que tornem o uso das células-tronco derivadas do fluido menstrual uma realidade na medicina, sobretudo como uma opção de tratamento minimamente invasivo, associada a menores riscos à paciente e de ampla possibilidade terapêutica.

Considerando que a célula-tronco do sangue menstrual tem as mesmas propriedades de qualquer outra célula-tronco, supõe-se que tenham propriedades semelhantes de transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação. As células-tronco advindas do sangue menstrual apresentam algumas vantagens em relação às obtidas de outra forma, a saber: são adquiridas com facilidade sem necessidade de métodos invasivos, sem problemas éticos ou morais adicionais e têm a possibilidade da utilização autóloga.

Com base nas controvérsias acima relatadas, a presente investigação tem por objetivo analisar o processo de obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual: transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação; adaptado para as condições climáticas e para a mulher brasileira.

2 OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Geral

Obtenção de células-tronco mesenquimais do fluido menstrual.

2.2 Específicos

- 1) Padronizar as técnicas de coleta e transporte do fluido menstrual;
- 2) Caracterizar as células-tronco mesenquimais;
- 3) Isolar, cultivar, expandir e criopreservar as células-tronco mesenquimais;
- 4) Avaliar a disponibilidade das células-tronco mesenquimais no fluido menstrual antes e após o cultivo.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 Casuística e métodos

3.1 Tipo de Estudo

O modelo de estudo empregado na presente investigação trata-se de uma pesquisa laboratorial do tipo corte transversal, sendo desenvolvido na Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 Casuística

O período de seleção e de coleta dos materiais foi de agosto de 2011 a março de 2012. Inicialmente foram selecionadas, segundo os critérios de inclusão, 22 mulheres para a obtenção de fluido menstrual. Destas, 2 (9%) delas foram excluídas devido à: uma por solicitação de sair do estudo e outra foi afastada pelo pesquisador principal, por falta de seguimento. Assim, 20 voluntárias fizeram parte desta investigação (Figura 3) com idade compreendida entre 20 e 44 anos com média de $31,0 \pm 6,2$ anos.

As mulheres participantes do estudo foram selecionadas no Ambulatório Geral da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). A seleção das participantes foi realizada conforme os critérios de inclusão e não inclusão. Após a inclusão no estudo foram designadas como voluntárias.

Critérios de inclusão

- Idade 18 e 45 anos no período reprodutivo com vida sexual;
- Possuir ciclo menstrual regular;
- Entendimento das diferentes etapas no método de coleta após a instrução pelo pesquisador; tendo em vista o desenho do trabalho e para que não houvesse viés de coleta;
- Concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo1).

Critérios de Não inclusão

- Infecção ativa nas sorologias testadas: Citomegalovírus (CMV), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Vírus Linfotrópico da Célula Humana (HTLV) 1 e 2, Doença de Chagas, Sífilis, Hepatite B (dosagem dos anticorpos anti-Hbc, anti-Hbs e anti-Hbe) e Hepatite C;
- Colpocitologia oncológica com alterações típicas do Papilomavírus Humano (HPV) ou alterações celulares atípicas;
- Alterações uterinas que interfiram no ciclo menstrual;
- Histerectomia prévia.

Em relação à etnia, 18 (90%) eram brancas; 1 (5%) parda e 1 (5%) amarela. Nesta série, 14 (70%) eram nuligestas; 3 (15%) primíparas e 3 (15%) multíparas. Das voluntárias com filhos todas tiveram o parto cesáreo; três (15%) voluntárias abortaram, sendo que uma delas (5%)

necessitou de curetagem uterina. O índice de massa corpórea variou entre 18,4 e 27,2 Kg/m² (22,9±3,2 Kg/m²); 6 (30%) voluntárias tinham sobrepeso na ocasião da coleta. Nenhuma voluntária apresentava doenças metabólicas de relevância para o estudo, tais como diabetes melito ou disfunções tireoidianas.

Nenhuma voluntária fazia uso de terapia de reposição hormonal, anabolizantes ou moduladores seletivos de receptor de estrogênio. Quanto aos métodos contraceptivos, 7 (35%) utilizavam contraceptivo hormonal oral; 5 (25%) apenas métodos de barreira; 2 (10%) dispositivo intrauterino de cobre; 2 (10%) dispositivo intrauterino medicado com progestagênio; 1 (5%) fez laqueadura tubária bilateral e 3 (15%) não utilizavam métodos contraceptivos (Tabela 4).

A Tabela 4 apresenta as principais características do perfil das voluntárias.

ACHO- Anticoncepcional Hormonal Oral, DIU - Dispositivo intrauterino, LTB - Laqueadura Tubária Bilateral

Nenhuma voluntária apresentava doença uterina diagnosticada. Foi realizada ultrassonografia transvaginal previamente à coleta, entre o 12º e o 28º dia do ciclo, ou seja, na segunda fase do ciclo menstrual, onde foi constatado volume uterino médio de 86 ± 11 mL e espessura endometrial média de $6 \pm 2,8$ mm. A colpocitologia oncológica foi normal em todos os casos. Foi realizada a análise das seguintes sorologias: CMV, HIV, HTLV 1 e 2, Doença de Chagas, Sífilis, Hepatite B (dosagem dos anticorpos anti-Hbc, anti-Hbs e anti-Hbc) e Hepatite C (Tabela 5). Nenhuma voluntária estava com infecção ativa durante a coleta do fluido menstrual.

Tabela 5 - Análise dos resultados sorológicos das 20 voluntárias incluídas no estudo.

Sorologias	Porcentagem
Citomegalovírus IgG positivo e IgM negativo	10 (50%)
Toxoplasmose IgG positivo e IgM negativo	1 (5%)
Citomegalovírus e Toxoplasmose IgG positivo e IgM negativo	4 (20%)
Todas sorologias negativas	5 (25%)

3.3 Local do estudo

A seleção das voluntárias, orientações gerais sobre as diferentes fases do estudo, incluindo a coleta de fluido menstrual e exames subsidiários foram executados por profissionais da saúde da Divisão de

Clínica Ginecológica do HCFMUSP.

3.4 Coleta de fluido menstrual

A voluntária recebeu o dispositivo para coleta do fluido menstrual, sendo que o procedimento foi realizado pela própria voluntária no dia de maior fluxo menstrual. O material ficou acondicionado sob condições adequadas conforme orientações prévias até sua retirada pelo profissional contratado pelo Laboratório Cryopraxis; respeitando o tempo hábil para chegar ao laboratório em até 48 horas da coleta.

O processamento das células obtidas a partir das amostras de fluido menstrual foi realizado no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa Cryopraxis Criobiologia Ltda., Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário Autólogo localizado à Av. Carlos Chagas Filho, 791 - Pólo de Biotecnologia do Rio de Janeiro, RJ, CEP: 21941-904.

Figura 3 - Algoritmo do estudo

3.5 Descrição dos Procedimentos

3.5.1 Procedimento de Coleta e Acondicionamento

A voluntária coletou o fluido menstrual no dia de maior fluxo, como preconizado por Patel et al.¹⁵. Todos os espécimes biológicos foram transportados em embalagens compatíveis com a legislação vigente. O acondicionamento consistiu de um recipiente primário e uma embalagem secundária, ambos resistentes a vazamentos. A embalagem externa apresentava resistência e força adequadas ao uso pretendido. O acondicionamento também incluiu material absorvente em quantidade suficiente para coletar todo o conteúdo.

Para a obtenção do fluido menstrual foi fornecido, às voluntárias, um

conjunto completo para coleta, acondicionamento e transporte do fluido menstrual.

O referido conjunto era composto por:

1. Embalagem externa para transporte;
2. Frasqueira térmica de isopor contendo:
 - a) Um coletor específico de fluido menstrual (Figura 4);
 - b) Dispositivo reciclável para refrigeração (Gelox®), o qual deveria ser mantido no congelador até o momento de uso;
 - c) Frasco estéril contendo solução conservante antibacteriana;
 - d) Quatro lenços umedecidos para assepsia;
 - e) Duas pipetas Pasteur estéreis;
 - f) Duas embalagens plásticas com toalhas absorventes para acondicionamento;
 - g) Gaze estéril;
 - h) Manual de instrução de coleta e acondicionamento (Anexo 2);
 - i) Formulário de avaliação de coleta (Anexo 3).

Figura 4 – Dispositivo utilizado para coleta do fluido menstrual

A introdução do dispositivo é semelhante à do diafragma vaginal.

A coleta foi realizada a fresco para não afetar a obtenção de células-tronco com o dispositivo.

A coleta deveria ser feita no dia de maior fluxo menstrual da seguinte forma:

1. Remover o coletor de fluido menstrual da embalagem e lavar em água corrente com sabão neutro. Em seguida, secar com auxílio de toalha de papel;
2. Esvaziar a bexiga antes da coleta;
3. Promover a antissepsia da região vulvar com auxílio de sabão neutro;
4. Promover a limpeza dessa área com auxílio de lenços umedecidos em solução antisséptica, fazendo movimentos a partir da parte frontal até a região do reto, descartando em seguida o lenço umedecido;
5. Inserir o coletor de fluido menstrual, conforme apresentado na Figura 5:

Figura 5 – Instrução do uso do coletor de fluido menstrual

6. Manter o coletor de fluido menstrual no interior do canal vaginal durante três horas. Não foi recomendado que o mesmo permanecesse na vagina por mais de 3 horas;
7. Minutos antes da retirada do coletor, colocar sobre uma bancada limpa e seca o frasco estéril contendo solução conservante com antibióticos.
8. Preencher a etiqueta colada no frasco com nome, data e hora da coleta;
9. Promover a abertura da gaze estéril colocando-a sobre a bancada e abrir o frasco estéril, colocando a tampa voltada para cima sobre a gaze;
10. Decorridas as três horas da inserção do coletor, retirá-lo da vagina;
11. Sentar no vaso sanitário e, com auxílio dos dedos polegar e indicador, pinçar a base do coletor de fluido menstrual, permitindo a entrada de ar, facilitando a retirada;
12. Transferir cuidadosamente o conteúdo do coletor para o interior do frasco estéril;
13. Tampar o frasco e promover uma leve inversão do mesmo permitindo que o material coletado entrasse em contato com a solução conservante;
14. Envolver o frasco estéril no papel absorvente e o acondicionar na embalagem plástica contendo a inscrição de material biológico;
15. Transferir o material coletado para a frásqueira térmica contendo o gelo reciclado. Acondicionar o material até a entrega no laboratório

numa temperatura entre 1 e 24°C (idealmente entre 1 e 10°C). O frasco estéril contendo a amostra, uma vez acondicionado na frasqueira, não foi retirado da mesma.

16. Preencher o formulário de coleta e depositá-lo junto à frasqueira térmica na embalagem externa para transporte;
17. Entregar o material ao seu médico.
18. O material deve chegar ao laboratório em até 48 horas após a realização da coleta das amostras.

3.5.2 Procedimento de Transporte

O material foi transportado por colaborador do setor de transporte da Cryopraxis, devidamente treinado para esta atividade. Foi transportado por transporte terrestre (carro ou moto) até o Aeroporto; transporte aéreo da cidade de São Paulo (Brasil) até a cidade do Rio de Janeiro (Brasil) e então, por transporte terrestre, até o Centro de Processamento da Cryopraxis Criobiologia Ltda., em frasqueira térmica com registrador de temperatura e gelo reciclável, mantendo a temperatura entre 4°C e 24°C. O material foi processado em até quarenta e oito horas.

3.5.3 Procedimento de Recebimento do fluido menstrual coletado

O fluido menstrual foi considerado viável quando apresentava ausência ou pequena proliferação bacteriana em meio de cultivo celular com antibiótico; presença de células vivas e ausência de hemólise, coágulos ou muco que impedisse a análise.

1. A utilização de barreiras apropriadas e medidas de proteção individual foram importantes durante a manipulação das células menstruais na unidade de processamento. Todo o sangue e seus derivados foram manipulados cuidadosamente pois, são capazes de transmitir doenças infecciosas;
2. Ao ser recebido no laboratório de processamento, os frascos contendo o fluido menstrual foram retirados da embalagem de transporte, sendo registrados em formulário específico de identificação e recebimento de amostra;
3. Os técnicos conferiam o envio da documentação (ficha de coleta e TCLE), que foram enviados preenchidos pela voluntária. Em seguida, confrontaram este material com a identificação presente nos frascos contendo as amostras;
4. As amostras foram, então, destinadas aos procedimentos de separação, quantificação, caracterização, congelamento e criopreservação.

3.5.4 Processamento

Duas amostras de cada voluntária foram coletadas em ciclos menstruais diferentes: uma para análise por imunofenotipagem e outra para cultivo celular.

O processamento foi feito conforme a Figura 6.

Figura 6 -Etapas iniciais do processamento do fluido menstrual.

Primeiramente, o material foi processado em capela de fluxo laminar (Trox, Brasil) com solução de Ficoll-hypaque, que consiste de uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que se dissolve prontamente em solução aquosa. O frasco contendo a amostra foi centrifugado em centrífuga clínica (Cientec, Brasil) a 1200 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, na camada superior do tubo fica o plasma e seus constituintes solúveis; na interface as células mononucleares; em seguida o Ficoll e, após, os eritrócitos e granulócitos que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo. Do sobrenadante, foram retiradas alíquotas de 3 a 5 mL para inoculação de frascos de hemoculturas aeróbia e anaeróbia BacT/Alert®SA (bioMérieux, França) para análise de possíveis contaminações. O material mais denso que ficou no frasco foi chamado de *pellet*, que foi então acrescido soro fisiológico (Baxter, IL-USA). A amostra foi centrifugada novamente nos

mesmos parâmetros anteriores e o sobrenadante descartado. As amostras terminaram o processamento da seguinte forma:

- Amostra 1 (amostra da primeira coleta): Nas amostras cujo destino foi a análise imunofenotípica, o *pellet* foi ressuspenso em soro fisiológico (Baxter) com adição de 5% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone, MA-USA), para um volume final de 5,0 mL;
- Amostra 2 (amostra da segunda coleta): Nas amostras que foram destinadas ao cultivo celular, o *pellet* foi ressuspenso em 5,0 mL de meio mínimo essencial (MEM) ALPHA (LGC Biotecnologia, Brasil). Retirou-se uma alíquota para quantificação em câmara de Neubauer (Optik Labor, Germany) e teste de viabilidade pelo método de exclusão por azul de tripan (LGC Biotecnologia, Brasil).

3.5.5 Análise Imunofenotípica

As células foram analisadas por imunofenotipagem para a expressão dos seguintes marcadores conforme já padronizado pela literatura^{12,67,68}. (Tabela 6)

Tabela 6 - Marcadores pesquisados por imunofenotipagem.

População celular	Fenótipo
Células hematopoiéticas	CD45+
Células mesenquimais*	CD45- , CD34- , CD19- , CD14- , HLA- , DR- , CD105+ , CD73+ , CD90+
Células endoteliais	CD45- , CD34+ , CD31+ , CD133+
Fibroblastos	CD45-, CD34-, CD14-, HLA-DR-, CD105-, CD73-, CD90-
Nomenclatura adotada por Patel et al. 2008 ¹² , Dominici et al. 2006 ⁶⁷ e Al-Nbaheen et al. 2013 ⁶⁸	

As amostras frescas foram processadas fazendo a quantificação em hemocítômetro, separando $5,0 \times 10^5$ células por tubo a ser marcado. Os anticorpos foram colocados em cada tubo (diluídos conforme instruções do fabricante) e incubados por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz. As amostras foram lisadas com solução BD Lyse 1X (BD, USA) e incubadas por 15 minutos a 4°C ao abrigo da luz. O material foi, então, lavado em solução salina tamponada (DPBS)(LGC Biotecnologia, Brasil) e centrifugado a 400rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 300 µL de DPBS. A aquisição das imagens foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto (BD).

As amostras provenientes do cultivo foram quantificadas em hemocítômetro e centrifugadas a 400rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em solução de bloqueio (DPBS BSA 0,5%) por 15 minutos. As amostras foram filtradas em malha de 100 µm,

separando de $5,0 \times 10^5$ células por tubo a ser marcado. Os anticorpos foram colocados em cada tubo (diluídos conforme instruções do fabricante) e em solução de bloqueio, incubados por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz. As amostras foram lavadas em DPBS (LGC Biotecnologia, Brasil) e centrifugadas a 400rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 300 µL de DPBS.

3.5.6 Cultivo

As culturas de células foram mantidas em garrafas de 25cm² (Corning, USA) contendo meio mínimo essencial (MEM) ALPHA suplementado com L-Glutamina (LGC Biotecnologia, Brasil), soro fetal bovino (SFB) 20% (Hyclone), 100 U/mL penicilina/ 100 µg/mL estreptomicina (LGC Biotecnologia, Brasil) e 100U/mL Anfotericina B (Hyclone). As garrafas foram mantidas em estufa incubadora (Sanyo, Japão), sob atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Ao atingir semi-confluência, a cultura foi tripsinizada utilizando tripsina 0,25% (1X) (LGC Biotecnologia, Brasil) e feita passagem para uma nova garrafa (#1). No momento em que a cultura atingiu semi-confluência na passagem #1, as células foram novamente tripsinizadas e parte foi enviada para análise imunofenotípica nas mesmas condições citadas anteriormente e, a outra, foi colocada novamente em cultivo, para expansão e criopreservação.

3.5.7 Criopreservação

As células expandidas foram tripsinizadas e ressuspensas em solução de congelamento contendo 5% de dimetilsulfóxido (Origen Biomedical, TX-USA) e 95% de SFB. As amostras foram armazenadas em criotubos de 1,5 mL (Corning) em tanques de nitrogênio líquido (AirLiquide, França) a -196°C.

3.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística. Utilizaram-se os testes paramétricos Teste-t de Student e regressão linear global. Para comparar variáveis contínuas em dois grupos usou-se o índice de correlação de Pearson.

3.7 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 0248/11 (Anexo 4).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) foi assinado por todas as mulheres incluídas no presente estudo.

Para minimizar possíveis riscos de confidencialidade, somente a equipe do estudo teve acesso às pastas que continham identificadores

das participantes, como nome e endereço. Cada participante recebeu um número de identificação para ser usado no banco de dados.

Os instrumentos de coleta de dados foram mantidos sob posse do autor principal e, o banco de dados, mantido em meio digital, foi protegido por senha.

3.7.1 Riscos e Benefícios

Não se esperou que houvesse qualquer efeito adverso para a voluntária com a realização da coleta do fluido menstrual.

3.8 Patrocinador

Cryopraxis Criobiologia Ltda.

Especificações da empresa: A Cryopraxis Criobiologia Ltda. foi inaugurada em 2001 com o objetivo de realizar a coleta, o processamento, as análises, o cultivo, a criopreservação e o armazenamento de células e tecidos humanos, na prestação de serviço e na pesquisa. Possui Certificação ISO 9001:2000 e da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB) na área de prestação de serviços e pesquisa.

4 RESULTADOS

4 Resultados

Cada voluntária coletou duas amostras viáveis de fluido menstrual no dia de maior volume: uma foi enviada para imunofenotipagem e outra para cultivo das células. Duas (10%) voluntárias realizaram três coletas devido inviabilidade da amostra da primeira coleta.

Todo o procedimento de coleta do material transcorreu de forma adequada. Dezoito voluntárias (90%) coletaram o fluido menstrual no segundo dia de menstruação e 2 (10%) no terceiro dia (Tabela 2). Dezesesseis voluntárias responderam o questionário de avaliação do método de coleta. Os Gráficos 1, 2 e 3 ilustram a avaliação das voluntárias quanto à exequibilidade do procedimento de colocação e retirada do dispositivo, bem como dor ou incômodo do dispositivo de coleta durante o procedimento.

Gráfico 1 - Avaliação de aplicação do coletor

Gráfico 2 - Avaliação de retirada do coletor

Gráfico 3 - Avaliação de incômodo ou dor com o coletor

A Tabela 7 mostra o perfil do material obtido do fluido menstrual em cada coleta. Não houve diferença significativa entre a quantidade de células mesenquimais obtidas nas coletas 1 e 2 ($r = -0,22$). A Tabela 8 mostra o perfil microbiológico nas amostras.

Tabela 7 - Perfil do material obtido do fluido menstrual em cada coleta.

	1ª coleta min-máx (med)	2ª coleta min-máx (med)
Volume (mL)	1 - 17,5 (6,7±5,1)	1 – 25 (7,1±6,0)
Tempo até processamento (h)	10 – 24 (17,7±5,2)	10 – 24 (16,6±5,8)
Número de células mononucleares (x 10 ⁶)	0,81 – 17,0 (5,5±4,3)	0,25 - 9,0 (2,3±2,6)
Viabilidade das células (%)	27,9 - 94,1 (65,2±25,0)	24,0 – 100,0 (89,0±17,1)

Tabela 8 - Análise dos resultados microbiológicos das 40 amostras obtidas no estudo

Resultados microbiológicos das amostras	40 amostras
<i>Enterobacter sp</i> +	5,0%
<i>Enterococcus sp</i> +	17,5%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> +	2,5%
<i>Staphylococcus sp</i> +	2,5%
<i>Streptococcus sp</i> +	5,0%
Negativo	67,5%

Em relação ao transporte das amostras, o tempo decorrido desde a coleta até o processamento variou de 10 a 24 horas, com mediana de 18 (média de 17,20±5,50) horas. O volume coletado variou de 1,0 a 25,0mL, com mediana de 5 (média de 6,90±5,60) mL. O número de células totais das amostras variou de 0,25 a 17,0 x 10⁶, com mediana de 2,9 x 10⁶ (média de

$3,95 \times 10^6 \pm 3,88 \times 10^6$) células totais. O Anexo 5 mostra exemplo de análise imunofenotípica de amostra inicial.

Na análise somente das pacientes que não usavam métodos contraceptivos hormonais ou DIU, não houve diferença significativa dos parâmetros mencionados (Tabela 9).

Tabela 9 - Avaliação isolada das pacientes sem uso de hormônio.

	1	2	3	Comparação 1 x 2 *	Comparação 1 x 3 *
	Todas voluntárias	Voluntárias sem uso de hormônio	Voluntárias sem hormônio e sem DIU		
idade	31,0±6,2	32,0±6,8	32,7±7,4	P=0,586	P=0,499
IMC	22,9±3,2	22,5±3,3	22,3±3,2	P=0,698	P=0,675
Vol uterino	86±11	88,1±46,4	88,1±50,0	P=0,897	P=0,789
Espessura endometrial	6±2,8	7±5,0	6,7±4,5	P=0,178	P=0,632
Vol 1 ^a coleta	6,7±5,1	8±5,7	7±5,3	P=0,393	P=0,902
Tempo 1 ^a coleta	17,7±5,2	16,5±5,0	16,9±5,3	P=0,520	P=0,739
Cels totais 1 ^a coleta	5,5±4,3	5,7±4,1	6,4±4,3	P=0,882	P=0,676
Viabilidade 1 ^a coleta	65,2±25,0	65,6±32,4	68,8±34,7	P=0,965	P=0,779
Cels tronco iniciais	0,14±0,26	0,21±0,32	0,16±0,28	P=0,149	P=0,842
Vol 2 ^a coleta	7,1±6,0	6,6±5,0	7,0±5,2	P=0,853	P=0,994
Tempo 2 ^a coleta	16,6±5,8	16,5±5,7	16,4±5,2	P=0,978	P=0,957
Cels totais 2 ^a coleta	2,3±2,6	1,8±2,4	1,5±2,5	P=0,650	P=0,525
Viabilidade 2 ^a coleta	89,0±17,1	86,8±42,0	87,2±45,6	P=0,837	P=0,862
Cels tronco finais	96,19±2,14	96,34±39,01	96,25±32,15	P=0,869	P=0,952
* teste t student, bicaudal e não pareado. Vol=volume, Cels=célula.					

As células com perfil imunofenotípico de células mesenquimais foram obtidas nas amostras de todas as voluntárias. O número de células-tronco mesenquimais isoladas variou de 0,002 a $0,83 \times 10^6$, com mediana de $0,024 \times 10^6$ (média de $0,006 \times 10^6 \pm 0,010 \times 10^6$), que corresponde a 0,14% ($\pm 0,26$) do total de células. Em 2 (10%) amostras não foi possível avaliar a disponibilidade de células tronco mesenquimais na amostra inicial devido à turvação das mesmas, o que não impediu o cultivo celular bem sucedido.

Avaliou-se a existência de correlação linear entre o volume da amostra e o tempo até o processamento com número de células isoladas e viabilidade das células. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r) e consideradas relevantes correlações com $|r| > 0,5$. Os resultados referentes a cada coleta encontram-se na Tabela 10. A mesma análise foi realizada somente com as pacientes que não utilizavam métodos hormonais ou DIU e não evidenciou diferença significativa como se observa na Tabela 11.

Tabela 10 - Análise de correlação de todas as pacientes

	1ª coleta	2ª coleta
Idade e volume de fluxo	-0,062	-0,081
Idade e número de células	0,296	-0,049
Idade e viabilidade de células	0,067	0,229
Volume e número de células	-0,036	-0,075
Volume e viabilidade das células	-0,574 (r2=0,329)	0,32 (r2=0,102)
Tempo e número de células	-0,049	0,026
Tempo e viabilidade de células	-0,056	0,180
Número de células e viabilidade das células	-0,098	-0,161
Número de células e células mesenquimais	-0,367 (r2=0,134)	0,035

Tabela 11 - Análise de correlação das paciente sem hormônio ou DIU com diferentes parâmetros

	1ª coleta *	2ª coleta *
Idade e volume de fluxo	0,074	0,301
Idade e número de células	0,567 (r2=0,285)	0,235
Idade e viabilidade de células	-0,157	0,226
Volume e número de células	0,060	0,568 (r2=0,571 e p=0,110)
Volume e viabilidade das células	-0,708 (r2=0,015 e p=0,033)	0,382 (r2=0,222)
Tempo e número de células	0,483	0,495
Tempo e viabilidade de células	0,115	0,325
Número de células e viabilidade das células	-0,105	-0,035
Número de células e células mesenquimais	-0,700 (r2=0,221 e p=0,036)	-0,272
* teste de Pearson, com cálculo de r2 e p quando correlação > [0,5].		

Adicionalmente, também não foi encontrada correlação significativa entre:

- a idade e o total de células colhidas - coleta 1 + coleta 2 - (r = -0,250);
- a idade e a quantidade de células mesenquimais obtidas (r = -0,090);
- o total de células colhidas - coleta 1 + coleta 2 - e a quantidade de células mesenquimais obtidas (r = -0,22).

Ainda, não houve relação significativa entre o uso de contraceptivo hormonal e número de células mesenquimais isoladas antes (p=0,148) e após o cultivo (p=0,757), como também entre a espessura endometrial

mensurada pela ultrassonografia transvaginal entre os dias 12 e 28 do ciclo menstrual e número de células mesenquimais isoladas antes ($p=0,167$) e após o cultivo ($p=0,447$).

Entretanto, em relação ao volume de fluido menstrual coletado ser alto ($> 5\text{mL}$) ou baixo ($< 5\text{mL}$), observamos tendência a maior viabilidade de células na primeira coleta (86,7%) no grupo com menor volume, em relação à segunda coleta (54,5%) ($p = 0,069$).

Em relação ao cultivo, as culturas notamos, na primeira quinzena de cultivo, pequenos *clusters* de células com morfologia fibroblastóide (Figura 7A e 7B). Foi possível observar a presença de eritrócitos (seta branca) e células epiteliais (seta preta) remanescentes do processamento inicial do fluido menstrual (Figura 7A).

Figura 7A - Cinco dias de cultivo. Células fibroblastóides ao centro, hemácias (seta branca) e células epiteliais (seta preta).

Figura 7B - Nove dias de cultivo evidenciando a formação de um *cluster* de células (10X).

Já entre 15 e 21 dias de cultivo, os *clusters* formaram colônias (Figura 8A) que atingiram confluência na garrafa de cultivo (Figura 8B). É importante relatar a intensa acidificação do meio de cultivo.

Figura 8A - Dezenove dias de cultivo apresentando colônia em semi-confluência.

Figura 8B – Cultivo com 23 dias em confluência (10X).

Após a primeira passagem, as células tenderam a proliferar de forma mais homogênea e atingir confluência em cerca de 3 dias (Figura 9). A homogeneidade foi confirmada pela análise imunofenotípica, onde observaram-se 96,19% ($\pm 2,14$) de células com fenótipo mesenquimal. O Anexo 6 mostra um exemplo de análise imunofenotípica após a passagem de cultura 1 e, o Anexo 7, mostra um exemplo de análise imunofenotípica após passagem de cultura 2.

Figura 9 - Cultura com 1 dia após a passagem #1 em semi-confluência (10X).

Após a passagem #2, as culturas atingiram confluência (Figura 10) em cerca de 3 dias

Figura 10 - Cultivo com 1 dia após passagem #2 apresentou confluência (10X)

Após a passagem #2 de cultura, constatou-se que 96,19% ($\pm 2,14$) da alíquota analisada da amostra correspondiam a células-tronco mesenquimais. A Tabela 12 mostra a disponibilidade de células tronco nas amostras iniciais e após a cultura, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em todas as amostras.

Após o término da cultura, todas as células foram criopreservadas. Três (15%) amostras não puderam ser criopreservadas devido a contaminação fúngica.

Tabela 12 - Disponibilidade de células tronco nas amostras iniciais e após a cultura

Voluntárias	Células mesenquimais presentes na fração mononuclear inicial (%)	Células mesenquimais pós-cultivo (%)
1	0,06	91,91
2	0,83	**
3	0,017	97,00
4	0,003	98,40
5	0,14	97,12
6	0,047	99,60
7	0,0026	94,94
8	0,03	96,90
9	0,0086	97,24
10	0,032	96,51
11	0,009	97,00
12	*	95,10
13	0,006	**
14	0,019	97,93
15	*	96,02
16	0,094	95,99
17	0,371	97,92
18	0,024	94,09
19	0,002	91,58
20	0,823	**
Mediana	0,03	96,90
Média	0,14	96,19
Desvio padrão	0,26	2,14
* não avaliado devido turvação da amostra		
** não avaliado devido contaminação fúngica		

5 DISCUSSÃO

5 Discussão

A presença de células-tronco no endométrio já foi comprovada apresentando propriedade clonal de autorrenovação e capacidade multipotente de se diferenciar em citoqueratina, glândulas, células epiteliais respiratórias, cardiomiócitos, neuronais, musculares lisas, endoteliais, pancreáticas, hepáticas, adipócitos, condrócitos e osteoblastos⁶⁹⁻⁷¹.

A descoberta da presença de células-tronco no sangue data de 2008¹². A coleta foi realizada com coletor específico, o que no presente estudo foi demonstrado ser excelente método de coleta com baixo índice de desconforto à voluntária e fácil entendimento do método para coleta e acondicionamento por ela mesma. Notou-se que, eventualmente, a amostra pode ser contaminada inviabilizando o processamento das células; contudo, nas duas voluntárias em que isto ocorreu, a posterior coleta na menstruação subsequente transcorreu sem problemas de contaminação ou de outra ordem.

Tem-se preconizado que o tempo ideal entre a coleta e o processamento do material das amostras seja menor que 24 horas⁷². De fato, no presente estudo este foi o tempo máximo e foi comprovado ser um período seguro já que não inviabilizou as células. Além disso, em nosso estudo utilizou-se método de transporte viário e aéreo em todas as amostras também sem o comprometimento da viabilidade da amostra, o que demonstra ser método seguro de transporte.

A imunofenotipagem foi realizada de acordo com a expressão de marcadores específicos já identificados em estudos preliminares. Patel et al.¹² identificaram a população de células-tronco do sangue menstrual e a expressão dos marcadores de superfície celular embriológicos e intracelular multipotentes, como OCT-4⁷³, SSEA-4 e c-kit, juntamente com CD90, CD105 e CD166, que são marcadores de estroma celular. Foram negativos para CD34, CD45 e CD13, que são marcadores de células hematopoiéticas. Outros autores encontraram os mesmos resultados, contudo nossos dados não foram positivos para os marcadores c-kit e SSEA-4^{12,42,74}. Já são descritos novos marcadores como o W5C5⁷⁵.

Na presente investigação foram encontradas $0,024 \times 10^6$ ($0,002 - 0,83 \times 10^6$) células-tronco mesenquimais, que corresponde a 0,14% do total de células nas amostras do fluido menstrual. Após cultivo de passagem 3 foram identificadas, em cada amostra, média de 96,19% ($\pm 2,43$) de células-tronco mesenquimais.

A primeira passagem do cultivo durou de 15 a 21 dias até atingir o estágio de semiconfluência. A partir da segunda passagem, este tempo foi, em média, de 3 dias. Estes dados corroboram os da literatura^{12,72}.

Para garantir a presença das células-tronco em cultura, tem se utilizado a imortalização com hTERT (transcriptase reversa telomerase humana)⁴⁷. Contudo, apesar das vantagens, a imortalização da célula pode aumentar o seu potencial carcinogênico⁷⁶. Patel et al.¹² utilizaram o mesmo experimento de Hida⁴⁷, mas sem a imortalização das células e obteve os mesmo

resultados. Em nosso estudo também não empregamos o método de imortalização.

Não foram encontrados fatores que influenciam a biodisponibilidade das células-tronco no sangue menstrual. No presente estudo foi demonstrado que o uso de contraceptivos hormonais não interferiu na biodisponibilidade de células-tronco mesenquimais no fluido menstrual, o que está de acordo com os estudos que avaliaram esta biodisponibilidade em endométrios inativos, seja pelo período pós-menopausal ou pelo uso de contraceptivos hormonais^{48,77}.

A espessura endometrial mensurada por ultrassonografia entre os dias 12 e 28 do ciclo menstrual também não teve relação com a quantidade de células mesenquimais isoladas. De fato, a clogenicidade das células endometriais epiteliais e estromais não se altera ao longo do ciclo menstrual⁴⁸.

Houve maior tendência da viabilidade celular nas amostras com menor volume, mas sem significado estatístico. Entretanto, estudos com tamanho amostral maior são necessários para avaliar melhor estas e outras correlações, como variações hormonais por exemplo.

Recentemente, comprovou-se que o potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais provenientes do fluido menstrual é semelhante ou até superior ao das provenientes de outras fontes como o tecido adiposo e a medula óssea. Todas podem se diferenciar em células neuronais em cultura com estímulo adequado para esta indução. Observou-se que células provenientes do fluido menstrual necessitavam de estímulo adicional com

ácido retinóico para esta diferenciação. Assim, produzia nível basal significativo de síntese de fator neurotrófico derivado do cérebro, conferindo excelente alternativa para o estudo de reparo de tecido nervoso⁷⁸.

Comparado ao sangue de cordão umbilical, o fluido menstrual oferece uma janela mais ampla de obtenção embora não tenha a diversidade de aplicações em gerar células hematopoiéticas como o primeiro, uma vez que a quantidade de células CD34+ é pequena¹².

Dois estudos^{50,79} provaram que as células-tronco do sangue menstrual também podem ser reprogramadas a retornar ao estágio de célula pluripotencial pela indução com doxiciclina lentiviral no Oct4 e SOX2. As células resultantes expressaram as mesmas características das células-tronco embrionárias e eram capazes de se diferenciar nos três folhetos embrionários in vitro e in vivo.

Rossignoli et al.⁵⁰ isolaram células-tronco do sangue menstrual, utilizando método semelhante ao do presente estudo, em três voluntárias. Realizaram modificação genética bem sucedida destas células com vetor retroviral formador de proteína verde fluorescente, o pMIGR1 (*bicistronic murine stem cell virus-derived retroviral Vector*).

O uso de células-tronco do sangue menstrual já é objeto de estudo para diversas terapias. O seu emprego no tratamento de regeneração de células nervosas pós-acidente vascular cerebral tem bons resultados preliminares em modelos experimentais in vitro⁸⁰. Ainda, o uso de nanopartículas na diferenciação de células-tronco mesenquimais é promissor, como já realizado na diferenciação em células neuronais⁸¹.

O estudo de regeneração de tecidos em Ginecologia ainda é recente. Damous et al.⁸² provaram ser possível o transplante de ovário melhorando a função ovariana; observaram haver mudanças no endométrio, miométrio e vagina induzidas pelo estrogênio. Mais recentemente, Sun et al.⁸³ demonstraram a possibilidade da melhora da função ovariana com uso de células-tronco. Induziram a falência ovariana em ratos por quimioterapia com ciclofosfamida e após o transplante de células-tronco derivadas de adipócitos notaram aumento de quantidade de folículos ovarianos em diferentes estágios e elevação da taxa de ovulação significativamente. Após análise por microscopia e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, verificou-se que estas células-tronco não eram responsáveis pela formação direta dos folículos, mas induzia à maturação de folículos já existentes.

Em uroginecologia, ainda há a necessidade de uma terapia para regeneração dos tecidos periuretrais na incontinência urinária de esforço por deficiência esfinteriana intrínseca. Modelos animais já mostraram haver aumento na espessura da musculatura periuretral com o uso de fisioterapia com eletroestimulação⁸⁴. O uso de células-tronco com esta finalidade é recente⁸⁵. Em modelos animais já foi demonstrado o uso de células-tronco da medula óssea⁸⁶, músculo esquelético⁸⁷, adipócitos⁸⁸ e ainda da urina combinada com células endoteliais da veia umbilical⁸⁹ para regeneração do esfíncter da uretra com bons resultados histomorfológicos e funcionais⁹⁰. A recente descoberta de nanogel pode facilitar o monitoramento das células mesenquimais injetadas *in vivo*⁹¹. Já foram utilizadas também células-tronco

da medula óssea na confecção de *slings* com malha de seda para tratamento da incontinência urinária⁹².

Em humanos, células-tronco derivadas do músculo esquelético foram empregadas para regenerar o rabinioesfincter da uretra de mulheres com incontinência urinária por injeção direta guiada por endoscopia às 9, 12 e 3 horas. O seguimento de dois anos demonstrou 75% de melhora dos sintomas de incontinência⁹³. Células-tronco do fluido amniótico⁹⁴ e do sangue do cordão umbilical⁹⁵ também são alternativa de tratamento.

Ainda não há estudos utilizando células-tronco do fluido menstrual nas terapias em Ginecologia, mas seu uso parece ser promissor. Podem ser facilmente obtidas sem métodos invasivos, podendo se constituir em alternativa terapêutica em relação às células-tronco extraídas de outras fontes, como medula óssea por exemplo.

Além do método de coleta ser simples e não invasivo e do excelente potencial de diferenciação⁹⁶, as células-tronco isoladas do fluido menstrual agregam a possibilidade da utilização autóloga, o que se traduz em maior praticidade e, sobretudo, segurança para a paciente. O emprego de células-tronco autólogas possibilita eliminar as questões de compatibilidade e, conseqüentemente, da necessidade de se realizar imunossupressão, além da redução do risco de transmissão de doenças⁹⁷.

6 CONCLUSÕES

6 Conclusões

- As células-tronco mesenquimais do fluido menstrual podem ser obtidas sem métodos invasivos.
- O fluido menstrual pode ser transportado em condições adequadas de temperatura até 24 horas após a coleta.
- As células tronco mesenquimais podem ser caracterizadas por imunofenotipagem, isoladas, cultivadas e expandidas e, em seguida, criopreservadas.
- O fluido menstrual contém células tronco mesenquimais viáveis e apropriadas para cultivo.

7 REFERÊNCIAS

7 Referências

1. Cline MJ, Gale RP, Stiehm ER, Opelz G, Young LS, Feig SA, Fahey JL. Bone marrow transplantation in man. *Ann Intern Med.* 1975 Nov;83(5):691-708.
2. Good RA, Kapoor N, Reisner Y. Bone marrow transplantation--an expanding approach to treatment of many diseases. *Cell Immunol.* 1983 Nov;82(1):36-54.
3. Gest H. Homage to Robert Hooke (1635-1703): new insights from the recently discovered Hooke Folio. *Perspect Biol Med.* 2009 Summer;52(3):392-9.
4. Vasil IK. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Rep.* 2008 Sep;27(9):1423-40. Epub 2008 Jul 9.
5. Haas LF. Rudolph Ludwig Carl Virchow (1821-1902). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996 Dec;61(6):578.
6. Watson JD, Crick FH. The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1953;18:123-31.
7. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* 1963 Feb 2;197:452-4.
8. Edwards RG. An astonishing journey into reproductive genetics since the 1950's. *Reprod Nutr Dev.* 2005 May-Jun;45(3):299-306.
9. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* 1996 Mar 7;380(6569):64-6.
10. Gargett CE. Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006 Jun;46(3):250-3.
11. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* 2007. 22:2903-2911.

12. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*. 2008;17(3):303-11. Erratum in: *Cell Transplant*. 2008;17(7):875. *Cell Transplant*. 2008;17(6):721.
13. Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 44(10):621-6.
14. Landry DW, Zucker HA. Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1184-6.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
16. Smith GH, Boulanger CA. Mammary stem cell repertoire: new insights in aging epithelial populations. *Mech Ageing Dev*. 2002 Sep;123(11):1505-19.
17. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation*. 2000 Dec 15;70(11):1588-98.
18. Li Y, Decherchi P, Raisman G. Transplantation of olfactory ensheathing cells into spinal cord lesions restores breathing and climbing. *J Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):727-31.
19. Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*. 2002 Aug 15;35(4):657-69.
20. Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev*. 1996 Dec 15;10(24):3129-40.
21. Dabeva MD, Shafritz DA. Hepatic stem cells and liver repopulation.

- Semin Liver Dis.* 2003 Nov;23(4):349-62.
22. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 2002 May;129(10):2447-57.
 23. Williams ED, Lowes AP, Williams D, Williams GT. A stem cell niche theory of intestinal crypt maintenance based on a study of somatic mutation in colonic mucosa. *Am J Pathol.* 1992 Oct;141(4):773-6.
 24. Inayama Y, Hook GE, Brody AR, Jetten AM, Gray T, Mahler J, Nettesheim P. In vitro and in vivo growth and differentiation of clones of tracheal basal cells. *Am J Pathol.* 1989 Mar;134(3):539-49.
 25. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001 Oct;19(10):971-4.
 26. Atala A. Tissue engineering in urologic surgery. *Urol Clin North Am.* 1998 Feb;25(1):39-50.
 27. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.
 28. McCulloch EA, Till JE. Regulatory mechanisms acting on hemopoietic stem cells. Some clinical implications. *Am J Pathol.* 1971 Dec;65(3):601-19.
 29. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem.* 2002 May;50(5):589-610.
 30. Cheng MT, Yang HW, Chen TH, Lee OK. Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments. *Cell Prolif.* 2009 Aug;42(4):448-60. Epub 2009 May 29. Erratum in: *Cell Prolif.* 2009 Aug;42(4):569.
 31. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101-9.
 32. Herzlinger D. Renal stem cells and the lineage of the nephron. *Annu*

Rev Physiol. 1994;56:671-89.

33. Lasky LC. Collection, storage, and use of hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Hum Pathol.* 1983 Mar;14(3):248-50.
34. Thierry D, Traineau R, Adam M, Delachaux V, Brossard Y, Richard P, Gerotta A, Devergie A, Benbunan M, Gluckman E. Hematopoietic stem cell potential from umbilical cord blood. *Nouv Rev Fr Hematol.* 1990;32(6):439-40.
35. Jazedje T, Perin PM, Czeresnia CE, Maluf M, Halpern S, Secco M, Bueno DF, Vieira NM, Zucconi E, Zatz M. Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. *J Transl Med.* 2009 Jun 18;7:46.
36. Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med.* 2004. 351:2265-2275.
37. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kuter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* 2006. 24:1294–1301.
38. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells - Handbook of Stem Cells. Volume 2, 2004; 300.
39. Aghayan HR, Goodarzi P, Arjmand B. GMP-Compliant Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Cellular Therapy. *Methods Mol Biol.* 2014 Aug 20. [Epub ahead of print]
40. Arany PR, Huang GX, Gadish O, Feliz J, Weaver JC, Kim J, Yuen WW, Mooney DJ. Multi-lineage MSC Differentiation via Engineered Morphogen Fields. *J Dent Res.* 2014 Aug 20. [Epub ahead of print]
41. Hanson S, D'Souza RN, Hematti P. Biomaterial-mesenchymal stem cell constructs for immunomodulation in composite tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2014. Aug;20(15-16):2162-8.
42. Prianishnikov VA On the concept of stem cell and a model of functionalmorphological structure of the endometrium. *Contraception.* . 1978. 18:213-223.

43. Murphy MP, Wang H, Patel AN, Kambhampati S, Angle N, Chan K, Marleau AM, Pyszniak A, Carrier E, Ichim TE and Riordan NH. Allogeneic endometrial regenerative cells: An "Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *Journal of Translational Medicine*. 2008, 6 :45 -53.
44. Borlongan CV, Kaneko Y, Mina Maki M, Yu S-J, Ali M, Allickson JG, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, and Sanberg PR. Menstrual Blood Cells Display Stem Cell-Like Phenotypic Markers and Exert Neuroprotection Following Transplantation in Experimental Stroke. *Stem Cells and Development*. 2010 . 19(4): 439- 451.
45. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B, Riordan NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 2007. 15;5:57.
46. Man-Jing Zhang , Bin Liu , Wei Xia , Zhi-Yong Sun, Kai-Hua Lu. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? *Medical Hypotheses*. 2009. 72: 252–254.
47. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood derived mesenchymal cells. *Stem Cells*. 2008. 26:1695-1704.
48. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84 Suppl 2:1124-30.
49. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2010 Nov;16 (11):818-34. Epub 2010 Jul 13.
50. Rossignoli F, Caselli A, Grisendi G, Piccinno S, Burns JS, Murgia A, Veronesi E, Loschi P, Masini C, Conte P, Paolucci P, Horwiz EM, Dominici M. Isolation, characterization, and transduction of endometrial decidual tissue multipotent mesenchymal stromal/stem cells from menstrual blood. *Biomed Res Int*. 2013;2013:901821:1-14.

51. Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):761-73.
52. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter 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.
53. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011 May 14;9:12.
54. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, Hockema JJ, Woods EJ, Goebel WS. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng Part C Methods.* 2008 Jun;14(2):149-56.
55. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, Evron JM, Peault B, Deasy BM. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:789526.
56. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* 2006 Aug;91(8):1017-26.
57. Bieback K, Hecker A, Schlechter T, Hofmann I, Brousos N, Redmer T, Besser D, Klüter H, Müller AM, Becker M. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy.* 2012 May;14(5):570-83.
58. Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, Riordan NH, Wang H, Min WP, Woods EJ, Reid M, Mansilla E, Marin GH, Drago H, Murphy MP, Minev B.

- Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med.* 2009. 7:15- 22.
59. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbuttel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW. POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2244-50.
 60. Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, Bello PA, Benvenisty N, Berry LS, Bevan S, Blum B, Brooking J, Chen KG, Choo AB, Churchill GA, Corbel M, Damjanov I, Draper JS, Dvorak P, Emanuelsson K, Fleck RA, Ford A, Gertow K, Gertsenstein M, Gokhale PJ, Hamilton RS, Hampl A, Healy LE, Hovatta O, Hyllner J, Imreh MP, Itskovitz-Eldor J, Jackson J, Johnson JL, Jones M, Kee K, King BL, Knowles BB, Lako M, Lebrin F, Mallon BS, Manning D, Mayshar Y, McKay RD, Michalska AE, Mikkola M, Mileikovsky M, Minger SL, Moore HD, Mummery CL, Nagy A, Nakatsuji N, O'Brien CM, Oh SK, Olsson C, Otonkoski T, Park KY, Passier R, Patel H, Patel M, Pedersen R, Pera MF, Piekarczyk MS, Pera RA, Reubinoff BE, Robins AJ, Rossant J, Rugg-Gunn P, Schulz TC, Semb H, Sherrer ES, Siemen H, Stacey GN, Stojkovic M, Suemori H, Szatkiewicz J, Turetsky T, Tuuri T, van den Brink S, Vintersten K, Vuoristo S, Ward D, Weaver TA, Young LA, Zhang W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007 Jul;25(7):803-16.
 61. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. Erratum in: *Science.* 1998 Dec 4;282(5395):1827.
 62. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.

- Nat Biotechnol.* 2000 Apr;18(4):399-404. Erratum in: *Nat Biotechnol.* 2000 May;18(5):559.
63. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol.* 2008 May;36(5):642-54.
 64. Campioni D, Moretti S, Ferrari L, Punturieri M, Castoldi GL, Lanza F. Immunophenotypic heterogeneity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from patients with hematologic disorders: correlation with bone marrow microenvironment. *Haematologica.* 2006 Mar;91(3):364-8.
 65. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May;37(10):967-76.
 66. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005 Nov;33(11):1402-16.
 67. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
 68. Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, Prigione A, Adjaye J, Kassem M, Aldahmash A. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev.* 2013 Feb;9(1):32-43.

69. Huard J., Yokoyama T., Pruchnic R., Qu Z., Li Y., Lee J.Y., Somogyi G.T., Groat W.C., Chancellor M.B. Muscle-derived cell-mediated ex vivo gene therapy for urological dysfunction. *Gene Therapy*. 2002. (23):1617-26.
70. Lin J, Xiang D, Zhang JL, Allickson J, Xiang C. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011 May;12(5):372-80.
71. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B, Riordan NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*. 2007 Nov 15;5:57.
72. Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, Borlongan CV, Sanberg PR. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J*. 2011;3(2011):4-10.
73. Matthai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, Radjabi A, van Trotsenburg M, Huber J, Kolbus A. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2006 Jan;12(1):7-10.
74. Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*. 2011;5(Suppl 2):253-60.
75. Masuda H, Anwar SS, Bühring HJ, Rao JR, Gargett CE. A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant*. 2012;21(10):2201-14.
76. Lü MH, Liao ZL, Zhao XY, Fan YH, Lin XL, Fang DC, Guo H, Yang SM. hTERT-based therapy: a universal anticancer approach (Review). *Oncol Rep*. 2012 Dec;28(6):1945-52.
77. Gargett CE, Nguyen HP, Ye L. Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012 Dec;13(4):235-51.
78. Zemel'ko VI, Kozhukharova IB, Alekseenko LL, Domnina AP, Reshetnikova GF, Puzanov MV, Dmitrieva RI, Grinchuk TM, Nikol'skiĭ

- NN, Anisimov SV. Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and endometrium: a comparative study. *Tsitologiya*. 2013;55(2):101-10.
79. Li Y, Li X, Zhao H, Feng R, Zhang X, Tai D, An G, Wen J, Tan J. Efficient induction of pluripotent stem cells from menstrual blood. *Stem Cells Dev*. 2013 Apr 1;22(7):1147-58.
 80. Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M, Yu SJ, Ali M, Allickson JG, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*. 2010 Apr;19(4):439-52.
 81. Kim TH, Lee KB, Choi JW. 3D graphene oxide-encapsulated gold nanoparticles to detect neural stem cell differentiation. *Biomaterials*. 2013 Nov;34(34):8660-70.
 82. Damous LL, da Silva SM, Simões Rdos S, Sakano CR, Simões Mde J, Montero EF. Indirect evaluation of estrogenic activity post heterotopic ovarian autograft in rats. *Acta Cir Bras*. 2008 Jul-Aug;23(4):372-7.
 83. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther*. 2013 Jul 9;4(4):80.
 84. Camargo AL, Salerno GR, Gomes RC, Simões RS, Castro Rde A, Girão MJ. Morphological aspects of the urethra in female rats after electrical stimulation of the pelvic floor. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2013 Apr;35(4):159-63.
 85. Hart ML, Neumayer KM, Vaegler M, Daum L, Amend B, Sievert KD, Di Giovanni S, Kraushaar U, Guenther E, Stenzl A, Aicher WK. Cell-Based Therapy for the Deficient Urinary Sphincter. *Curr Urol Rep*. 2013 Oct;14(5):476-87.
 86. Corcos J, Loutochin O, Campeau L, Eliopoulos N, Bouchentouf M, Blok B, Galipeau J. Bone marrow mesenchymal stromal cell therapy for external urethral sphincter restoration in a rat model of stress

- urinary incontinence. *Neurourol Urodyn*. 2011 Mar;30(3):447-55.
87. Furuta A, Carr LK, Yoshimura N, Chancellor MB. Advances in the understanding of stress urinary incontinence and the promise of stem-cell therapy. *Rev Urol*. 2007 Summer;9(3):106-12.
 88. Lin G, Wang G, Banie L, Ning H, Shindel AW, Fandel TM, Lue TF, Lin CS. Treatment of stress urinary incontinence with adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2010;12(1):88-95.
 89. Wu S, Wang Z, Bharadwaj S, Hodges SJ, Atala A, Zhang Y. Implantation of autologous urine derived stem cells expressing vascular endothelial growth factor for potential use in genitourinary reconstruction. *J Urol*. 2011 Aug;186(2):640-7.
 90. Du XW, Wu HL, Zhu YF, Hu JB, Jin F, Lv RP, Sun S, Wang HY, Xu JW. Experimental study of therapy of bone marrow mesenchymal stem cells or muscle-like cells/calcium alginate composite gel for the treatment of stress urinary incontinence. *Neurourol Urodyn*. 2013 Mar;32(3):281-6.
 91. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park KH. Poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanogels for tracing and delivering genes to human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2013 Nov;34(34):8819-34.
 92. Zou XH, Zhi YL, Chen X, Jin HM, Wang LL, Jiang YZ, Yin Z, Ouyang HW. Mesenchymal stem cell seeded knitted silk sling for the treatment of stress urinary incontinence. *Biomaterials*. 2010 Jun;31(18):4872-9.
 93. Stangel-Wojcikiewicz K, Jarocha D, Piwowar M, Jach R, Uhl T, Basta A, Majka M. Autologous Muscle-Derived Cells for the Treatment of Female Stress Urinary Incontinence: A 2-Year Follow-Up of a Polish Investigation. *Neurourol Urodyn*. 2014 Mar;33(3):324-30.
 94. Chun SY, Cho DH, Chae SY, Choi KH, Lim HJ, Yoon GS, Kim BS, Kim BW, Yoo JJ, Kwon TG. Human amniotic fluid stem cell-derived muscle progenitor cell therapy for stress urinary incontinence. *J Korean Med Sci*. 2012 Nov;27(11):1300-7.
 95. Lee CN, Jang JB, Kim JY, Koh C, Baek JY, Lee KJ. Human cord

- blood stem cell therapy for treatment of stress urinary incontinence. *J Korean Med Sci.* 2010 Jun;25(6):813-6.
96. Khanmohammadi M, Khanjani S, Bakhtyari MS, Zarnani AH, Edalatkhah H, Akhondi MM, Mirzadegan E, Kamali K, Alimoghadam K, Kazemnejad S. Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. *Int J Hematol.* 2012 May;95(5):484-93.
97. Zhang MJ, Liu B, Xia W, Sun ZY, Lu KH. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? *Medical Hypotheses.* 2009. 72: 252–254.

8 ANEXOS

8 Anexos

Anexo 1 - Termo de Consentimento livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- 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 (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: OBTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO FLUIDO MENSTRUAL -
TRANSPORTE, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, EXPANSÃO E
CRIOPRESERVAÇÃO.

PESQUISADOR : Jorge Milhem Haddad

CARGO/FUNÇÃO: .Médico.assistente Ginecologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONALN. 60121

UNIDADE DO HCFMUSP: Disciplina de Ginecologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo (essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária)

O objetivo deste estudo para o qual está sendo solicitada a coleta do seu fluido menstrual é a padronização de técnicas para obtenção de células-tronco a partir do sangue menstrual.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados

- Serão colhidas sorologias de uma veia do seu braço para realizar sorologias para as seguintes doenças : Citomegalovírus, HIV, HTLV, Doença de Chagas, Sífilis, Hepatite B e C.

- Para a coleta do seu sangue menstrual em um dos três primeiros dias da menstruação (no dia de maior fluxo menstrual) serão fornecidos todo o material e ele deve ser colhido seguindo-se estas etapas descritas abaixo:

- a. Remover o coletor de fluido menstrual da embalagem e lavar em água corrente com sabão neutro. Em seguida, secar com auxílio de toalha de papel;
- b. Recomenda-se esvaziar a bexiga antes da coleta;
- c. Promover a assepsia da região vulvar com auxílio de sabão neutro;
- d. Promover a limpeza dessa área com auxílio de lenços umedecidos em solução antisséptica, fazendo movimentos a partir da parte frontal até a região do reto, descartando em seguida o lenço umedecido;
- e. Inserir o coletor de fluido menstrual na vagina segundo a instrução abaixo:

Pressionar o coletor conforme a figura ao lado, dobrando-o ao meio.

Segurar firmemente o coletor entre os dedos polegar e indicador, conforme a figura ao lado

Relaxar os músculos vaginais, separar os grandes lábios com a mão livre e, em seguida, inserir o coletor no canal vaginal.

- f. O coletor de fluido menstrual deve ser mantido no interior do canal vaginal de uma a três horas, no máximo. Não sendo recomendado que o mesmo permaneça na vagina por mais de 3 horas;
- g. Decorridas 1 a 3 horas da inserção do coletor, o mesmo deve ser retirado; Inicialmente deve-se colocar sobre uma bancada limpa e seca, o frasco estéril nº1 contendo solução conservante/antibióticos. O mesmo deve ser identificado com a identificação nominal da participante do estudo, data e hora da coleta.
- h. Promover a abertura da gaze estéril colocando-a sobre a bancada e abrir o frasco estéril colocando a tampa voltada para cima, sobre a gaze;
- i. Sentar no vaso sanitário e, com auxílio dos dedos polegar e indicador, pinçar a base do coletor de fluido menstrual, permitindo a entrada de ar, facilitando a retirada;
- j. Verter o conteúdo presente no coletor cuidadosamente para o interior do frasco estéril, sem encostar o coletor na borda do frasco coletor. Tampar o frasco e promover uma leve inversão do mesmo permitindo que o material coletado entre em contato com a solução conservante/antibiótico;
- k. Envolver o frasco estéril no papel absorvente e acondicioná-lo na embalagem plástica contendo a inscrição de material biológico, colocando-o na frasqueira térmica contendo o gelo reciclado (congelado previamente à coleta). Recomenda-se acondicionamento até a entrega no laboratório numa temperatura entre 1 e 24°C (idealmente entre 1 e 10°C). O frasco estéril contendo a amostra, uma vez acondicionado na frasqueira, não deve ser retirado da mesma.
- l. Todo procedimento acima descrito deve ser repetido para que seja realizada uma segunda coleta e o armazenamento da mesma.
- m. A participante deve preencher o formulário de coleta e depositá-lo junto a frasqueira térmica na embalagem externa para transporte;
- n. Entregar o material ao seu médico;
- o. No ato da entrega será colhida uma amostra do sangue periférico por punção venosa, para a realização dos exames sorológicos;

ados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

3- Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 2:

Você terá o desconforto de sentir uma picada no momento da coleta da sorologia e você pode ter desconforto na colocação e retirada do coletor de fluido menstrual.

4 – Benefícios para o participante Você poderá colaborar com estudo que busca obter células-tronco para tratamento de doenças de uma forma mais prática. Você não terá um benefício imediato.

5 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Você poderá ter benefícios futuros com o desenvolvimento deste estudo podendo quando necessário obter células-tronco do seu sangue menstrual, se o estudo mostrar que é possível.

6 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr Jorge Milhem Haddad, que pode ser encontrado no endereço do Hospital das Clínicas, Rua Doutor Enéias de Carvalho Aguiar, 255 10o andar do Instituto Central do HCFMUSP. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7 – Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

8 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

9– a senhora será informada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

10 – Não haverão despesas pessoais para a senhora em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

11 – O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo.

Eu discuti com o Dr. Jorge Milhem Haddad. sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Anexo 2 - Manual de instrução de coleta e acondicionamento.**Manual de instrução de coleta e acondicionamento**

- 1) No primeiro dia de sua menstruação ligue para:
 - a. Dra Lilian Fiorelli – 98162273 ou
 - b. Dr Jorge Haddad – 9431333

- 2) Você receberá as orientações do melhor dia para a coleta. Informe o endereço a ser retirado.

- 3) __A introdução do dispositivo é semelhante ao diafragma vaginal e será descrita a seguir. A coleta é realizada a fresco para não afetar a obtenção de células-tronco com o dispositivo, Para a realização da coleta a participante deve proceder da seguinte forma:
 1. Remover o coletor de fluido menstrual da embalagem e lavar em água corrente com sabão neutro. Em seguida, secar com auxílio de toalha de papel;
 2. Recomenda-se esvaziar a bexiga antes da coleta;
 3. Promover a assepsia da região vulvar com auxílio de sabão neutro;
 4. Promover a limpeza dessa área com auxílio de lenços umedecidos em solução anti-séptica, fazendo movimentos a partir da parte frontal até a região do reto, descartando em seguida o lenço umedecido;
 5. Inserir o coletor de fluido menstrual na vagina segundo a instrução abaixo:

Pressionar o coletor conforme a figura ao lado, dobrando-o ao meio.
Segurar firmemente o coletor entre os dedos polegar e indicador, conforme a figura ao lado
Relaxar os músculos vaginais, separar os grandes lábios com a mão livre e, em seguida, inserir o coletor no canal vaginal.

6. O coletor de fluido menstrual deve ser mantido no interior do canal vaginal durante três horas. Não sendo recomendado que o mesmo permaneça na vagina por mais de 3 horas;
7. Minutos antes da retirada do coletor, colocar sobre uma bancada limpa e seca, o frasco estéril contendo solução conservante/antibióticos.
8. Preencher a etiqueta colada ao frasco com nome, data e hora da coleta.
9. Promover a abertura da gaze estéril colocando-a sobre a bancada e abrir o frasco estéril (tomando cuidado para não tocar a tampa pelo lado interno).e colocar a tampa- voltada para cima - sobre a gaze;
10. Decorridas às 3 horas da inserção do coletor, o mesmo deve ser retirado;
11. Sentar no vaso sanitário e, com auxílio dos dedos polegar e indicador, pinçar a base do coletor de fluido menstrual, permitindo a entrada de ar, facilitando a retirada;
12. Transferir o conteúdo presente no coletor cuidadosamente para o interior do frasco estéril, sem encostar o coletor na borda do frasco coletor.
13. Tampar o frasco e promover uma leve inversão do mesmo permitindo que o material coletado entre em contato com a solução

conservante/antibiótico;

14. Envolver o frasco estéril no papel absorvente e acondicioná-lo na embalagem plástica contendo a inscrição de material biológico.
15. Transferir para a frasqueira térmica contendo o gelo reciclado (congelado previamente à coleta). Recomenda-se acondicionamento até a entrega no laboratório numa temperatura entre 1 e 24°C (idealmente entre 1 e 10°C).

Atenção: O frasco estéril contendo a amostra, uma vez acondicionado na frasqueira, não deve ser retirado da mesma.

16. A participante deve preencher o formulário de coleta e depositá-lo junto a frasqueira térmica na embalagem externa para transporte;
17. Entregar o material ao seu médico.
18. No ato da entrega será colhida uma amostra do sangue periférico por punção venosa, para a realização dos exames sorológicos
19. O médico responsável deve acrescentar à frasqueira térmica os 3 frascos com o sangue periférico da paciente e o TCLE devidamente preenchido. Solicitar a retirada do material em um prazo máximo de duas horas. Nesse projeto, o material será transportado por colaborador do setor de transporte da Cryopraxis, devidamente treinado para esta atividade.

Obs. Este material deve chegar ao laboratório em até 48 horas após a realização da coleta das amostras.

Anexo 3 - Formulário de avaliação da coleta.

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DO USO DO COLETOR DE FLUIDO MENSTRUAL
Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual - transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação		

Identificação da paciente: _____ Idade: _____

Profissão: _____

1 - Informe o numero de gestações: _____

2 - Tem filhos? ☐ sim ☐ não

Quantos? _____

3 - Toma algum medicamento frequentemente? ☐ sim ☐ não

Qual (is)? _____

4 - Utilizou algum medicamento no período de uso do Coletor? (Considere 3 até 3 dias antes do uso) ☐ sim ☐ não

Qual (is)? _____

5 - Faz uso de algum método contraceptivo? Qual? _____

6 - Fez uso de anticoncepcional nos últimos três meses ☐ sim ☐ não

7 - Possui histórico na família de alguma das doenças abaixo:

- Endometriose ☐ sim ☐ não

- Câncer ☐ sim ☐ não

- Mioma ☐ sim ☐ não

8 - Tem cólicas menstruais: ☐ não ☐ sim (0 a 10) _____

9 - Tem dores entre as menstruações: ☐ não ☐ sim (0 a 10) _____

10 - Tem dores para evacuar na menstruação: ☐ não ☐ sim (0 a 10) _____

11 - Tem dores para urinar na menstruação: ☐ não ☐ sim (0 a 10) _____

12 - Sofre de Infertilidade (há quanto tempo): _____

13 - Dificuldade para a colocação do coletor: ☐ sim ☐ não

☐ Muito simples ☐ Simples ☐ Complicado ☐ Muito Complicado

14- Sentiu incômodo ou dor enquanto estava com o Coletor?

☐ sim ☐ não

15 - Dificuldade para retirada: ☐ sim ☐ não

☐ Muito simples ☐ Simples ☐ Complicado ☐ Muito Complicado

Observações:

CONFIDENCIAL - PROIBIDA CÓPIA, REPRODUÇÃO OU DIVULGAÇÃO

Anexo 4 - Documento de aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq).

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0248/11

Título: OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PROVENIENTES DO FLUIDO MENSTRUAL - TRANSPORTE, ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO, EXPANSÃO E CRIOPRESERVAÇÃO.

Pesquisador Responsável: Jorge Milhem Haddad

Departamento: OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 19/10/2012, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 10/09/2012 - Mudança de pesquisador responsável para Edmund Chada Baracat;
- Mudança de pesquisador executante para Lilian Renata Fiorelli Arazawa;
- Será tese de mestrado cujo orientador será o Prof. Dr. Edmund Chada Baracat; Relatório parcial

CAPPesq, 19 de Outubro de 2012

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo 5 - Exemplo de imunofenotipagem da coleta inicial, voluntária IU02

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular - IBCCF

Nome da paciente: TLT ID: IU02
Data da coleta: 17-11-11
Data da imunofenotipagem: 18-11-11
Material: sangue menstrual total
Volume recebido: 9,0 ml
Projeto: Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual – transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação.

Contagem de mononucleares:

Método: Avaliação citomorfológica e contagem automatizada
Valor absoluto: 3.600.000 cells/mm³

Viabilidade Celular:

Método: citometria de fluxo por 7AAD

Percentual de células nucleadas vivas: 72,5%

Mapeamento celular para pesquisa:

Método: Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Valores percentuais relativos ao total de células nucleadas viáveis

- Neutrófilos:	83,20%
- Eosinófilos:	0,07%
- Monócitos:	2,16%
- Promonócitos:	0,00%
- Linfócitos totais:	9,68%
- Linfócitos T:	6,57%
* CD4+CD8:	3,47%
* CD4+CD8+:	1,88%
* CD4+CD8-:	1,16%
* CD4+CD8+:	0,07%
- Natural Killer:	1,75%
- Linfócitos B:	1,36%
- Precursor CD34+ (Celularidade total):	0,02%
- Precursor mielóide c-kit+:	0,00%
- Stem cell Mesenquimal:	0,83%

Taís Hanae Kasai Brunswick

Taís Hanae Kasai Brunswick

Biomédica
CRBM: 13417

Rio de Janeiro, 05 de dezembro de 2011.

Anexo 6 - Exemplo de análise imunofenotípica após primeira passagem em cultura, voluntária IU12.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular - IBCCF

Nome da paciente: DR ID: IU12
 Data da coleta: 27-09-11
 Data da imunofenotipagem: 20-10-11
 Material: cultura da fração aderente das células do sangue menstrual em
 passagem 1
 Projeto: Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual –
 transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação.

Contagem de mononucleares:

Método: Avaliação citomorfológica e contagem automatizada

Valor absoluto: 1.200.000 cels/mm³

Viabilidade Celular:

Método: citometria de fluxo por 7AAD

Percentual de células nucleadas vivas: 98,70%

Mapeamento celular para pesquisa:

Método: Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Valores percentuais relativos ao total de células nucleadas vivas

Percentual de expressão das moléculas de superfície avaliadas:

- CD105:	97,0%
- CD90:	99,9%
- CD73:	99,7%
- CD34:	0,8%
- CD45:	0,8%
- CD19:	0,2%
- CD14:	0,4%
- HLA-DR:	0,2%
- CD44:	99,6%
- CD166:	99,9%
- CD146:	92,1%
- CD31:	0,3%
- CD133:	0,2%
- CD117:	0,0%

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2011.

Histogramas representativos das células avaliadas:

Em cinza: intensidade de fluorescência das células não marcadas

Em azul: intensidade de fluorescência das células marcadas

Taís Hanae Kasai Brunswick

Taís Hanae Kasai Brunswick

Biomédica
CRBM: 13417

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2011.

Anexo 7 - Exemplo de análise imunofenotípica após segunda passagem em cultura, voluntária IU12.

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular - IBCCF

Nome da paciente: DR ID: IU12
Data da coleta: 27-09-11
Data da imunofenotipagem: 21-10-11
Material: cultura da fração aderente das células do sangue menstrual em passagem 2
Projeto: Obtenção de células-tronco provenientes do fluido menstrual – transporte, isolamento, caracterização, expansão e criopreservação.

Contagem de mononucleares:

Método: Avaliação citomorfológica e contagem automatizada
Valor absoluto: 1.200.000 cels/mm³

Viabilidade Celular:

Método: citometria de fluxo por 7AAD

Percentual de células nucleadas vivas: 98,30%

Mapeamento celular para pesquisa:

Método: Imunofenotipagem por citometria de fluxo
Valores percentuais relativos ao total de células nucleadas viáveis
Percentual de expressão das moléculas de superfície avaliadas:

- CD105:	99,3%
- CD90:	100,0%
- CD73:	100,0%
- CD34:	0,5%
- CD45:	0,5%
- CD19:	0,1%
- CD14:	0,4%
- HLA-DR:	0,0%
- CD44:	99,8%
- CD166:	99,7%
- CD146:	90,0%
- CD31:	0,2%
- CD133:	0,2%
- CD117:	0,0%

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2011.

Histogramas representativos das células avaliadas:

Em cinza: intensidade de fluorescência das células não marcadas

Em azul: intensidade de fluorescência das células marcadas

Tais Hanae Kasai Brunswick

Tais Hanae Kasai Brunswick
Biomédica
CRBM: 13417

Rio de Janeiro, 26 de outubro de 2011.