

FELIPE DE LARA JANZ

**Características de expansão, diferenciação e criopreservação
de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido
amniótico no segundo trimestre de gestação**

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

Programa: Ciências Médicas
Área de concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Homeostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Janz, Felipe de Lara

Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação / Felipe de Lara Janz. -- São Paulo, 2010.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimais 2.Líquido amniótico
3.Diferenciação celular 4.Criopreservação 5.Crioprotetores

USP/FM/DBD-286/10

À minha querida família, na figura de meus pais Dones e Nilcéia e de meus irmãos Dones Jr. e Luana.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski pela oportunidade concedida e orientação na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Dones e Nilcéia Janz e a minha irmã Luana, motivos maiores das minhas conquistas, por todo amor e carinho.

Ao meu irmão Dones Jr., inspiração maior da minha caminhada científica e Rúbia Janz pela amizade, incentivos e ensinamentos.

Ao amigo Dr. Giovani Marino Fávero pela oportunidade, apoio e amizade.

À Dra. Adriana de Aguiar Debes por todos os conhecimentos, lições transmitidas e, sobretudo, pela amizade durante estes anos.

A Cleide Menarbini Apolônio por sua amizade e pronto apoio sempre que necessário.

Ao Jorge Luis Maria Ruiz pela amizade, ajuda e companheirismo durante toda esta jornada.

A Carolina Martinez Romão, por todo auxílio prestado no término deste trabalho e, sobretudo, pelo enorme carinho.

A Rita de Cássia Cavaglieri pela ajuda e amizade.

À Dra. Nair Maeda, Dra. Rosângela Soares, Dra. Estela Novak, Dra. Luciana Maselli, Dra. Débora Levy, Dr. Sérgio Duarte e Dr. Magnanelli pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do laboratório: Adriana Morgan, Ana Carolina, Andréa, Bruna, Bruno, Carolina Araújo, Carolina Macedo, Denise, Fernanda, Gustavo, Joel Bispo, Karolline, Linah, Natália, Pamela e Viviane.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão do auxílio financeiro para execução deste trabalho.

Especialmente à minha *Tália* com sua coroa de heras por estar sempre a me inspirar.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram na conclusão deste trabalho.

“Die Eule der Minerva fliegt nur in der Dämmerung...”
Georg Wilhelm Friedrich Hegel (1770-1831)

A Coruja de Minerva alça voo somente ao entardecer...
(tradução livre)

Esta tese 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. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed.
São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de figuras, tabelas e gráficos	
Resumo	
Summary	
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	4
2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS.....	6
2.1. Células-tronco Hematopoéticas (CTH).....	8
2.2. Células-tronco Mesenquimais (CTM).....	12
2.2.1. Caracterização das CTM.....	12
2.2.1.1. Marcadores de Membrana.....	12
2.2.1.2. Potencial de Diferenciação ou Plasticidade Celular.....	14
2.2.1.3. Genes de Indiferenciação e Autorrenovação.....	18
2.2.2. Aplicações Clínicas.....	21
2.3. Principais Fontes de CTM.....	28
2.3.1. Medula Óssea.....	28
2.3.2. Cordão Umbilical.....	30
2.3.3. Tecido Adiposo.....	31
2.3.4. Líquido Amniótico.....	32
2.3.5. Produção do Líquido Amniótico.....	35
2.3.5.1. Primeira metade da gravidez.....	35
2.3.5.2. Segunda metade da gravidez.....	35
2.3.5.3. Reabsorção.....	36
2.4. Amniocentese.....	39
3. CÉLULAS-TRONCO DO LÍQUIDO AMNIÓTICO.....	43
4. CRIOPRESERVAÇÃO.....	44
4.1. Criopreservantes Intracelulares.....	49
4.1.1. Dimetilsulfóxido (DMSO).....	50
4.1.2. Glicerol.....	51
4.2. Criopreservantes Extracelulares.....	52

4.2.1. Sacarose.....	53
4.2.2. Trealose.....	54
4.3. Métodos de Congelamento.....	55
4.3.1. Congelamento Padrão (Clássico).....	55
4.3.2. Congelamento Gradual (Automatizado).....	57
5. Descongelação.....	57
OBJETIVOS.....	59
MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
1. OBTENÇÃO DA AMOSTRA (AMNIOCENTESE).....	60
2. PRÉ-CULTIVO.....	62
2.1. Processamento das Amostras.....	62
2.2. Tempo de Armazenamento das Amostras.....	63
2.3. Contagem Celular e Inóculo Inicial das Amostras de LA.....	63
3. CULTIVO CELULAR.....	65
3.1. Determinação do Meio de Cultura Adequado.....	65
3.2. Isolamento das CTLA.....	62
3.3. Curva de Crescimento e Densidade de Inóculo das CTLA.....	66
4. EXPANSÃO CELULAR.....	66
4.1. Dissociação Celular.....	67
4.2. Análise do Ciclo Celular das CTLA.....	68
5. CARACTERIZAÇÃO DAS CTLA.....	69
5.1. Análise do Estado de Indiferenciação por RT-PCR.....	69
5.2. Extração de RNA total pelo Método do Trizol.....	70
5.3. Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa.....	71
5.4. Imunofenotipagem.....	72
5.5. Plasticidade das CTLA.....	74
5.5.1. Linhagem Osteogênica.....	74
5.5.2. Coloração por von Kossa.....	75
5.5.3. Coloração por Vermelho de Alizarina.....	75
5.5.4. Coloração por Fosfatase Alcalina.....	76
5.6. Linhagem Adipogênica.....	76
5.6.1. Coloração de Oil Red O.....	77
5.7. Linhagem Condrogênica.....	77

5.7.1. Coloração por Hematoxilina-Eosina.....	78
5.7.2. Técnica de Imunofluorescência para colágeno tipo II.....	79
5.8. Linhagem Neuronal.....	80
5.8.1. Técnica de Imunocitoquímica.....	82
6. CRIOPRESERVAÇÃO.....	82
6.1. Congelamento Padrão (<i>Slow Freezing</i>).....	83
6.2. Congelamento Gradual (Automatizado).....	83
6.3. Meio de Congelamento.....	83
6.4. Criopreservantes.....	84
6.4.1. Dimetilsulfóxido (DMSO).....	84
6.4.2. Glicerol.....	84
6.4.3. Sacarose.....	84
6.4.4. Trealose.....	85
7. DESCONGELAMENTO.....	85
8. ANÁLISES PÓS-DESCONGELAMENTO.....	85
8.1. Viabilidade Celular.....	86
8.2. Avaliação de Gene de Indiferenciação.....	86
8.3. Análise de Marcadores de Superfície.....	86
8.4. Ensaios de Diferenciação Osteogênica.....	87
9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	87
RESULTADOS.....	88
1. PRÉ-CULTIVO.....	88
1.1. Tempo de Armazenamento da Amostra.....	88
1.2. Contagem de células nas amostras de líquido amniótico.....	89
2. CULTIVO CELULAR.....	90
2.1. Determinação do meio de cultura apropriado.....	90
2.1.1. Análise de diferentes meios no isolamento e crescimento celular	90
2.1.2. Influência dos diferentes meios na expressão do gene Oct-4.....	91
2.2 Isolamento das CTLA.....	92
2.3. Diferentes Tipos Celulares isolados das Amostras de LA.....	93
2.4. Curva de Crescimento e densidade de inóculo das CTLA.....	94
3. EXPANSÃO DAS CTLA.....	95
3.1. Dissociação Celular.....	95

4. ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CTLA.....	95
5. CARACTERIZAÇÃO DAS CTLA.....	96
5.1. Análise do estado de Indiferenciação por RT-PCR.....	96
5.2. Imunofenotipagem das CTLA.....	97
5.3. PLASTICIDADE DAS CTLA.....	98
5.3.1. Diferenciação Osteogênica.....	98
5.3.2. Diferenciação Adipogênica.....	100
5.3.3. Diferenciação Condrogênica.....	101
5.3.4. Diferenciação Neuronal.....	103
6. ANÁLISES APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO.....	105
6.1. Viabilidade celular.....	105
6.2 Análise dos marcadores de membrana pós-descongelamento.....	109
6.3. Avaliação do gene Oct-4 pós-descongelamento.....	111
6.4. Ensaios de diferenciação osteogênica pós-descongelamento.....	111
DISCUSSÃO.....	113
CONCLUSÃO.....	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
®	Marca registrada
α-MEM	Minimal Essential Medium Alpha-Modification
β-ME	beta-Mercaptoetanol
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
ANOVA	Análise de Variância
APC	Antigen Presenting Cells
ATCC	American Type Cell Culture
ATV	Associação de Tripsina e Versene
b-FGF	basic-Fibroblast Growth Factor
Ca²⁺:	Cálcio
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Desoxirribonucleic Acid
céls.:	Células
Dr.	Doutor
CFU-F	Unit Forming Colonies – Fibroblastic
CO₂	Dióxido de Carbono
CTA	Célula-tronco Adulta
CTE	Célula-tronco Embrionária
CTH	Célula-tronco Hematopoética
CTLA	Célula-tronco derivada do Líquido Amniótico
CTM	Célula-tronco Mesenquimal
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Desoxirribonucleic Acid
EGF	Endothelial Growth Factor
et al.	e outros
ex.	exemplo
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
H&E	Hematoxilina e Eosina
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA-DR	Human Leucocitary Antigen-DR
IBMX	Isobutilmetilxantina
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule-1
IDO	Indolamina Dioxigenase
IGF	Insulin Growth Factor-1
IL	Interleucina
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INF-γ	Interferon-Gama
KCl	Cloreto de Potássio

KH₂PO₄	Fosfato Monopotássico
LA	Líquido Amniótico
LDL	Low Density Lipoprotein
M	Molar
Mg²⁺:	Magnésio
MHC-I e II	Major Histocompatibility Complex-I e II
ml	Mililitro,
mM	Milimolar
mm	Milímetro,
MO	Medula Óssea
N₂	Nitrogênio
Na₂HPO₄	Fosfato Dissódico
NaCl	Cloreto de Sódio
NF-M	Neurofilamento-Médio
nM	Nanomolar
NSE	Neural Specific Enolase
Oct-4	Octamer binding factor-4
p.	página
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDGF	Platelet Derivated Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PGE2	Prostaglandina E2
Prof.	Professor
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roosevelt Parker Memorial Institute Medium
RT-PCR	Trancryptase Reverse – Polimerase Chain Reaction
SCU	Sangue de Cordão Umbilical Humano
SFB	Soro Fetal Bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
Sox-2	SRY (sex determining region Y) Box-2
SSAE-3	Stage Specif Antigen Embrionary-3
SSAE-4	Stage Specif Antigen Embrionary-4
TGF-β	Transforming Growth Factor – Beta
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alfa
ul	Microlitro
uM	Micromolar
um	Micrometro
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hierarquia celular: célula amplificadora transitória (“célula comprometida”) entre uma célula-tronco original e as células já diferenciadas.....	3
Figura 2 - Disposição dos 3 folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme).....	11
Figura 3 - Esquema de divisão das células-tronco: simétrica (S) e assimétrica (A).....	16
Figura 4 - Estrutura do gene Oct-4.....	20
Figura 5 - Diagrama de Venn e a regulação gênica promovida por Oct-4, Sox-2 e Nanog	21
Figura 6 - Punção de medula óssea para coleta de células-tronco.....	29
Figura 7 - Sistema de 3 compartimentos: materno, fetal e amniótico.....	35
Figura 8 - Células-tronco do líquido amniótico em cultura.....	44
Figura 9 - Dois principais tipos de lesões no congelamento celular.....	47
Figura 10 - Ilustração da coleta de líquido amniótico pela técnica de amniocentese.....	61
Figura 11 - Amostra de líquido amniótico após a punção.....	62
Figura 12 - Ilustração da câmara de Neubauer e a fórmula utilizada para contagem celular.....	65
Figura 13 - Fotos das células progenitoras do LA visualizadas por microscopia óptica em cultivo após armazenamento em geladeira por diferentes períodos.....	88
Figura 14 - Foto da cultura de líquido amniótico destacando a célula padronizada como sendo de interesse na amostra.....	89
Figura 15 - Fotos das células progenitoras isoladas em cultivo com os dois principais meios utilizados na cultura de células-tronco, α -MEM e DMEM.....	90
Figura 16 - Análise da expressão gênica do marcador de indiferenciação Oct-4 em CTLA cultivadas com diferentes meios de cultura.....	92
Figura 17 - Presença de hemácias no cultivo primário da amostra de líquido amniótico.....	92
Figura 18 - Cultura primária de LA mostrando que não houve diferenças na adesão e isolamento celular com ou sem a presença de lamínula de vidro.....	93
Figura 19 - Diferentes tipos celulares isolados na cultura do LA.....	94
Figura 20 - Análise da expressão dos marcadores de indiferenciação Oct-4, Sox-2 e Nanog	97
Figura 21 - Caracterização imunofenotípica das CTLA.....	98
Figura 22 - Potencial de diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> das CTLA.....	99
Figura 23 - Análise dos produtos de RT-PCR demonstrando a expressão de genes específicos da diferenciação osteogênica.....	99
Figura 24 - Caracterização da diferenciação adipogênica de células-tronco isoladas de líquido amniótico.....	100
Figura 25 - Análise da expressão gênica após RT-PCR para os genes específicos de diferenciação adipogênica.....	101
Figura 26 - Diferenciação condrogênica realizada em placa de 6 poços....	102

Figura 27 - Caracterização da diferenciação condrogênica de cortes histológicos de células-tronco isoladas de líquido amniótico coradas com hematoxilina-eosina.....	102
Figura 28 - Análise da expressão gênica após RT-PCR para os genes específicos de diferenciação condrogênica.....	103
Figura 29 - Caracterização da diferenciação neurogênica de células-tronco isoladas de líquido amniótico.....	104
Figura 30 - Análise de expressão dos genes associados à diferenciação neuronal.....	104
Figura 31 - Ensaio de imunocitoquímica em CTLA diferenciadas em linhagem neuronal.....	104
Figura 32 - CTLA no décimo dia de cultivo após serem congeladas com diferentes concentrações de criopreservantes.....	105
Figura 33 - Expressão do gene Oct-4 nas amostras de CTLA após descongelamento utilizando diferentes criopreservantes pelo método padrão e gradual.....	111
Figura 34 - Diferenciação osteogênica das CTLA confirmada pela coloração de Vermelho de Alizarina após criopreservação.....	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de viabilidade celular (%) das amostras de LA armazenadas em geladeira por até 6 semanas.....	89
Gráfico 2 - Curva de crescimento das CTLA.....	95
Gráfico 3 - Histograma do ciclo celular das CTLA em cultura.....	96
Gráfico 4 - Viabilidade da CTLA antes (normal) e após congelamento de 3 meses com diferentes criopreservantes pelo método padrão.....	106
Gráfico 5 - Viabilidade das CTLA antes (normal) e após congelamento de 3 meses com diferentes criopreservantes pelo método gradual.....	107
Gráfico 6 - Viabilidade das CTLA antes (normal) e após congelamento de 6 meses com diferentes criopreservantes pelo método padrão.....	108
Gráfico 7 - Viabilidade das CTLA antes (normal) e após congelamento de 6 meses com diferentes criopreservantes pelo método gradual.....	108
Gráfico 8 - Comparação da viabilidade celular obtida após congelamento das CTLA através do método gradual e padrão pelo período de 3 meses.....	109
Gráfico 9 - Comparação da viabilidade celular encontrada após congelamento das CTLA através do método padrão e gradual pelo período de 6 meses.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados para caracterização das CTLA por citometria de fluxo.....	73
Tabela 2 - Sequencia de <i>primers</i> (senso e antissenso) utilizados nas	

reações de RT-PCR.....	81
Tabela 3 - Anticorpos monoclonais usados na caracterização de CTLA por citometria de fluxo pós-congelamento.....	87
Tabela 4 - Marcadores de membrana (%) analisados por citometria de fluxo após congelamento pelo método padrão das CTLA.....	110
Tabela 5 - Marcadores de membrana (%) analisados por citometria de fluxo após congelamento pelo método gradual das CTLA.....	110

Resumo

JANZ, FL. *Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010. 143p.

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células progenitoras indiferenciadas que apresentam altas taxas de proliferação em cultivo, capacidade de diferenciação em inúmeros tecidos e podem ser encontradas no organismo adulto e, também, em tecidos fetais, como cordão umbilical, placenta e líquido amniótico (LA). Estudos demonstraram que o LA humano obtido por amniocentese no segundo trimestre de gestação, comumente utilizado em exames de diagnóstico fetal, apresenta-se como uma fonte em potencial destas células progenitoras. Contudo, estas células necessitam de mais estudos quanto às técnicas de isolamento, expansão e, sobretudo, acerca dos protocolos de congelamento utilizados em sua criopreservação. Com isso, nos propusemos a padronizar técnicas de cultivo para as CTLA, como melhor meio de cultura e densidade de inóculo; avaliar as características biológicas como estado de indiferenciação, ciclo celular, marcadores de membrana, plasticidade e, ainda, testar dois protocolos de congelamento celular (padrão e gradual) com diferentes criopreservantes (DMSO, glicerol, trealose e sacarose) que mantivessem uma alta viabilidade e as demais características das células-tronco após períodos de 3 e 6 meses de armazenamento em nitrogênio líquido. Ao fim dos experimentos constatamos ser o líquido amniótico uma rica fonte de CTM passíveis de serem isoladas e cultivadas com meio de cultura α -MEM suplementado com 20% de SFB. Padronizamos, também, uma contagem celular inicial das amostras para otimizar o plaqueamento primário, uma densidade de inóculo ideal para as passagens posteriores (5.000 céls/cm^2) e o tempo de dobramento (30 ± 4 horas) das mesmas. As CTLA expressaram genes de indiferenciação: Oct-4, Sox-2 e Nanog; apresentaram positividade para marcadores de superfície CD29, CD44, CD90 e CD105; alta taxa de proliferação *in vitro* e diferenciaram-se em tecido ósseo, adiposo, cartilaginoso e neuronal. Não encontramos diferenças significativas entre os dois métodos de congelamento avaliados no que diz respeito à viabilidade pós-congelamento. Todos os criopreservantes analisados mantiveram o estado de indiferenciação e plasticidade das células-tronco congeladas por 3 e 6 meses, contudo o DMSO 10% proporcionou maiores taxas de viabilidade do que os demais. As CTLA ficam desta maneira melhor caracterizadas, com protocolos de cultivo e estocagem bem estabelecidos, facilitando a produção de células-tronco funcionais em larga escala aptas a serem utilizadas em experimentos futuros.

Descritores: células-tronco mesenquimais; líquido amniótico, diferenciação celular, criopreservação; crioprotetores.

Summary

JANZ, FL. *Characteristics of expansion, differentiation and cryopreservation of mesenchymal stem cells obtained from amniotic fluid in second trimester of pregnancy* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2010. 143p.

Mesenchymal stem cells (MSCs) are undifferentiated progenitor cells that have high proliferation rates in culture, ability to differentiate into various tissues and can be found in adult and fetal tissues such as umbilical cord, placenta and amniotic fluid (AF). Studies showed that human AF obtained by amniocentesis in second trimester of pregnancy, commonly used in fetal diagnostic, is a potential source of progenitor cells. However, these cells require further studies about techniques of isolation, expansion and, especially, about freezing protocols used in their cryopreservation. For then, we analyzed isolation and expansion methods to AFSC as the best culture medium and inoculum density; biological characteristics such as undifferentiated state, cell cycle, membrane markers, plasticity, and also we tested two freezing protocols (standard and graduated) with different cryoprotectors (DMSO, glycerol, trehalose and sucrose) that could be able to maintain high viability and other characteristics of stem cells after 3 and 6 months of storage in liquid nitrogen. At the end of experiments we found that amniotic fluid is a rich source of mesenchymal stem cells that can be isolated and cultured with α -MEM medium supplemented with 20% FBS. Standardized an initial cell samples counting to optimize primary plating, an ideal inoculum density for the later passages (5000 cells/cm²) and doubling time (30 \pm 4 hours). AFSC expressed undifferentiated genes: Oct-4, Sox-2 and Nanog, were positive for surface markers CD29, CD44, CD90 and CD105; presented high *in vitro* proliferation rate and capability to differentiate into bone, adipose, cartilage and neuronal tissues. There was not statistical significance in cell viability between standard and graduated freezing protocols. All evaluated cryoprotectors maintained the basic features of amniotic fluid stem cells, as Oct-4 gene expression, surface markers and plasticity. DMSO 10% showed higher rates of viability than the others. We can conclude that AF is a rich source of MSC with great capacity for expansion and differentiation and that both methods of freezing could be used for AF cells storage. All tested cryoprotectors maintains stemness of AFSC, therefore the highest viability rate is supplied by 10% DMSO. In this way, AFSC are better characterized, with cultivation and storage protocols standardized, resulting in large scale production of functional stem cells suitable for use in future experiments.

Descriptors: mesenchymal stem cells, amniotic fluid, cell differentiation, cryopreservation; cryoprotectors.

INTRODUÇÃO

Os estudos com células-tronco despontam no cenário científico mundial demonstrando a grande aplicabilidade das mesmas nos variados campos da medicina. O elevado número de questionamentos levantados pelas pesquisas com células-tronco embrionárias (CTE) proporcionou uma busca por tipos alternativos de células-tronco. Neste aspecto, surgiram as células-tronco mesenquimais (CTM), que embora tenham um menor potencial que as CTE, podem ser isoladas de vários locais no organismo, sobretudo nos tecidos fetais, quando as células progenitoras apresentam maior grau de indiferenciação e, logo, maior potencial de diferenciação.

Para tanto, resolvemos estudar neste trabalho o líquido amniótico humano como uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais (CTM). Buscamos padronizar protocolos de isolamento, cultivo e expansão para as mesmas que fossem mais rápidos e fáceis na execução do que os propostos até aqui. Pretendemos caracterizar estas células de forma mais contundente, visto que o LA apresenta uma grande celularidade, sem deixar margem para dúvidas acerca de possíveis contaminações celulares ou diferenciações indesejadas em cultura. Os estudos sobre congelamento de CTM são de vital importância já que o método de resfriamento adotado e as substâncias utilizadas como crioprotetores podem causar alta taxa de morte celular e/ou iniciar uma diferenciação que inviabilizaria as mesmas. Por estes motivos, junto à carência de trabalhos esclarecedores neste sentido, testaremos também diferentes protocolos de congelamento com diversos

criopreservantes a fim de padronizar ambos para a criopreservação das células-tronco.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Células-tronco, por definição, são aquelas capazes de autorrenovação ilimitada ou prolongada através de divisões mitóticas assimétricas e passíveis de originar pelo menos um tipo celular em estágio mais avançado de diferenciação (Morrisson *et al.*, 1997). Ainda como característica, as células-tronco são células não-especializadas, isto é, não tem comprometimento morfológico e funcional com nenhum tipo celular (Del Carlo, 2005).

Geralmente, entre uma célula-tronco e suas progenitoras totalmente diferenciadas existe um tipo celular intermediário chamado de célula amplificadora transitória, que apresenta capacidade de proliferação diminuída e um potencial de diferenciação restrito (Figura 1). A presença destas células amplificadoras transitórias explica como um tecido pode manter uma produção elevada e constante de células diferenciadas a partir de um pequeno número de células-tronco locais. Como, normalmente, as células-tronco possuem um ciclo celular lento (estado quiescente), muitas das células em divisão presentes em um determinado tecido são células amplificadoras transitórias que estão comprometidas a se diferenciar após um determinado número de divisões. Desse modo podemos concluir que a capacidade de divisão celular não é por si só um indicador da condição de célula-tronco (Slack, 2000).

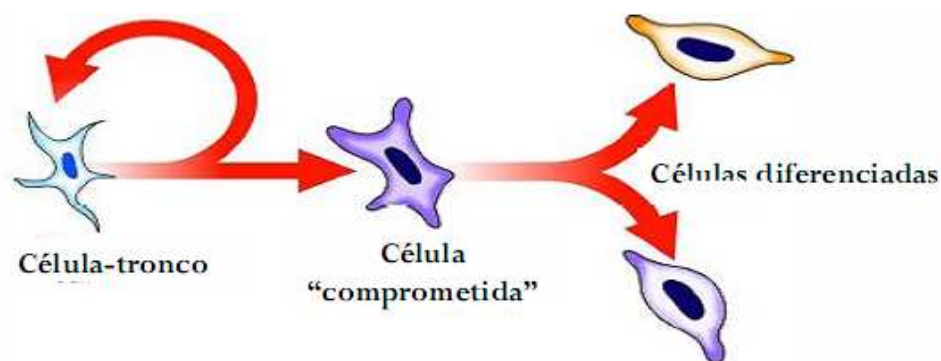


Figura 1 – Hierarquia celular: célula amplificadora transitória (“célula comprometida”) entre uma célula-tronco original e as células já diferenciadas. (Fonte: www.fzea.usp.br/gma/discip/zab0215/aula24.pdf)

As células-tronco são divididas em dois grandes grupos que dizem respeito ao seu local de origem: podem ser embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; e adultas (CTA) que são aquelas localizadas em estado mais diferenciado na maioria dos tecidos do organismo adulto (Vogel, 2000). Levando em consideração o grau de plasticidade da célula-tronco, ou seja, o seu potencial de diferenciação em tecidos variados, podemos classificá-las em três tipos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

As células-tronco totipotentes podem originar tanto um organismo totalmente funcional, como qualquer tipo celular do corpo, inclusive todo o sistema nervoso central e periférico (Gage, 2000). Correspondem às células do embrião recém-formado (zigoto) e têm potencial para originarem até mesmo as células dos folhetos extra-embriônico, que formarão a placenta e os demais anexos responsáveis pelo suporte ao embrião. Entretanto, estas células possuem um tempo de vida curto e desaparecem poucos dias após a fertilização (Robey, 2000).

As pluripotentes são células capazes de originar qualquer tipo de tecido sem, no entanto, originar um organismo completo, visto que não podem gerar a placenta e outros tecidos embrionários de apoio ao feto. Formam a massa celular interna do blastocisto depois do quarto dia de fecundação e participam da formação de todos os tecidos do organismo (Robey, 2000). Apesar de existirem em menor número, as células-tronco pluripotentes estão presentes, também, em indivíduos adultos. As oriundas da medula óssea, por exemplo, podem originar células de sangue, ossos, cartilagem, músculos, pele e tecido conjuntivo (Gage, 2000).

As células-tronco multipotentes são um pouco mais diferenciadas, presentes no indivíduo adulto, com capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células são designadas de acordo com o órgão do qual derivam e podem originar apenas células deste órgão, possibilitando a regeneração tecidual local (Gage, 2000). Entretanto, com o avanço das pesquisas, a existência desta categoria na classificação das células-tronco tem sido cada vez mais questionada, visto que células antes consideradas multipotentes, a exemplo das células-tronco neurais, têm se revelado pluripotentes (Clarke, 2000).

1. CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Em cada embrião no estágio de blastocisto, as células-tronco da massa celular interna diferenciam-se para formar o ectoderma primitivo, o qual, durante a gastrulação, diferencia-se nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). Quando removidas do seu ambiente

embrionário normal e cultivadas em condições apropriadas, estas células dão origem a células que se proliferam e renovam-se indefinidamente (Weissman, 2000). As células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, que apresentam características particulares, como uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro* sob estímulos, além da possibilidade de formar células derivadas dos três folhetos embrionários em cultura (Odorico *et al.*, 2001; Deb, 2008).

As CTE humanas expressam muitos marcadores que são comuns às células pluripotentes, como: CD9, CD24, Oct-4, Nanog, fosfatase alcalina, Rex-1, Cripto/TDGF1, DNMT3B, SOX-2, EBAF e Thy-1, bem como, os antígenos específicos de estágio embrionário, SSEA-3 e SSEA-4 (Trounson, 2006; Richards *et al.*, 2004; Chambers, 2004). Também exibem, em geral, altos níveis e uma alta atividade da enzima telomerase quando em cultura por longos períodos. Esta enzima é responsável pelo reagrupamento dos telômeros cromossômicos após as divisões impedindo, desta forma, a senescência celular. Outra característica típica destas células é a formação de teratomas (neoplasias benignas que contém células derivadas dos três folhetos germinativos) quando injetadas em camundongos imunodeprimidos (Yao *et al.*, 2006).

As CTE quando cultivadas em suspensão *in vitro* são capazes de formar espontaneamente corpos embrioides que consistem em esferas contendo uma variedade de células progenitoras em estágio mais avançado de diferenciação. A dissociação enzimática destes corpos e o subcultivo de

suas células proporcionam o isolamento de um tipo particular de célula progenitora (Del Carlo, 2005; Ulloa-Montoya, 2005).

Para que sejam induzidos à diferenciação *in vitro*, os corpos embrioides devem ser cultivados na presença de fatores de crescimento específicos e diferentes citocinas por um tempo determinado. Estes agrupamentos de células, na presença de substrato adequado, formarão diversos tipos celulares, incluindo músculos esquelético e cardíaco, neurônios, células hematopoéticas, hepatócitos, dentre outros (Trounson, 2006; Yao *et al.*, 2006; Schuldiner *et al.*, 2002; D'amour, 2005).

2. CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Além do embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos no indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria. Tais populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto são denominadas células-tronco adultas (Odorico *et al.*, 2001; Chiu, 1996; Watt *et al.*, 2000). Estas células, assim como as CTE, produzem a enzima telomerase, não estando, portanto, tão sujeitas à senescência celular, fenômeno que ocorre nas demais células somáticas diploides, devido ao encurtamento dos telômeros após sucessivas mitoses.

As células-tronco adultas (CTA) estão em estado quiescente ou de baixa proliferação, predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, localizando-se em regiões específicas essenciais para o seu

desenvolvimento e a manutenção de seus atributos, particularmente a capacidade de autorrenovação (Gritti *et al.*, 2002). Estas regiões são denominadas de nichos celulares e dentre os principais sítios estão: medula óssea (Heissig, 2005), coração (Leri *et al.*, 2005), rins (Li, 2005), pele (Tumbar *et al.*, 2004), fígado (Guettier, 2005), pâncreas, ovários, cordão umbilical, placenta, líquido amniótico, âmnio, entre outros (Slack, 2000; Brittan, 2002; Modlin, 2003; Lavker *et al.* 2004; Watts, 2005; Woodward, 2005; Kim *et al.*, 2005).

CTA podem iniciar suas divisões e diferenciações em células mais especializadas através de inúmeras interações com o microambiente do nicho onde se situam. Mais especificamente, CTA e células suportes ou estromais interagem reciprocamente formando diversas conexões intercelulares, como junções aderentes e do tipo *gap* para manter a integridade do tecido e controlar o balanço entre estado quiescente e proliferativo (Arai *et al.*, 2004; Fuchs, 2004; Hirao, 2004).

As primeiras CTA estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas são as células hematopoéticas provenientes da medula óssea (Hirao, 2004). Estas células foram capazes de diferenciar-se nos constituintes mieloides e linfoides do sangue e logo foram utilizados com sucesso em transplantes autólogos para pacientes com câncer pós-tratamento quimioterápico. Mais tarde foi isolado outro tipo de célula-tronco adulta também constituinte da medula óssea, porém com propriedades diferentes das hematopoéticas, tratava-se das células-tronco mesenquimais (CTM) ou células-tronco estromais. Elas receberam esta denominação, pois

derivam do folheto embrionário intermediário, a mesoderme, que é responsável pela formação, entre outros, dos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular.

2.1. Células-tronco Hematopoéticas (CTH)

A célula-tronco hematopoiética é definida como uma célula adulta com grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens hematológicas e a reconstituição da população sanguínea a partir de uma única célula. Constituem de 0,05% a 0,1% da população da medula óssea humana e das células hematopoéticas circulantes.

A CTH tem origem mesenquimal e, durante o período de vida intra-uterino, está presente no saco vitelino embrionário e, posteriormente, desloca-se por via hematogena para o fígado, baço, linfonodos e timo fetal. Na metade do período de vida intra-uterino, a hematopoese passa a ocorrer na medula óssea, que se torna o principal sítio hematopoético no final da gestação até a vida adulta (Jain, 1986). As CTH são as únicas células do sistema hematopoéticos que exibem potencial proliferativo extensivo e capacidade de se diferenciar em todas as células do sistema linfo-hematopoético continuamente até a morte (Gasper, 2000).

Além da medula óssea podemos encontrá-las também no sangue periférico no sangue proveniente do cordão umbilical e no sistema hematopoético fetal (Negrin *et al.*, 2000; Laughlin, 2001; Humeau *et al.*, 1996). É o tipo celular mais estudado dentro das CTA, sendo conhecido a

mais de 50 anos. O primeiro transplante de CTH de medula óssea realizado em humanos, no ano de 1.959, foi realizado em gêmeos idênticos e mostrou a capacidade de as células do doador repovoar a medula do receptor com células sanguíneas (Thomas, 1959). Atualmente, em termos clínicos as CTH são usadas no tratamento de leucemias, linfomas, anemia aplásica e doenças hereditárias do sangue, como anemia falciforme e talassemias através de transplantes de medula óssea autólogos ou alogênicos (Locatelli, 2001).

Existem dois tipos principais de células progenitoras que derivam da CTH dentro do sistema hematopoiético, que são: as células progenitoras mieloides e as linfoides. As células progenitoras mieloides são responsáveis pela formação dos eritrócitos, plaquetas, granulócitos e macrófagos. Por sua vez, as células progenitoras linfoides vão dar origem aos linfócitos e as células dendríticas (Dzierzak, 1998).

O fenótipo da célula-tronco hematopoiética inclui a expressão dos antígenos de superfície CD34 e CD90 (Thy-1) e ausência do CD38. O antígeno CD34 funciona como molécula de adesão enquanto o CD90 parece estar envolvido na sinalização da transdução gênica (Humeau *et al.*, 1996). Um subgrupo primitivo das CTH, chamado de “*side population (SP)*” que corresponde aos precursores das células CD34+, não expressa ou expressa quantidades muito baixas de CD34. Essas células podem ser selecionadas por possuírem marcador para CD133 e são parte majoritária de um *pool* quiescente de células precursoras hematopoéticas e mesenquimais. Outra característica marcante das SP é a capacidade de eliminar do seu interior o

corante celular Hoechst 33342 após o contato em cultura. Isto se deve a alta expressão por parte deste grupo de células dos genes MDR-1 (gene de resistência a múltiplas drogas) e BCRP (proteína de resistência ao câncer de mama) que, por sua vez, são responsáveis pela formação de proteínas de membrana que bombeiam para o meio extracelular determinadas substâncias como quimioterápicos e xenobióticos. Sabe-se que as SP oriundas da medula óssea apresentam um grande potencial de reconstituição hematológica e podem dar origem às células musculares e endoteliais. Elas também estão presentes em uma variedade de neoplasias e podem estar ligadas à resistência ao tratamento quimioterápico e reincidência tumoral (Ding, 2010).

As células CD34- podem se diferenciar em células CD34+, deixando o sangue periférico, voltando à medula (*homing*) e aumentando a população de células progenitoras locais (Huss, 2000). Sugere-se que a expressão do CD34 varie dependendo do estado de ativação da célula-tronco hematopoética (Sato, 2001).

2.2. Células-tronco Mesenquimais (CTM)

São consideradas células multipotentes não hematopoéticas com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais (Reiser *et al.*, 2005). O primeiro relato das CTM foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de 70, que as descreveu como sendo células aderentes, morfológicamente semelhantes à fibroblastos e com alta

capacidade de adesão à superfície plástica. Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em células derivadas da mesoderme embrionária (Figura 2): osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Prockcop, 1997).

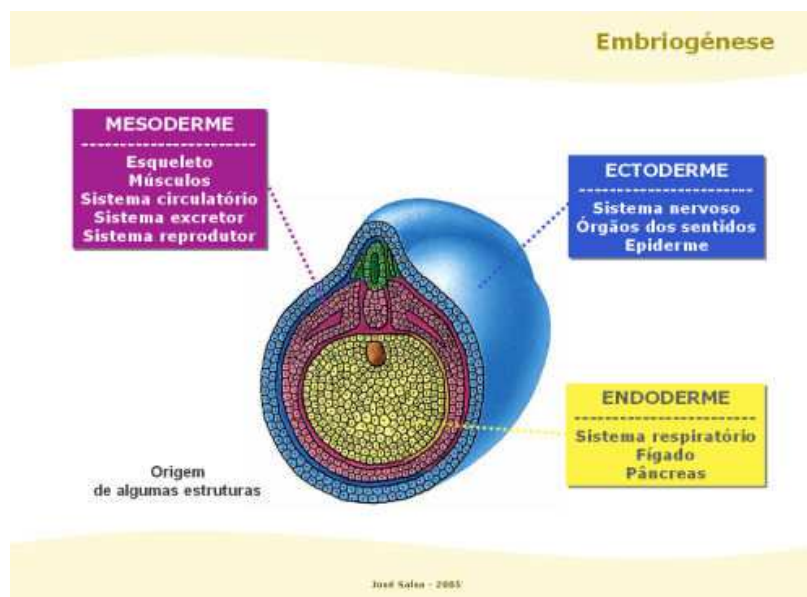


Figura 2 - Disposição dos 3 folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) e alguns dos tecidos que vão originar durante a organogênese (Fonte: José Salsa, 2005).

As células-tronco mesenquimais, sobretudo aquelas derivadas da medula óssea humana, diferem muito quanto à nomenclatura utilizada para descrevê-las. Elas também podem ser denominadas de células-tronco esqueléticas, células-tronco estromais de medula óssea ou, ainda, como recentemente sugerido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) células estromais mesenquimais multipotentes, definidas como um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e, possivelmente, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais e hepatócitos (Horwitz, 2005; Abdallah

e Kassem, 2008). O termo célula-tronco mesenquimal (CTM) será adotado neste trabalho para se referir ao tipo celular descrito pela SITC.

2.2.1. Caracterização das CTM

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular uma determinada população de células será classificada como célula-tronco mesenquimal quando apresentar três características chaves. A primeira é que as mesmas sejam isoladas com base nas suas propriedades de adesão seletiva à superfície do material onde são cultivadas (geralmente plástica). A segunda é que as expressões dos antígenos de membrana CD105 (endoglina ou SH2), CD73 (SH3 ou SH4) e CD90 (Thy-1) tenham uma positividade maior de 95% e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR sejam expressos em menos de 2% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecido ósseo, gorduroso e cartilaginoso após estímulo (Horwitz, 2005). De toda forma, ainda não há marcadores específicos para a caracterização das CTM e as propriedades exigidas pela SITC tampouco são contundentes visto que também estão presentes em outros tipos celulares que não as células-tronco.

2.2.1.1. Marcadores de Membrana

Está bem descrito que as CTM humanas adultas não expressam os marcadores hematopoéticos CD45 (marcador pan-leucocitário), CD34 (marcador de células-tronco hematopoéticas primitivas, raramente expressa

em CTM humanas, apesar de ser positiva em camundongos) e CD14 (expresso em monócitos e macrófagos). Não expressam também CD11b (marcador de monócitos), glicoforina-A (marcador de linhagem eritroide) e o antígeno CD117 (marcador de célula-tronco progenitora hematopoética). São negativas ainda para as moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD40, e as moléculas de adesão celular CD31 (PECAM-1, expresso em células endoteliais e hematopoéticas), CD18 (LCAMB) e CD56 (NCAM-1). Por outro lado, expressam níveis variáveis de CD105 (endoglina), CD73, CD44, CD90, CD71 (receptor de transferrina) e CD271 (Stro-1), assim como as moléculas de adesão CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM), CD54 (ICAM-1) e CD29. Estes são alguns dos principais marcadores de membrana expressos ou não pelas CTM descritos por diferentes grupos na confecção de painéis de anticorpos para caracterização através de citometria de fluxo (Liu, 2009).

A expressão variável de muitos dos marcadores superficiais pode ser explicada não somente pelos diferentes protocolos utilizados para o isolamento celular e caracterização do cultivo, mas também à variação na fonte ou tipo de tecido de onde são obtidas as células, bem como, a idade e o sexo do paciente. O tecido adiposo humano, por exemplo, é uma das fontes de células-tronco adultas que podem diferenciar-se em várias linhagens mesenquimais *in vitro*, mas que apresentam diferenças na expressão de certos marcadores: elas expressam CD49d, o que não ocorre com as CTM de medula óssea; enquanto estas últimas expressam CD106, que não é encontrado nas células de tecido adiposo. O antígeno CD106 é

uma molécula que promove a adesão de linfócitos, monócitos e eosinófilos ao endotélio vascular, estando associado, portanto às atividades imunológicas do sistema hematopoéticos (Duff, 2003); assim, a falta de sua expressão nas CTM de tecido adiposo é consistente com sua localização não hematopoética (Liu, 2009).

2.2.1.2. Potencial de Diferenciação ou Plasticidade Celular

Até pouco tempo imaginava-se que uma célula adulta diferenciada não pudesse promover mudanças em seu fenótipo. Atualmente sabe-se por um grande número de estudos que essa mudança é sim possível, podendo ocorrer em células diferenciadas e células-tronco tecido específicas que passam a expressar características funcionais de outros tecidos. Esta aquisição de um novo fenótipo por células já especializadas chama-se transdiferenciação.

O processo de diferenciação celular começa no útero materno nos primeiros estágios da gravidez, em um processo conhecido como organogênese (Sadler e Langman, 2005). São vários os processos que podem desencadear a diferenciação celular, sendo três os principais: interação e contato célula-célula; faz com que células vizinhas passem a secretar substâncias que irão fornecer um microambiente favorável à diferenciação, como o que ocorre durante o processo de gastrulação na embriogênese, onde as células se diferenciam para formar os três folhetos embrionários que darão origem aos diferentes órgãos constituintes do corpo;

divisão celular: as células podem se dividir de duas maneiras diferentes (Wagers, 2002).

Na divisão simétrica, uma célula dá origem a duas células-filhas que são idênticas entre si e exatamente iguais à célula-mãe, neste caso não ocorre diferenciação celular. Porém, na divisão assimétrica, a distribuição dos componentes celulares no momento da citocinese ocorre de forma desigual (Figura 3). Sendo assim, as células formadas podem ser distintas umas das outras e, desta forma, participar da formação de diferentes tecidos; regulação gênica: existem muitos processos envolvidos na regulação da atividade gênica (Sakashita, 2001). Os dois mecanismos principais nesta regulação envolvem a acetilação da cromatina, que é responsável pela diferença entre heterocromatina: onde os genes encontram-se inativos, devido à formação dos nucleossomos e superenrolamento em determinadas regiões do genoma; e eucromatina: que é um local geneticamente ativo, ou seja, onde os genes estão aptos a serem expressos.

Este processo é regulado basicamente por duas enzimas: a histona-acetiltransferase, que promove a acetilação e, portanto, o desligamento através da inserção de um grupamento acetil no gene e a histona-desacetilase, que remove os mesmos grupos acetila e torna, assim, os genes ativos (Knoblich, 2001). Acredita-se ainda que determinadas sequências de RNA de interferência possam indicar quais regiões do genoma seriam acetiladas ou não (Gibbons, 2005). O outro processo envolvido na regulação gênica é o da metilação (inserção de um grupo metil)

de determinadas sequências gênicas, principalmente as regiões promotoras, que fazem com que os genes regulados por elas não sejam expressos enquanto esta se encontrar metilada.

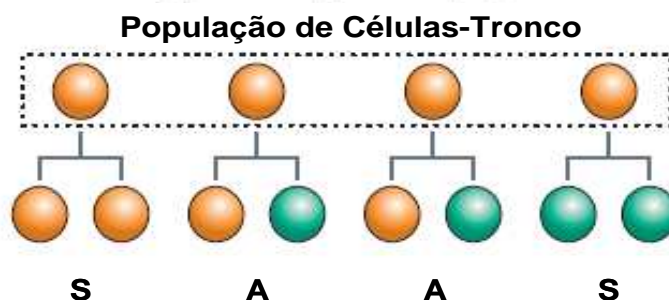


Figura 3 - Esquema de divisão das células-tronco: simétrica (S) onde as células-filhas são idênticas entre si e assimétrica (A) onde uma célula-tronco origina duas células-filhas distintas entre si; sendo uma indiferenciada semelhante à célula-mãe e a outra já diferenciada (Fonte: NATURE, Vol 441, 29 June 2006, doi:10.1038).

As CTM são capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Somada à identificação das CTM baseadas em suas características fenotípicas, a capacidade destas células formarem, ao menos, estes três tipos celulares distintos são os únicos critérios funcionais disponíveis para identificá-las até então. CTM podem, além de diferenciar-se em células da linhagem mesodérmica, como osso, gordura e cartilagem, também dar origem às células dos sítios endodérmico e neuroectodérmico, através do processo de transdiferenciação (Kolf, 2007). Dentre estas diferenciações *in vitro*, sob condições de cultivo apropriadas, estão as derivações em tenócitos, células musculares, cardiomiócitos, células endoteliais, hepatócitos e neurônios.

Diversos fatores, como métodos de isolamento, material de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de inóculo, tratamento com hormônio e fatores de crescimento, afetam não somente a expansão e as

propriedades imunogênicas das CTM, mas também a diferenciação. A idade do doador de células e a presença de enfermidades também podem influenciar.

Vários são os sinais químicos e/ou biológicos que atuam como indutores da diferenciação nas CTM. Fatores de crescimento como o TGF- β (*Transforming Growth Factor – Beta*), IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*), b-FGF (*basic-Fibroblast Growth Factor*), EGF (*Endothelial Growth Factor*) e PDGF (*Platelet Derivated Growth Factor*) estimulam o potencial de diferenciação das CTM em condrócitos (Hashimoto, 2006). Muitas rotas de sinalização intracelular, como a MAPK e Smads, são ativadas e induzem certos fatores de transcrição e genes (Sox-9, Sox-5 e Sox-6) a produzir proteínas de matriz celular, como o colágeno do tipo II, syndecan e perlecan, requeridos para a formação da cartilagem. b-FGF e Wnt podem estimular o potencial de diferenciação osteogênico através da ativação da via de sinalização do BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) (Kulterer, 2007). O meio de cultura suplementado com concentrações adequadas de vitamina D3, 2-fosfatase-ascorbato e β -glicerofosfato pode induzir também a diferenciação osteogênica das CTM que passam a expressar genes osteoespecíficos como osteocalcina e osteopontina (Baksh, 2004). VEGF, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*, por sua vez, estimula o potencial de diferenciação das CTM em células endoteliais. A dexametasona e outros glicocorticoides sintéticos, somados à isobutilmetilxantina, insulina e indometacina, estimulam o potencial adipogênico e fazem com que as CTM

expressem genes como leptina, PPAR-gama e lipoproteína lípase (de Gemmis, 2006).

O isolamento de células-tronco mesenquimais com capacidade de diferenciação em células neuronais trouxe a perspectiva da possível utilização das mesmas em protocolos clínicos de restauração em patologias neurodegenerativas (Woodbury, 2000; Sanchez-Ramos, 2000). O meio de cultura com baixas concentrações de soro fetal bovino contendo pequenas quantidades de dimetilsulfóxido (DMSO) provoca mudanças morfológicas nas CTM semelhantes às aquelas encontradas em neurônios sugerindo uma diferenciação (Prusa, 2004). A mesma transformação fenotípica ocorre com a exposição a baixas concentrações de β -mercaptoetanol. Outros autores utilizam coquetéis de fatores crescimento, entre eles o BDNF (*Brain Neural Derivated Factor*), ácido ascórbico FGF-8, fazendo as células-tronco expressarem genes típicos de neurônios em fase de desenvolvimento precoce e adulto (Anisimov, 2007). Porém, ainda há muitas controvérsias no que diz respeito aos marcadores neuronais utilizados para a caracterização desta diferenciação, visto que a maioria dos genes investigados também é expressa em outros tipos celulares que não neurônios. Poucos estudos avaliam a funcionalidade das células diferenciadas através de ensaios de eletrofisiologia e pesquisas de canais voltagem dependentes.

2.2.1.3. Genes de Indiferenciação e Autorrenovação

A autorrenovação celular é um processo essencial na manutenção da pluripotência das células-tronco. Ela confere a algumas células a capacidade

de se dividir, mantendo seu estado de indiferenciação, tanto pela divisão celular simétrica, como a assimétrica (Knoblich, 2001).

A regulação da capacidade de autorrenovação destas células é feita por genes cujos produtos interferem na própria expressão gênica (Roobrouck, 2008). Estes genes, que são expressos quase exclusivamente nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário são: os genes da família SOX, sendo mais importante o Sox-2, que codifica uma proteína não histônica capaz de se ligar ao DNA, influenciando, positiva ou negativamente, na expressão de determinados genes; o Oct-4 (Figura 4), que participa de duas etapas cruciais na formação do embrião; a primeira, na etapa da formação da mórula com desenvolvimento da massa celular interna, que é pluripotente, e do trofoectoderma; e a segunda, no estágio de pré-implantação, com formação do epiblasto pluripotente e do ectoderma primitivo; e, finalmente, o Nanog, que talvez seja o mais importante deles, pois atua, amplamente, mantendo a capacidade de autorrenovação destas células e o seu estado indiferenciado (Prior e Walter, 1996; Sadler, 2005; Alberio, 2006). Começa a ser expresso no interior das células da mórula e da massa celular interna dos blastocistos. Após a implantação na parede uterina o seu respectivo RNA mensageiro é detectado somente no epiblasto e eventualmente nas células germinativas.

O gene Nanog é expresso em células-tronco embrionárias, multipotentes e também em células neoplásicas. Seu nome é uma referência a *Tir Nan Nog*, o território da eterna juventude segundo a mitologia celta (Darr, 2006).

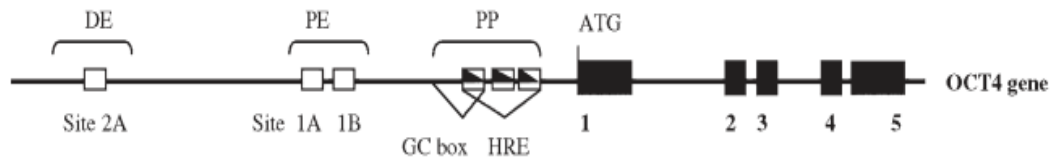


Figura 4 - Estrutura do gene Oct-4. Em preto os 5 éxons e em branco o promotor distal (DE) e proximal (PE) (Fonte: Essential of Stem Cells Biology, 2006).

O gene Oct-4 foi o primeiro identificado como um regulador chave da pluripotência, primeiramente descrito por Schöler (Nichols, 1998). É definido como uma proteína de ligação do DNA, do homodomínio POU, codificado por 324 aminoácidos (Pan, 2002). O Oct-4 depende de dois domínios de transativação no DNA para exercer suas atividades de transcrição é sintetizado e transportado para o núcleo por meio do sinal de localização nuclear (Pan, 2004). O padrão de expressão do Oct-4 sugere que ele pode regular as características celulares do desenvolvimento embrionário inicial (Schöler, 1990).

Em conclusão, os transcritos Oct-4, Nanog e Sox-2 exercem um papel essencial e coordenado, bloqueando genes que, na ausência dos seus transcritos, desencadeiam diferenciação (Zangrossi, 2007). Confirmam-se estes dados pela demonstração da reprogramação de células diferenciadas adultas ao estado de pluripotência pela introdução gênica dos fatores de pluripotência Oct-4 e Sox-2 nas mesmas, por meio da técnica iPS (*induced Pluripotent Stem Cells*) (Caramia, 2009; Zhou, 2010).

Nota-se que estes três genes, isolados ou em associação, são responsáveis pela expressão de mais de 2.000 outros genes envolvidos nos

processos de autorrenovação, de manutenção da plasticidade e, logo, pluripotência das células-tronco (Figura 5 - Masui *et al*, 2007).

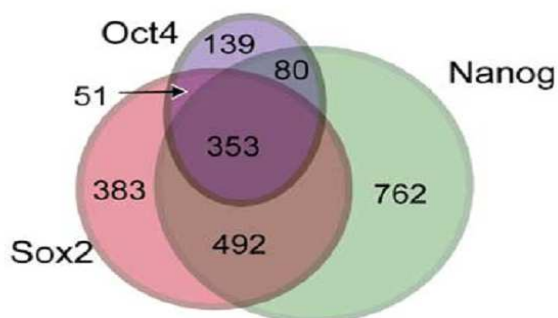


Figura 5 - Diagrama de Venn e a regulação gênica promovida por Oct-4, Sox-2 e Nanog em diversos genes das células-tronco (Fonte: Cell, Vol. 122, 947–956, 23, 2005).

2.2.2. Aplicações Clínicas

A aplicação das CTM no reparo tecidual é estudada há tempos, porém o potencial destas células as capacitam para muitas outras aplicações experimentais (Bruder, 1994; Huang, 2009). Com potencial de diferenciação em diversos tecidos, suas propriedades imunossupressoras e a relativa facilidade de manuseio *in vitro* fazem das CTM uma ferramenta importante para, entre outras coisas, a engenharia tecidual, tratamento de doenças degenerativas e estudo de novos fármacos (Liang, 2002).

A cardiologia é uma das áreas da medicina em que as células-tronco têm sido mais empregadas. As doenças cardiovasculares têm um papel preponderante nos indicadores de saúde tanto no Brasil quanto no mundo, sendo a primeira causa de mortalidade (Urbaniak, 2010; Strauer, 2005; Jackson, 2001; Assmus, 2006; Orlic, 2001). São várias as doenças que podem afetar o bom funcionamento do músculo cardíaco, como:

coronariopatias, infarto do miocárdio, doença de Chagas, entre outras (Mazhari, 2007; Villas-Boas, 2006; Arom, 2008; Daí, 2007; Patel, 2007).

Várias linhagens celulares como células-tronco embrionárias, células mononucleadas da medula óssea, mioblastos, progenitores endoteliais e células-tronco cardíacas foram utilizadas em ensaios pré-clínicos e clínicos no tratamento de infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca crônica, mostrando melhora da função cardíaca após a terapia celular (Huttmann, 2006; Van Laake, 2006). Porém, alguns experimentos mostram a incapacidade destas células infundidas em formar cardiomiócitos e estabelecer junções de condução do estímulo elétrico (Vanderheyden, 2007). A concentração celular, o tipo mais apropriado, a via de inoculação dessas células e a janela terapêutica são os principais desafios das pesquisas clínicas a serem desenvolvidas no futuro, buscando uma uniformização dos procedimentos para cada uma das doenças cardiovasculares.

Os principais alvos terapêuticos na ortopedia são a osteoporose e a osteogenesis imperfecta. As células-tronco seriam utilizadas para repovoar o tecido ósseo com células novas e funcionais (Horwitz, 2001; Raisz, 2005; Cancedda, 2003). A craniossinostose que pode resultar em desfiguração crânio-facial, convulsão e até mesmo cegueira também vem sendo tratada com CTM conjugadas a um carreador de colágeno e implantadas no local da lesão (Moioli, 2008). Em lesões articulares com perda ou deformação de discos cartilagosos, os estudos mostram melhoras das articulações pela

infusão de progenitores cartilagosos ou, ainda, pela reconstrução *in vitro* com a utilização de biomateriais (Kunisaki, 2007).

Na neurologia, propõe-se o reparo de danos na medula espinal através da reposição das células neurais. Ocorrendo a implantação destas células-tronco, com diferenciação em neurônios motores e/ou secreção de fatores de crescimento neurais, poderia se obter a reversão do quadro de paralisia (Chernykh, 2007). Outra doença neurológica de muito interesse é o acidente vascular cerebral (AVC), que também pode levar a uma paralisia incapacitante. As células-tronco seriam infundidas na área da lesão cerebral levando a um repovoamento do tecido necrosado e a uma possível melhora na incapacitação motora (Zhao, 2002; Kajiguchi, 2007). Na esclerose lateral amiotrófica (ELA) especula-se a aplicação das células-tronco na regeneração de um tecido neural ao longo da medula espinal enferma (Mazzini, 2006; Mazzini, 2008). No mal de Parkinson, doença neurodegenerativa causada pela perda progressiva dos neurônios produtores de dopamina, que provoca o aparecimento de tremor, rigidez e diminuição da mobilidade, a terapia celular seria indicada para reposição dos neurônios dopaminérgicos da *substancia nigra*, o que levaria a uma melhora do quadro da doença (Kordover, 2006; Lindvall, 2007; Timmer, 2004). Em outra patologia neurodegenerativa, a doença de Alzheimer, as células-tronco poderiam também tornar-se parte da cura pela reposição das células cerebrais doentes (Mckay, 2004).

Na endocrinologia, o principal foco dos estudos é a *diabetes mellitus* do tipo 1. Pesquisadores de Budapeste descreveram uma terapia celular

combinada de células mononucleares e células mesenquimais expandidas *in vitro* em animais diabéticos tipo I. Os fatores parácrinos liberados pelas células mononucleares e o potencial imunossupressor das células mesenquimais, combinados, trouxeram melhoras para a diabetes autoimune (Lee, 2006; Noguchi, 2007; Urban, 2008).

As perspectivas para terapia celular em dermatologia compreendem principalmente um melhor domínio das técnicas de manipulação genética, terapia gênica e a utilização das células-tronco, tanto na reparação tecidual de feridas ou queimaduras, quanto nas possibilidades de tratamento da calvície e do envelhecimento cutâneo. A pele e, principalmente, a estrutura do pelo têm sido utilizados como modelos para entendimento da regeneração de outros órgãos, uma vez que o folículo piloso representa um órgão em miniatura com células-tronco facilmente acessíveis (*bulge*), múltiplas linhagens celulares e vários centros de sinalização (Yu, 2008).

Outra área de interesse nas pesquisas já em desenvolvimento com células-tronco é a oncologia, mais precisamente, a onco-hematologia (Deans, 2008; Cheung, 2006). A utilização de células-tronco, nestes casos, estaria relacionada com a reconstrução do tecido hematopoiético após transplante, quimioterapia e radioterapia. A grande maioria, dentre os muitos protocolos de pesquisa cadastrados no FDA (*Food and Drug Administration*), órgão de controle norte-americano, está relacionada aos cânceres hematológicos (Jakubowski, 2007). Um exemplo é a aplicação clínica de células-tronco progenitoras CD34+, que consiste em transplantes tanto alogênicos (tratamento de malignidades hematopoéticas, imunodeficiências,

aplasia de medula óssea, doenças do metabolismo, hemoglobinopatias) como autólogos (tratamento de leucemias agudas, mielomas, linfomas, câncer de mama e de ovário, tumor de célula germinativa, doenças autoimunes) (Kim, 2007; Rasmusson, 2006).

As CTM também possuem propriedades imunomodulatórias e desempenham importantes funções moduladoras na tolerância aos transplantes, síndromes de autoimunidade, infiltração tumoral e tolerância materno-fetal (Di Nicolla, 2002; Uccelli, 2006). Elas demonstram baixa expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) classe I e não expressam moléculas coestimulatórias (CD40-, CD80- e CD86-) (Le Blanc, 2004). Vários estudos comprovaram o efeito inibidor das CTM na proliferação e ativação de linfócitos T humanos *in vitro* e *in vivo* (Bartholomew, 2002; Tse, 2003; Rasmusson, 2005).

Os primeiros trabalhos que demonstraram as propriedades imunomodulatórias das CTM foram realizados com células de humanos, babuínos e camundongos (Le Blanc 2003; Djouad, 2003). Estes relatavam que as células progenitoras mesenquimais eram capazes de suprimir a ativação e a proliferação de linfócitos T. Esta inibição afetava a proliferação das células T induzida por aloantígenos e mitógenos, bem como, a ativação das mesmas por anticorpos CD3 e CD8 (Maccario, 2005). As CTM não possuem restrição imunológica, isto é, mostram os mesmos efeitos frente à células de origem autóloga e alogênica.

Muitos estudos relatam o papel efetor de substâncias solúveis na imunorregulação, visto que a separação de CTM e células mononucleares

do sangue por uma membrana semipermeável não afetou a função imunomoduladora (Spaggiari, 2006). Por outro lado, somente o meio sobrenadante de culturas de CTM humanas e murinas não foi capaz de apresentar o mesmo efeito, sugerindo que fatores supressores não são constitutivamente secretados pelas CTM e que, dependem sim, de um contato cruzado dinâmico entre CTM e as células T. Di Nicola e colaboradores sugeriram que a ação imunossupressora seria mediada pelos fatores TGF- β e HGF (*Hepatocyte Growth factor*) (Di Nicolla, 2002). Outros trabalhos, por sua vez, demonstraram que estas mesmas substâncias não são responsáveis pela imunomodulação das CTM e apontaram a prostaglandina E2 como possível molécula efetora. A PGE2 é constitutivamente secretada pelas CTM e esta produção é aumentada em cocultivos com linfócitos T (Meisel, 2004; Selmani, 2009).

Mais recentemente, a enzima que cataboliza o triptofano, chamada de indolamina dioxigenase (IDO) foi citada na ação supressora da proliferação de células T pelas CTM (Meisel, 2004). Sob estímulo com interferon-gama (INF- γ), as CTM expressam IDO que, por sua vez, degrada o aminoácido triptofano produzindo cianorenina. Estes metabólitos são responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular das células T. Contudo o papel da IDO na imunomodulação também não está totalmente elucidado. Outra maneira sugerida de modulação da resposta imune pelas CTM seria pela formação de células T reguladoras CD8 positivas. Um aumento na população de células CD4+CD25+ que possuem um fenótipo regulatório (FoxP3 e CD8

positivas) foi demonstrado em cultivos mistos de CTM e linfócitos (Petrie Aronin, 2010).

As CTM expressam baixos níveis de MHC-I e não expressam MHC-II, mas podem expressar ambos após serem cultivadas na presença da molécula pró-inflamatória interferon gama. Outra função apresentada pelas CTM é a de fazer apresentação antigênica, assim como as células apresentadoras de antígenos (APC): células dendríticas, macrófagos, células de Langerhans e linfócitos B (Stagg, 2006). As APC convertem os antígenos proteicos em peptídeos e apresentam os complexos peptídeo-MHC de uma forma que possa ser reconhecida pelas células T.

As CTM também diminuem a diferenciação, maturação e função das células dendríticas (CD). Estas células realizam apresentação antigênica e têm papel chave na indução de imunidade e tolerância (Coquerelle, 2010). As CD cocultivadas com CTM não expressaram CD83 nem moléculas coestimulatórias e diminuíram sua capacidade de ativar linfócitos T. A secreção de citocinas também foi alterada, com diminuição da produção de TNF-alfa (*Tumor Necrosis Factor*), interferon gama e aumento da proteína anti-inflamatória IL-10 (interleucina 10) (Cheng, 2010).

Em resumo, a importância farmacológica das CTM envolvendo a imunomodulação as torna candidatas para o tratamento de uma variedade de patologias que afetam o sistema imune (Aggarwal, 2005). Sob este enfoque poderiam ser utilizadas na terapia das imunodeficiências, tanto a primária como a imunodeficiência combinada severa e a doença do enxerto contra hospedeiro (Notarangelo, 2006; García, 2007; Chamberlain, 2007).

2.3. Principais Fontes de CTM

2.3.1. Medula Óssea

A medula óssea adulta é um compartimento onde ocorrem interações entre sistemas celulares diferentes, quem formam um microambiente essencial para a hematopoese (Figura 6). Este compartimento, chamado de estroma, é formado basicamente por três tipos celulares distintos: hematopoético, epitelial e estromal (Prockop, 1997). O termo estroma refere-se ao conjunto formado pelo sistema estromal celular que inclui fibroblastos, células endoteliais, células reticulares, adipócitos e osteoblastos, conjuntamente com a matriz extracelular a ele associado, bem como outros tipos celulares, como exemplo, os macrófagos. Neste modelo as células-tronco mesenquimais residentes na medula mantêm um determinado grau de autorrenovação e dão origem às células que podem diferenciar-se em várias linhagens de tecido conjuntivo e em tecido estromais (Phinney, 2002).

A primeira evidência direta de que a medula óssea continha células progenitoras de tecidos mesenquimais não-hematopoiéticos advém do trabalho de Friedenstein e colaboradores feito na Rússia nos anos 70. Eles descreveram o isolamento de células clonogênicas aderentes ao substrato com formato de espículas após cultivar amostras de medula óssea e defini-las como unidades formadoras de colônia fibroblásticas (CFU-Fs). As células aderentes eram heterogêneas e ficavam inativas por dois a quatro dias, quando começavam a proliferar. As células-tronco hematopoiéticas e sua progênie eram descartadas gradativamente com as trocas de meio, já que

não aderiam à superfície plástica. Após várias passagens em cultura, as células aderentes se tornavam mais homogêneas e fibroblastoides na aparência (Friedenstein, 1974). Desde então, a medula óssea vem sendo a fonte mais utilizada e mais bem estudada para o isolamento de CTM.

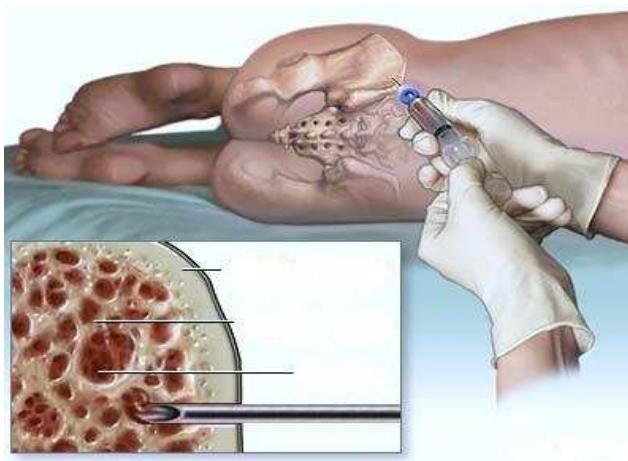


Figura 6 - Punção de medula óssea para coleta de células-tronco (modificado; Fonte: <http://www.ahealthyme.com/Imagebank>).

As CTM são encontradas primariamente imersas no estroma medular. Sua frequência é muito baixa sendo estimada em 0,125% de todas as células de uma MO. Muitos fatores podem influenciar no número de células, tal como a presença de patologias, uso de medicamentos e idade do doador. A quantidade de CTM encontradas na medula óssea fetal, por exemplo, é cerca de 25 vezes mais do que na medula de uma pessoa adulta (Balduino, 2002).

As células mesenquimais oriundas da medula óssea humana expressam CD105, SH-3, STRO-1 e CD13, marcadores importantes para sua identificação, enquanto são CD45 negativas, ou seja, não expressam este marcador típico de células hematopoéticas. Em estudos clonais de

diferenciação estas mesmas células progenitoras apresentaram potencial osteogênico, condrogênico e adipogênico (Beyer Nardi, 2006).

Em 2006, Balduino descreveu “que as células-tronco mesenquimais da medula óssea humana adulta que expressam o marcador de superfície CD146 (M-CAM, M-cell adhesion molecule) são multipotentes e apresentam potencial de autorrenovação”, indicando desta forma a existência e caracterização de uma legítima célula-tronco mesenquimal (Balduino, 2002).

2.3.2. Cordão Umbilical

O cordão umbilical é um anexo placentário exclusivo dos mamíferos que permite a ligação entre o embrião e a placenta e é responsável, entre outras coisas, pela nutrição e respiração fetal. É formado por duas artérias e uma veia envoltas por um material gelatinoso de composição conjuntiva denominada de geleia de Wharton (Erices, 2000).

Na última década, um número considerável de estudos comprovou que o sangue de cordão umbilical humano (SCU) possui células-tronco hematopoéticas e um *pool* de células-tronco mesenquimais. As CTM apresentam potencial de proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens, semelhantemente ao observado nas células da medula óssea. No entanto, como estas células correspondem a apenas uma pequena parcela das células mononucleares presentes em cada amostra, é necessário isolá-las e multiplicá-las *in vitro* para se ter um alto rendimento celular (Goodwin, 2001; Panepucci, 2004). Em relação às CTM de medula óssea, as de cordão têm como desvantagens a necessidade da criopreservação para um possível uso

autólogo no futuro e um baixo volume de amostra a ser coletado. Estudos sobre criopreservação e novas substâncias criopreservantes faz-se necessários para diminuir a toxicidade e a possível diferenciação que estes agentes possam causar nas células congeladas. Dentre as vantagens, a coleta do cordão não envolve riscos para a mãe ou para o bebê. Ainda em comparação com as células da medula óssea, no sangue de cordão existe frequentemente um número maior de células-tronco por volume coletado com alta taxa de proliferação e estas células, quando transplantadas, são menos suscetíveis ao desencadeamento de reatividade alogênica no receptor (McGuckin, 2004; Park, 2006). Vale ressaltar que o sangue de cordão umbilical, na realidade, é o sangue fetal que fica retido na placenta no momento do nascimento, quando é interrompida a circulação materno-fetal. No próprio cordão, a geleia de Wharton constitui outra fonte importante de CTM (Hwai-Shi, 2004).

Sabe-se muito pouco a respeito das células-tronco mesenquimais presentes no sangue periférico. Porém, existem trabalhos que confirmam a presença destas células; presume-se que estejam em quantidades ínfimas o que dificultaria muito o seu isolamento e cultivo (Zvaifler, 2000).

2.3.3. Tecido Adiposo

Recentemente o tecido adiposo adulto foi reconhecido como uma fonte alternativa, acessível e rica de CTM. Assim como a medula óssea, tem origem no mesoderma embrionário e possui um estroma que pode ser facilmente isolado, formado por células endoteliais, células de músculo liso e

adipócitos. Todas estas células estromais são enzimaticamente digeridas e as CTM são isoladas depois de centrifugação para retirada do material gorduroso e restos celulares. A frequência de CTM neste tecido é de aproximadamente 2×10^8 células para cada 100 ml de líquido lipoaspirado enquanto que a média fica entre 2% das células nucleadas totais. As CTM de tecido adiposo apresentam fenótipo similar aos das CTM de medula óssea, sendo que o CD105, CD117 e CD133 são marcadores utilizados para identificar o potencial de diferenciação (Aust, 2004; Fraser, 2006).

Expressam também os marcadores CD29, CD44 e CD40e igualmente às células de medula óssea. Um marcador que se encontra mais acentuadamente expresso nestas células, quando também comparado as CTM de MO, é a proteína de adesão ICAM-1. Esta proteína pertence à superfamília dos genes da imunoglobulina que são expressos em resposta aos mediadores inflamatórios e citocinas. As células-tronco mesenquimais de tecido adiposo são capazes de originar diferentes linhagens mesenquimais e também não mesenquimais (Safford, 2002; Rangappa, 2003; Planat-Bernard, 2004; Strem, 2005).

2.3.4. Líquido Amniótico

O líquido amniótico provém do organismo materno e fetal em proporções variáveis de acordo com a idade gestacional. Entre as suas principais funções destacam-se o crescimento externo simétrico do embrião, barreira contra infecções, isolamento e não aderência entre embrião e âmnio, proteção contra traumatismos, controle da temperatura corporal e

veículo para que o feto se mova livremente, contribuindo assim para o desenvolvimento muscular (Sadler, 2005). Os principais componentes presentes neste líquido apresentam-se em suspensão e em dissolução na água que é seu principal constituinte. Entre os elementos em suspensão encontram-se células esfoliadas do âmnio, principalmente do feto, assim como lanugem e gotículas de gordura. Como elementos de dissolução são encontrados substâncias orgânicas e inorgânicas. Os eletrólitos representam as substâncias inorgânicas, sendo alguns relacionados com a idade gestacional. Entre os compostos orgânicos estão proteínas, entre elas a alfa-fetoproteína; aminoácidos, lipídios, carboidratos, enzimas, bilirrubina, hormônios e prostaglandinas (Bishop, 1996; Belfort and Orland, 1998; Rezende, 1998).

O líquido amniótico apresenta células escamadas que delimitam a cavidade amniótica e também células provenientes do feto. A base morfológica da citologia amniótica está estritamente relacionada ao feto, decorrendo da necessidade de ser conhecido o desenvolvimento intra-uterino da pele, das mucosas respiratórias e digestivas, das coberturas geniturinárias e dos demais elementos que tenham contato com este líquido. Torna-se necessária ainda a investigação da fisiologia de cada epitélio, seus ritmos de crescimento e maturação (Reece, 1996; Rezende, 1998).

Encontram-se na boca, no esôfago e no ânus do feto células do epitélio escamoso estratificado e sem cornificação. O restante do tubo digestivo, do estômago ao reto e nas glândulas anexas, apresenta composição de epitélios glandular, cúbico ou cilíndrico, secretores ou não. Na árvore

respiratória encontra-se somente o epitélio respiratório (epitélios cilíndrico, pseudo-estratificado e ciliado). Nas vias urinárias há, fundamentalmente, epitélio transicional. Na genitália masculina, encontram-se epitélio glandular (próstata), canais deferentes e ejaculadores, epidídimo e túbulos testiculares, enquanto na genitália feminina é possível encontrar os epitélios vaginal, uterino e das trompas. Com isso, a citologia e a citopatologia amniótica podem diagnosticar: maturidade fetal, gestação de alto risco, morte fetal, infecções ovulares e sexo fetal (Rezende, 1998; Cunningham, 1998).

Benavides *et al.*, em estudo para determinar o valor citológico do líquido amniótico no diagnóstico pré-natal do sexo, demonstrou uma significativa diferença na citologia de fetos masculinos e femininos, já que nestes últimos foi encontrado um maior número de células, com predomínio de células intermediárias basófilas e células naviculares, em comparação com a menor quantidade de células e predomínio de células escamosas intermediárias e superficiais acidófilas com ausência de células naviculares nos fetos masculinos (Benavides, 1983).

Sabe-se que o líquido amniótico, longe de ser um meio inerte, estagnado e excremental, está em constante intercâmbio com a mãe e o feto (Figura 7). A água desse líquido renova-se com rapidez (300 a 500 ml/h); em outras palavras, a cada 2 ou 3 horas um volume de água, equivalente ao líquido amniótico é renovado (Reece, 1996).

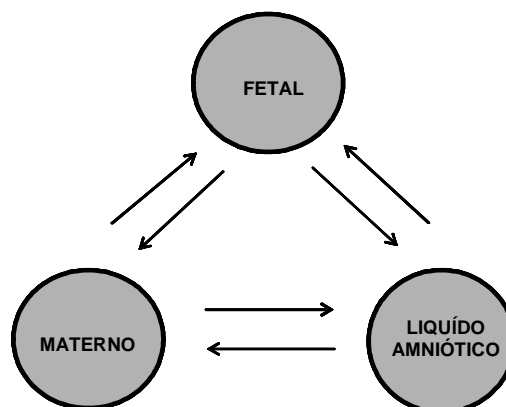


Figura 7 - Sistema de 3 compartimentos: materno, fetal e amniótico, cada um em processo dinâmico de comunicação com os demais.

2.3.5 Produção do Líquido Amniótico

2.3.5.1. Primeira metade da gravidez

O líquido amniótico, no início da gravidez é isomolar com o plasma fetal e o materno, e provavelmente representa transudato do trofoblasto ou do feto. Água e eletrólitos transitam livremente através da pele antes da queratinização epitelial (entre 20^a e 25^a semanas) e esse caminho representa a maior via de formação do líquido amniótico na primeira metade da gravidez. Os rins fetais começam a secretar urina em torno da 10^a – 11^a semana de vida fetal (12^a–13^a semanas de amenorreia). A partir deste período desempenham papel importante na composição do líquido amniótico (Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

2.3.5.2. Segunda metade da gravidez

Durante o restante da gravidez, os rins fetais são as maiores fontes de líquido que entra na bolsa amniótica. O débito urinário na 20^a semana é de aproximadamente 5 ml/h (120 ml/dia), chegando a 51 ml/h (1.224 ml/dia) no

termo. Os pulmões fetais também contribuem significativamente para a formação do líquido amniótico. No final da gravidez cerca de 300 – 400 ml/dia de líquido deixam os pulmões fetais através da traquéia. O movimento do líquido no sentido pulmões para a cavidade amniótica pode ser comprovado pela presença de fosfolípidios pulmonares (surfactantes) no líquido amniótico (Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

2.3.5.3. Reabsorção

A deglutição fetal é o mecanismo de reabsorção mais importante do líquido amniótico. A quantidade de líquido deglutido é de 7 ml/dia na 16^a semana, chegando a 500 ml/dia no termo. Caso o feto seja incapaz de deglutir (como na obstrução do aparelho gastrointestinal ou em certas afecções neurológicas) usualmente, mas nem sempre, desenvolve-se o polidrâmnio. O volume de líquido deglutido (500 – 1.000 ml/dia) é significativamente inferior à produção de urina fetal (800 – 1.200 ml/dia) e, no entanto, em condições normais não ocorre a polidramnia. A via transmembranosa (fluido atravessando corioâmnio e entrando na circulação materna da parede uterina) é praticamente desprezível, chegando a 10 ml/dia na gestação de termo. Também ocorre reabsorção de líquido no local onde o âmnio adere à placa coriônica na superfície fetal da placenta (via intramembranosa). Água, sódio, cloreto, ureia e creatinina transitam rapidamente por essa superfície de trocas.

Em condições normais a reabsorção de líquido pela via intramembranosa é de 200 – 500 ml/dia, aproximadamente a diferença de

volume de fluxo entre a deglutição, a produção de urina e de líquido pulmonar. Conseqüentemente, a via intramembranosa desempenha papel importante na regulação do volume e da composição do líquido amniótico. É importante considerar o volume do líquido amniótico, sendo que este se relaciona com algumas patologias como polidrâmnio e oligodrâmnio. Acredita-se existir um aumento semanal médio de 20 ml entre a 10^o e 14^o semanas e de 50 ml daí em diante, até aproximadamente a 28^o semana. O líquido amniótico alcança seu volume máximo em redor da 38^o semana, decrescendo até o nascimento.

O polidrâmnio é o acúmulo patológico de líquido amniótico, associado a uma elevada morbimortalidade materna e perinatal. Considera-se polidrâmnio quando o volume amniótico ultrapassa os 2.000 ml, sendo que as causas principais que levam a este aumento são malformação fetal, distúrbios genéticos, diabetes melito, sensibilização Rh e infecções congênitas (Nazareth, 1982).

O oligodrâmnio é definido como uma diminuição na quantidade de líquido amniótico (menos de 400 ml), constituindo uma grave complicação da gravidez. As anomalias fetais resultantes desta condição são na maioria das vezes malformações do sistema urinário. (Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

Dois técnicas são utilizadas no estudo do líquido amniótico durante a gravidez: amniocentese e amnioscopia. Amniocentese consiste na introdução de uma agulha longa através da parede abdominal da mãe para a retirada do líquido amniótico, sendo que o volume do líquido retirado

depende da idade do feto e do motivo do exame. A amnioscopia é um método endoscópico de observação da câmara amniótica, permitindo observá-la pelo canal cervical e através das membranas do pólo inferior do embrião.

A amniocentese e a subsequente análise do líquido amniótico são utilizadas para detectar principalmente: doenças congênitas, defeitos de tubo neural, idade gestacional e maturidade fetal pulmonar, sendo indicada principalmente a mulheres acima de 35 anos devido à maior probabilidade de anormalidades cromossômicas fetais (síndrome de Patau e Edwards), além de tornar possível o estudo do DNA (paternidade). A amniocentese é um procedimento seguro, com risco de perda fetal geralmente menor do que 1%, uma vez que o método pode ser oferecido às mulheres selecionadas após serem revistos os riscos e os benefícios envolvidos. É importante ressaltar que muitos defeitos do nascimento não podem ser detectados pela amniocentese (Golbus, 1979).

O diagnóstico de anormalidades genéticas no líquido amniótico é realizado através de cultura de células. A amostra é obtida entre 14 e 20 semanas de gestação, uma vez que as células coletadas são cultivadas e lisadas para análise cromossômica, determinando-se seu conteúdo enzimático para avaliar defeitos de metabolismo (Tabor, 1986; Pinto *et al*, 1987).

Para o acompanhamento da gravidez é importante a determinação da idade gestacional. Quatro parâmetros têm sido usados para esta determinação: creatinina, que reflete a massa muscular fetal; ureia, que está

relacionada com as proteínas; ácido úrico, que está relacionado com os nucleotídeos; e osmolalidade, que está relacionada com todos os anteriores. O problema básico do uso destes parâmetros é a alta taxa de variação na concentração e a falta de especificidade, impossibilitando um diagnóstico preciso. A ultrassonografia tornou-se a melhor ferramenta para estimar a idade gestacional, o tamanho e o sexo fetais (Belfort, 1993; Rezende, 1998).

2.4. Amniocentese

A amniocentese realizada a partir da décima quarta semana é um dos métodos mais difundidos para a obtenção de material fetal com finalidade de diagnóstico pré-natal de alterações genéticas, embora, historicamente, ela tenha surgido na mesma época que se desenvolveram os primeiros trabalhos de coleta dos vilos coriônicos. Isso se deu, provavelmente, à má visualização da área para sua obtenção. Além disso, a segurança e o baixo índice de complicações decorrentes da amniocentese fizeram com que ela se tornasse rotina na maioria dos serviços hospitalares (Nazareth, 1981).

O risco de sérias complicações, incluindo perda fetal, varia nos diferentes centros de coleta entre 0,2% a 0,5%. Essa variação deve ser decorrente do método de monitoramento aplicado à punção. Todo o procedimento de punção deverá ser realizado com toda a assepsia de um teatro operatório, incluindo o uso de material esterilizado e o revestimento da sonda de ultrassom com invólucro estéril uma vez que ela acompanhará a introdução da agulha até o lago amniótico escolhido. Previamente à punção, o feto deve ser minuciosamente avaliado em sua proporcionalidade através

das medidas dos diâmetros biparietal, occípito-frontal, torácico e abdominal, bem como o tamanho do fêmur. Deve-se, também, analisar seus movimentos, os membros, a coluna vertebral, o cérebro, coração, rins, estômago e, eventualmente, bexiga, número de vasos e implantação do cordão, além da hidramnia (Pinto *et al*, 1987; Golbus, 1979).

Esse exame tem a intenção de detectar qualquer anormalidade fetal prévia à amniocentese. Paralelamente, esse exame prévio poderá determinar o local ou os locais de maior facilidade para punção por possuírem o maior lago amniótico, serem mais distantes do polo cefálico e, preferencialmente, longe dos núcleos placentários. Se para realizar a punção houver necessidade de transpassar a placenta, isto não implica em riscos maiores. O monitoramento é muito importante de modo a dar a certeza da trajetória a ser percorrida pela agulha, o que implica em menor probabilidade de obter líquido com sangue ao evitar que a agulha atravesse a cavidade amniótica e puncione vasos ou a placenta, localizados posteriormente. O monitoramento evita, também, que a agulha seja introduzida mais de uma vez, o que diminui a possibilidade de lesões fetais (Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

Poderá ocorrer, mesmo com as precauções, a perda de líquido amniótico, aborto ou, ainda, amnionite. Por esse motivo, a agulha só deve vir à mão do puncionador quando já se conhecer exatamente o ponto em que ela será introduzida. Após a aspiração de uma a três seringas de líquido amniótico, o mandril não deve ser reintroduzido para retirada da agulha, uma vez que o mesmo ficou exposto ao ar por alguns minutos. Se houver

necessidade de se utilizar a agulha por uma segunda vez, esta deve ser trocada. A amnionite também pode ser decorrente das bactérias oriundas do organismo materno, bem como as localizadas entre a pele e a bolsa amniótica.

Outras complicações menores são as lesões fetais que aparecem ao nascimento na região tocada pela agulha. Se não monitorizadas pelo ultrassom, poderão ocorrer lesões graves, dependendo da região atingida pela agulha, tendo já sido descrita gangrena de membro e lesão de articulação de joelho (Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

A punção com sangue é, em grande parte das vezes, decorrente das dificuldades de se atingir o lago amniótico desejado. Ela é mais frequente quando se introduz por duas vezes a agulha. Quando for um vaso da parede anterior do útero, geralmente é somente a primeira seringa que se contamina com o mesmo. Quando é da parede posterior, resultante da perfuração de vasos dessa região, pode-se notar pelo ultrassom o borbulhar para a cavidade amniótica. O perfeito monitoramento da posição da ponta da agulha pode diminuir muito esse acontecimento.

Não é raro, após a introdução da agulha, notar sua ponta no lago amniótico e, contudo, não obter líquido. Isto pode ser a agulha que está empurrando a membrana amniótica sem, no entanto, perfurá-la. Uma simples retração da agulha e nova introdução mais abrupta ou com um movimento de rotação da mesma obter-se-á o líquido desejado sem necessidade de nova locação. A seringa deixada repousada por alguns minutos esclarecerá se o sangue foi um resultado da punção ou se já se

encontrava no líquido amniótico. Quando ele for devido à punção, o sangue se sedimentará rapidamente e o sobrenadante será amarelo límpido. Se o sangramento for antigo, o sobrenadante continuará vermelho.

Como a probabilidade de crescimento celular diminui nos líquidos com sangue, pode haver necessidade de nova punção. Na repetição o líquido ainda estará com sangue, mas, seguramente, com menos hemácias para atrapalhar o crescimento celular. Cerca de 95% das vezes o sangue contaminante é de origem materna e, se devido à punção, não trará consequências ao prognóstico da gestação. Os líquidos com presença de sangue em que não houve punção anterior são de pior diagnóstico e podem ser consequência de aberrações cromossômicas ou da ingestão de medicamentos adversos como a prostaglandina ou mesmo citostáticos, para tratamento de câncer.

O líquido meconial é associado a sangramentos vaginal anterior à punção ou à punção anterior de vilosidades coriônicas. Sua cor é, geralmente, marrom claro ou, mais raramente, marrom esverdeado. Seu reconhecimento é muito fácil a nível laboratorial por apresentar um grande sedimento. Quando tal líquido é posto em cultura, as micropartículas do mecônio aderem fortemente ao fundo do tubo e não permitem a adesão de células vivas, que normalmente já são poucas (Franchi-Pinto, 1994).

Do ponto de vista laboratorial, os erros diagnósticos a partir do líquido amniótico são bem mais raros quando comparados ao exame das vilosidades coriônicas. As raras falhas descritas se referem à contaminação

com células maternas (Milunski, 1979; Cha e Zugaib, 1993; Reece, 1996; Sadler, 2005).

3. CÉLULAS-TRONCO DO LÍQUIDO AMNIÓTICO

A descoberta de células progenitoras no fluido amniótico foi inicialmente relatada em 1993, quando células pequenas, nucleadas e arredondadas, identificadas como células progenitoras hematopoéticas, foram encontradas antes da 12^a semana de gestação; estas células eram, possivelmente, provenientes da vesícula vitelina (Torriceli, 1993). Em 1996, sugere-se a presença de células de linhagem não hematopoética, com potencial multilinhagem, no líquido amniótico, e demonstra-se a conversão miogênica destas células (Streubel, 1996). Também se confirma a origem fetal das células mesenquimais, coletadas do líquido amniótico e cultivadas *in vitro*, por meio da tipagem molecular dos antígenos leucocitários humanos (HLA) (Erich, 1991).

Uma classificação das células do líquido amniótico une critérios morfológicos, bioquímicos e relacionados ao crescimento celular. As células do líquido amniótico são provenientes, em sua maior parte, do epitélio e dos tratos digestivo e urinário do feto e podem ser classificadas em: tipo E (epitelióides), derivadas da pele e urina fetais; tipo AF (amniotic fluid), específicas do líquido amniótico, que produzem estrógeno, progesterona e gonadotrofina coriônica humana, sendo derivadas do âmnion e do trofoblasto; tipo F (fibroblásticas), derivadas do tecido conjuntivo fetal. As células tipo AF e E aparecem no início da cultura celular enquanto as células

tipo F aparecem posteriormente; porém, somente as células do tipo AF e F persistem com o tempo, enquanto as do tipo E desaparecem (Milunsky, 1979; Laundon, 1981; Prusa, 2002).

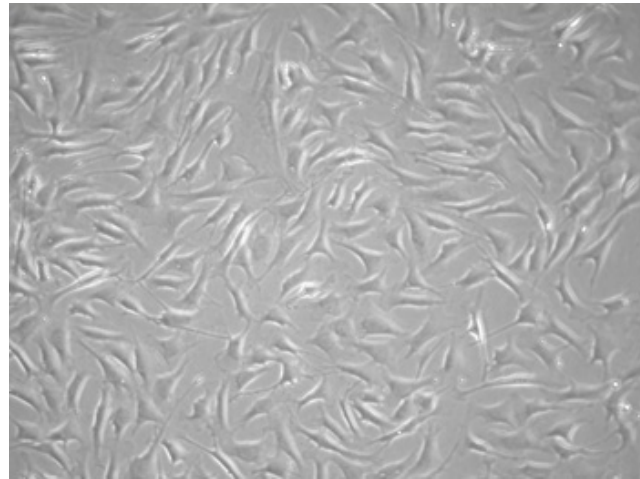


Figura 8 - Células-tronco do líquido amniótico em cultura.

Contudo ainda faltam estudos mais detalhados acerca das características biológicas das células-tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico (Figura 8), como expansão e diferenciação, e processos de criopreservação para que as mesmas possam armazenadas adequadamente e usadas posteriormente.

4. CRIOPRESERVAÇÃO

A necessidade dos pesquisadores e de seus laboratórios em obterem resultados reprodutivos e de dar continuidade aos seus estudos requerem uma grande e imediata quantidade de células viáveis que estejam estáveis geneticamente. Porém o cultivo serial de células em laboratório, além de representar despesas econômicas e de tempo, aumenta o risco de

contaminações e de mutações genéticas nas mesmas. Então se faz necessário o uso de técnicas que permitam estabilizar estas células em temperaturas ditas criogênicas.

A estabilização e a manutenção de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido ou sua fase de vapor (-196C), é denominada de criopreservação enquanto que o estudo do comportamento da vida nestas condições é alvo de interesse de um ramo da biologia chamado de criobiologia. Os avanços obtidos nesta área permitem o congelamento de uma variedade de tipos celulares, desde microorganismos, células isoladas de tecidos, organismos multicelulares simples e outros mais complexos, como os embriões (Graham, 1996).

Recentemente os avanços no campo da terapia celular, com a descoberta das células tronco e suas propriedades, provocaram uma reviravolta no meio científico. Todas as suas características particulares e seu alto potencial terapêutico trouxeram também a necessidade de novas pesquisas relacionadas à criopreservação. A necessidade da manutenção das características das células-tronco, chamada em inglês de "*stemness*", somada a alta viabilidade requerem a utilização de novos compostos criopreservantes e novas técnicas de congelamento. A criação de bancos de células-tronco ao redor do mundo, principalmente as que são coletadas de material fetal, como as de cordão umbilical, placenta e líquido amniótico também corroboram este anseio, visto que precisam ser armazenadas por longos períodos até que sejam utilizadas em transplantes de contexto autólogo.

O processo de congelamento envolve fenômenos físico-químicos complexos que, mesmo após anos de estudos, permanecem incompreendidos. Diversos estudos criobiológicos tentam descobrir o que ocorre exatamente no resfriamento de células viáveis e como os danos causados podem ser revertidos. Como a água é o principal componente dos organismos e precisa estar disponível para que haja vida, todo o metabolismo celular para quando a água que forma seu sistema se converte em gelo. As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo que determina a retirada de água do sistema, levando ao desequilíbrio osmótico com consequente desidratação celular (Wolfe, 2001).

O gelo vai se formando em diferentes momentos no processo de resfriamento. Durante um processo lento de congelamento, o gelo se forma primeiramente no espaço extracelular e depois no interior da célula. Com isso, a água tende a deixar o compartimento celular para a porção externa provocando um grande desequilíbrio osmótico (desidratação celular). O aumento na concentração de soluto dentro, bem como fora da célula também tem um papel chave na sobrevivência celular já que pode gerar lise. Um congelamento rápido, por sua vez, minimiza os efeitos da concentração do soluto, já que ocorre formação de gelo homoganeamente, embora haja uma maior concentração de cristais de gelo intracelulares. Na maioria dos casos, as células submetidas à formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (lesão mecânica) (Wolfe, 2001; Baudot, 2002).

A permeabilidade da membrana celular também está intimamente ligada à taxa de perda de água durante o congelamento. Células mais permeáveis são mais tolerantes a congelamentos rápidos do que células menos permeáveis.

Sob a temperatura de 5°C, a água intra e extracelular permanece super refrigerada e não cristaliza. No entanto, entre as temperaturas de -5 e -10 °C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super-refrigerado, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular (Figura 9 - Farrant, 1980; Wolfe, 2001).

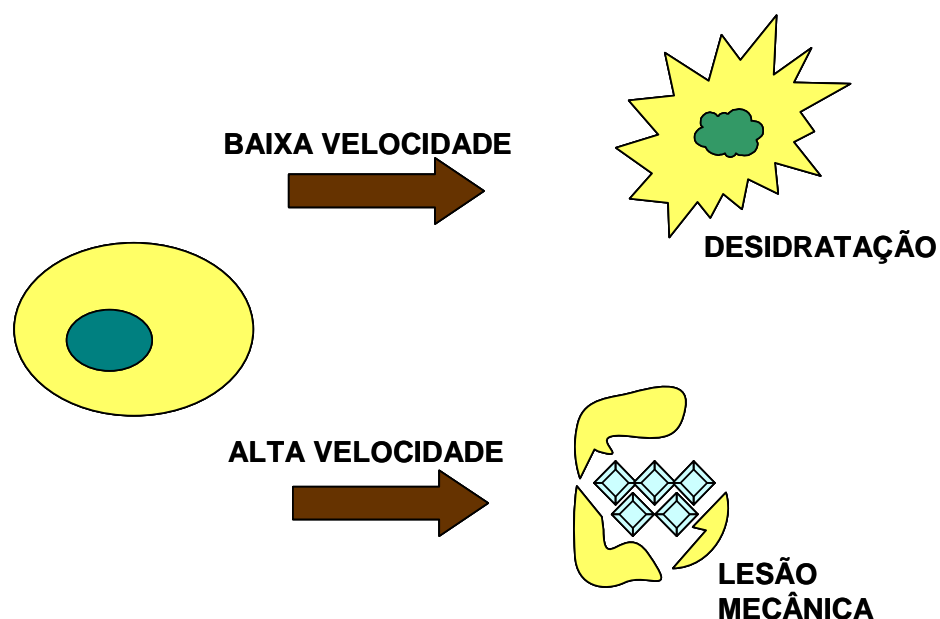


Figura 9 – Dois principais tipos de lesões provocadas pelo congelamento celular

Neste momento, a curva de resfriamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. A desidratação severa

promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula determinando colapso da membrana. A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar grandes canais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática. Geralmente, uma taxa de resfriamento de 1°C por minuto é a mais indicada (Mazur, 1972; Dalimata, 1997).

Para anular ou minimizar estes efeitos danosos causados às células durante o congelamento faz-se necessário a utilização de uma substância, que reverta a formação de cristais de gelo e o problema osmótico, chamada de agente criopreservante.

Os criopreservantes devem ser adicionados ao meio para que haja proteção às células durante o congelamento/descongelamento. Estas substâncias são importantes para evitar a formação de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água, assim como servir como tampão ajustando as alterações do pH. O mecanismo de ação dos crioprotetores não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que estes reduzam o ponto de congelamento da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo.

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que possuem afinidade pela água devido à presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição,

os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (Baudot, 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando ambiente menos prejudicial às células. A sua ação interfere nas mudanças físico-químicas que sofrem as células durante o processo de criopreservação. Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água. Por conseguinte, estas moléculas atravessam a membrana até atingir o equilíbrio numa velocidade menor do que a água, que ocasiona o enrugamento da célula devido à rápida saída de água para diluir a elevada concentração externa, e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições, a água retorna ao interior da célula até atingir o equilíbrio, que resulta na retomada do seu tamanho normal (Graham, 1996; Holt, 2000).

4.1.Criopreservantes Intracelulares

Os crioprotetores intracelulares ou permeantes atuam através de suas propriedades coligativas, reduzindo o ponto crioscópio intracelular. Desta forma, maior quantidade de água vai permanecer no estado líquido, quando submetida à baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e proporcionando, assim, um ambiente menos deletério à célula (Watson, 2000). Vários crioprotetores intracelulares já foram utilizados para criopreservação celular como glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propilenoglicol, etanol, assim como as combinações deles (Ball, 2001).

4.1.1. Dimetilsulfóxido (DMSO)

É um líquido orgânico altamente polar usado em larga escala como solvente que apresenta uma vasta gama de ações farmacológicas, entre elas: analgésica e anti-inflamatória. Foi utilizado pela primeira vez como criopreservante por Lovelock e Bishop em 1959, apresentando como vantagem uma rápida penetração no interior das células. Para que um soluto atue desta maneira, é necessário que seja solúvel à membrana, assim como em água. Este crioprotetor apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danifica e inviabilizam as células, tornando os crioprotetores penetrantes geralmente tóxicos para as células (Wolfe, 2001).

O DMSO é o criopreservante mais amplamente utilizado e bem aceito nos diversos centros de transplante de células. Relativamente não apresenta toxicidade aos pacientes infundidos quando em baixas concentrações, porém infusões de volumes com altas quantidades estão ligadas ao aparecimento de efeitos adversos indesejáveis (em cerca de 20% dos pacientes). Hipotensão severa pode ocorrer após a infusão intravenosa de DMSO presumivelmente por sua ação vasodilatadora mediada por histamina (David, 1972). Descamação cutânea, dispneia, desconforto abdominal, náuseas e diarreia também são atribuídos ao efeito da histamina liberada após contato com o DMSO (Roeley, 1992). Outros efeitos colaterais associados a este criopreservante são: dores de cabeça, febre, hemólise, encefalopatia e sintomas cardiovasculares (Davis, 1990; Rapoport, 1991; Stroncek, 1991).

Alguns trabalhos postulam que o DMSO pode ter efeitos tóxicos tanto para as células-tronco hematopoéticas quanto para as células-tronco mesenquimais (Zaheer, 1994). Por outro lado, certos grupos de pesquisa reportam a diferenciação de CTM em células neuronais após contato com meio indutor contendo DMSO a 2% (60). As células diferenciadas marcaram positivamente para enolase neuronal específica (NSE) e neurofilamento-M (NF-M), além de apresentarem morfologia típica de células nervosas (Woodbury, 2000). Estes achados levantam dúvidas quanto à utilização do DMSO na criopreservação, visto que além da toxicidade às células e aos pacientes, pode levar à diferenciação indesejada das CTM durante as etapas de congelamento e descongelamento.

4.1.2. Glicerol

A primeira criopreservação prática com utilização de glicerol foi realizada por Polgue e colegas (Polgue, 1949) em células espermáticas e, em seguida, por Smyth em hemácias. Logo depois o glicerol mostrou-se efetivo também no congelamento de plaquetas (Arnaud, 1989). Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que este crioprotetor penetra na membrana celular através de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas. Além do seu efeito osmótico, o glicerol parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo

evidências de que se liga aos fosfolípidos, reduzindo a fluidez da membrana, como interagindo com ligações proteicas e glicoproteicas da membrana.

O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores, como desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos atuando diretamente na membrana plasmática, além de alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (Alvarenga, 2000). Não há estudos que demonstrem a toxicidade ou poder de diferenciação do glicerol na criopreservação de células-tronco.

4.2. Criopreservantes Extracelulares

Algumas substâncias, como lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção das células durante o processo de congelamento, sem que para isso necessitem penetrar no seu interior. Estas substâncias podem ser encontradas na gema de ovo, no leite, em alguns açúcares e na albumina sérica bovina. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL), por exemplo, aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, restaurando a perda de fosfolípidos e, aparentemente, induzindo alteração transitória de sua composição, o que previne a sua ruptura (Moussa, 2002).

Os açúcares atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula, de

modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo. Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares poderiam atuar também como um substrato energético para a célula durante o período de incubação, conferindo proteção à membrana plasmática durante o congelamento/descongelamento através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolípídeos (Aisen, 2002).

Geralmente os dissacarídeos são mais efetivos em estabilizar a bicamada da membrana do que os monossacarídeos, mantendo sua capacidade do transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e deixando os lipídeos numa fase fluida na ausência de água (Anchordoguy, 1987). Outros compostos com propriedades crioprotetoras não-penetrantes: polivinilpirrolidona e ácido hidroxietílico.

4.2.1. Sacarose

Trata-se de um dissacarídeo não reduzido formado pela junção de uma molécula de glicose e outra de frutose através de ligações glicosídicas. Sua biossíntese nos vegetais provém dos precursores glucose-1-fosfatase e frutose-6-fosfato. A síntese em laboratório foi realizada primeiramente, em 1953, por Lemieux (Lemiaux, 1953).

Tem sido usado amplamente como agente criopreservante, estabilizante ou excipiente nos processos de desidratação e congelamento. Plantas, leveduras e pequenos animais acumulam grandes quantidades

deste açúcar para proteger a integridade de suas membranas em períodos de frio intenso (Chen, 2001).

O mecanismo exato de atuação da sacarose como agente protetor durante os processos de congelamento não está totalmente compreendido. Timasheff e colaboradores evidenciaram que os dissacarídeos são capazes de estabilizar proteínas durante o resfriamento, já que estes açúcares são excluídos das superfícies das membranas em soluções aquosas (Arakawa, 1982).

Outro ponto favorável à utilização da sacarose e sua baixa ou nenhuma toxicidade celular em concentrações normais. Porém ainda há poucos estudos relatando como responderiam as células-tronco mesenquimais criopreservadas com este açúcar no que diz respeito à capacidade de promover diferenciação e viabilidade das mesmas.

4.2.2. Trealose

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas unidades de glicose. Foi descoberta em 1832 por Wiggers que estudava fungos presentes no centeio e isolada em 1859 a partir de secreções chamadas de *trehala manna*, o que lhe valeu o nome, produzidas por insetos gorgulhões. É encontrada naturalmente em plantas, animais e microrganismos estando ligada a capacidade destes em resistirem aos estados de seca ou frio extremo, habilidade esta conhecida por anidrobiose (Crowe, 1992). Suas propriedades estabilizantes conferem-na um grande número de aplicações biomédicas, cosméticas e farmacêuticas (Colaco, 1992).

Dentre os mecanismos propostos para seu efeito crioprotetor está a proteção às membranas e proteínas feita através da hidrogenação dos grupos fosfolipídicos. Esta interação aumenta os espaços entre as estruturas e diminui a temperatura de transição dos fosfolipídeos (Rudlph, 1985).

A trealose também foi usada para criopreservar hemácias já que sua utilização diminui a taxa de lise celular e as concentrações de hemoglobina livre no meio (Chen, 2001). O estudo de Rodrigues e colaboradores demonstrou que a adição dos dissacarídeos, frutose e sacarose, a uma pequena concentração de DMSO pode ser utilizada com uma boa taxa de recuperação de células tronco hematopoéticas e diminuição dos efeitos colaterais da reinfusão em pacientes. Ainda faltam estudos consistentes mostrando o efeito da criopreservação com trealose em células-tronco mesenquimais.

4.3. Métodos de Congelamento

4.3.1. Congelamento Padrão (Clássico)

Este método consiste no congelamento lento até uma temperatura previamente definida (chamada temperatura de pré-congelamento, por volta de 2 a 8 °C em geladeira e em seguida -40 °C em freezer) seguida de imersão direta em nitrogênio líquido. À medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0 °C, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento (“supercooling”) e posteriormente ocorre a formação de gelo no meio extracelular. Os componentes da célula super-resfriada permanecem descongelados possivelmente porque a membrana

plasmática age como uma barreira, prevenindo que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem na célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma. Os eventos físicos subsequentes irão depender da velocidade de congelamento. Caso o congelamento seja lento, a célula supercongelada perde água porque a pressão de vapor da água na célula supera aquela do exterior celular congelado, e com a progressiva redução da temperatura a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células. Este fenômeno é denominado de desidratação induzida por congelamento (“freeze-induced desiccation”) (Medeiros, 2002).

Por outro lado, se a célula for congelada muito rapidamente a desidratação por congelamento não ocorre, as células se tornam cada vez mais super-resfriadas e eventualmente a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, congela-se, formando cristais de gelo que causam injúria mecânica às células (Steponkus, 1984). Em condições experimentais apropriadas, quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou para se tornar gelo no meio externo e a exposição à temperatura do nitrogênio líquido tem muito pouco efeito adverso (Sakai, 1987). O método de congelamento lento é um procedimento complexo no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm um papel chave na preservação da viabilidade das células (Holt, 2000).

4.3.2. Congelamento Gradual (Automatizado)

Neste tipo de congelamento as amostras ao serem criopreservadas são resfriadas a uma temperatura constante através de uma taxa pré-determinada em um sistema automatizado programável antes que sejam armazenadas no nitrogênio líquido. Geralmente a taxa utilizada para congelamento consiste em ciclos de resfriamento de -1 a -3 °C por minuto até que as amostra atinjam -100°C.

5. Descongelamento

O descongelamento, ao contrário do que se imagina, também é uma etapa crítica para o bom desempenho de uma prática de criopreservação. Durante esta fase pode haver formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, as células podem ser danificadas pelos mesmos mecanismos já discutidos anteriormente. Estes cristais de gelo prejudiciais podem se formar por duas maneiras distintas. Primeiro caso, pelo congelamento da água liberada pela devitrificação, ou seja, a água que estava presente nas células e não se congelou durante a redução da temperatura, mas sofreu vitrificação. Durante a devitrificação o aumento da temperatura leva a liberação dessa água na forma líquida que pode se congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida. No segundo caso, cristais de gelo diminutos que possam ter se formado durante o congelamento podem expandir, devido ao aumento da temperatura, formando cristais maiores, os quais então causam rompimento e morte das células.

Na maioria dos casos descongelamento rápido por imersão em água ou meio de cultura líquido a 35-40 °C tem garantido os melhores resultados. Nesta faixa de temperatura o descongelamento é rápido o bastante para evitar a fusão de micro-cristais formados no congelamento ou a formação de novos cristais pela água liberada pela devitrificação (Dhodapkar, 1994; Wolfe, 2001).

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi isolar, caracterizar as células-tronco mesenquimais (CTM) do líquido amniótico humano proveniente do segundo trimestre de gestação padronizando, assim, protocolos de isolamento, cultivo e expansão para as mesmas e, também, avaliar métodos de congelamento com diferentes crioprotetores para a sua criopreservação.

Mais detalhadamente, os objetivos podem ser descritos como:

1. Comprovar a presença de células-tronco no líquido amniótico humano coletado por amniocentese no segundo trimestre de gestação;
2. Determinar a melhor forma de isolamento, cultivo e expansão destas células em cultura;
3. Caracterizar a população celular isolada através da expressão de genes ligados à indiferenciação e análise de marcadores de membrana;
4. Avaliar a plasticidade celular por meio de diferenciações em linhagens osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica;
5. Testar dois métodos de criopreservação bem como diferentes criopreservantes para manutenção da viabilidade e principais características das CTLA após estocagem em nitrogênio líquido.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. OBTENÇÃO DA AMOSTRA (AMNIOCENTESE)

As amostras de líquido amniótico (LA) foram obtidas por meio da técnica de amniocentese em pacientes submetidas aos exames de cariotipagem e vitalidade fetal realizados no segundo trimestre de gestação (12° a 18° semanas) no ambulatório do Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMUSP. O cariótipo normal do feto foi observado como condição primária para inclusão no projeto. Todas as pacientes envolvidas nesta pesquisa autorizaram o uso das amostras através do protocolo de consentimento livre e esclarecido em conformidade com as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP sob nº0410/09 (registro – 4.075).

Para a realização da amniocentese as pacientes permaneceram em posição de decúbito dorsal horizontal durante todo o procedimento. Primeiramente foi realizada a ultrassonografia para confirmar a idade gestacional, localização da placenta, volume de líquido amniótico, morfologia e vitalidade fetal. Após estes exames iniciais foi feita a antissepsia do abdômen materno com iodopovidona tópica para evitar possíveis contaminações.

Segundo Crespigny e colaboradores (1990), a utilização de anestesia local não é necessária, visto que 96% das pacientes submetidas à amniocentese não reportaram dor durante e após o procedimento. A punção

foi realizada com utilização de uma agulha calibre 20 ou 22 *gauge* e seringa descartável de 20 ml sem que houvesse transfixação da placenta.

A agulha foi inserida através da parede abdominal e da parede uterina, atingindo a cavidade amniótica, sempre com o seu trajeto monitorado por ultrassonografia, na procura de um grande bolsão de líquido, distante do feto, de modo a preservá-lo (Figura 10). Após localizá-lo a guia da agulha foi retirada, conectada à seringa e iniciou-se a aspiração da amostra. A primeira amostra foi desprezada a fim de evitar a contaminação com sangue materno. A segunda amostra foi utilizada para este estudo, desde que livre de traços de sangue. O volume aspirado foi dividido em duas partes, sendo uma para a realização de cariotipagem e a outra para o isolamento das células-tronco.

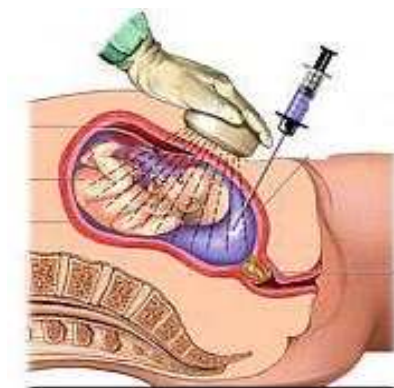


Figura 10 - Ilustração da coleta de líquido amniótico pela técnica de amniocentese. Punção realizada em decúbito dorsal com auxílio de ultrassonografia.

A retirada da agulha foi realizada concomitantemente à avaliação por ultrassonografia para se certificar de que não houve sangramento bem como analisar a vitalidade fetal após a coleta. A paciente permaneceu em repouso

e foi orientada a respeito dos possíveis sintomas pós-procedimento, tais como: dor, febre, perda de líquido ou sangramento antes que fosse liberada.

2. PRÉ-CULTIVO

2.1. Processamento das Amostras

Cada amostra de líquido amniótico (Figura 11) foi transferida para um tubo cônico e centrifugada a 450 x g por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, o botão celular desfeito e fez-se uma lavagem da amostra com 10 ml de PBS (do inglês *Phosphate Buffer Saline*) estéril (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 7,1 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM) para remoção do líquido amniótico residual.



Figura 11 - Amostra de líquido amniótico após a punção (amniocentese).

O sobrenadante foi outra vez descartado e o botão celular restante foi ressuspenso novamente, agora, em 1 ml de PBS. Uma alíquota desta suspensão foi separada para a realização da contagem celular utilizando o corante de exclusão Azul de Tripán (Gibco, EUA).

2.2 Tempo de Armazenamento das Amostras

Determinadas amostras de LA foram gentilmente homogeneizadas e separadas em tubos cônicos, antes de serem processadas, de modo que cada um contivesse o mesmo volume ao final do fracionamento (10 – 15 ml). Em seguida, os tubos foram armazenados em geladeira (2 – 8 °C) por vários dias e ao final de cada semana uma amostra aleatória foi processada (centrifugação e lavagem), teve sua viabilidade determinada e, por fim, foi colocada em cultura sendo analisada diariamente por microscopia óptica. Desta forma avaliamos por quanto tempo a amostra de LA poderia ser mantida sob refrigeração em geladeira sem perder sua viabilidade e capacidade de proliferação em cultivo.

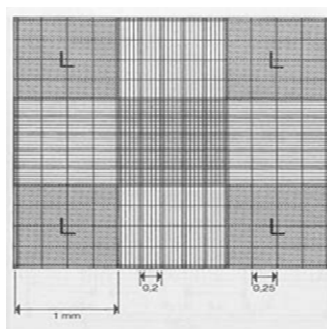
2.3. Contagem Celular e Inóculo Inicial das Amostras de LA

A câmara de Neubauer ou hemocitômetro (Optik Labor, Alemanha) é uma lâmina de microscópio dividida em quadrantes de área definida, sobre o qual um determinado volume da suspensão celular é distribuído. O corante Azul de Tripán, através de suas propriedades lipofílicas, penetra pela membrana das células não-viáveis (mortas), tingindo-as de azul e diferenciando-as das células viáveis (refringentes).

Da suspensão celular inicial (1 ml em PBS), 10 µl foram transferidos para um microtubo contendo 10 µl de Azul de Tripán (diluição 1:2). O microtubo foi homogeneizado e 10 µl da diluição foram colocados em cada lado da câmara do hemocitômetro. As células a serem consideradas e contadas (“células de interesse”) foram padronizadas como aquelas de

morfologia globosa e com tamanho aproximado a de células mononucleadas do sangue (como linfócitos de aproximadamente 18 μm) que possivelmente seriam as células-tronco mesenquimais. Foram analisados os quatro quadrantes externos, onde se contavam as células refringentes, ou seja, não coradas em azul. A média desses campos foi multiplicada por 2 (fator de diluição com Tripán) e por 10^4 (fator de correção do hemocitômetro), obtendo-se assim o número de células por ml (Figura 12). Depois de feita a contagem foi calculada a viabilidade de cada amostra. Entende-se por viabilidade celular a relação percentual do número de células viáveis sobre o total de células (viáveis e não viáveis) presentes em uma amostra.

Por meio desta contagem inicial das “células de interesse” contidas nas amostras fica possível determinar uma área ideal de superfície de cultivo (cm^2) que possa receber certa concentração celular chamada de densidade de inóculo inicial. Desta forma buscamos padronizar este plaqueamento primário e assim garantir a reprodutibilidade de nossos experimentos.



$$\text{n. céls/mL} = \frac{4 \text{ quadrantes} \times \text{fator diluição} \times 10^4}{4}$$

Figura 12 - Ilustração da câmara de Neubauer ou hemocitômetro e a fórmula utilizada para contagem das células contidas nas amostras de LA

3. CULTIVO CELULAR

3.1. Determinação do Meio de Cultura Adequado

Para estabelecer o meio de cultura mais adequado para o isolamento das células-tronco do líquido amniótico foi realizado um experimento onde analisamos os diferentes tipos de meios de cultura utilizados rotineiramente em cultura celular. Aproximadamente 5×10^4 células do LA foram plaqueadas (triplicata) em placas de 6 poços (Corning[®], EUA) e cultivadas com os diferentes meios analisados. Os meios de cultura utilizados para este experimento foram: DMEM *high glucose*, α -MEM, MEM, IMDM, RPMI e McCoy (todos da Sigma-Aldrich, EUA) suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB - Gibco, Brasil), penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 μ g/ml (Sigma Aldrich, EUA).

A análise do meio preferencial para o cultivo de CTLA foi dada através da observação do tempo para obtenção de confluência, análise morfológica diária em microscópio invertido (Carl Zeiss Jena, Alemanha) e verificação da expressão do gene de indiferenciação Oct-4 pela técnica de RT-PCR após a cultura.

3.2. Isolamento das CTLA

As células-tronco foram isoladas das demais células encontradas no líquido amniótico através de suas propriedades de adesão à superfície do material de cultivo. Para melhorar a adesão e o crescimento das células-tronco foram feitos testes comparativos com amostras de LA plaqueadas em

culturas com ou sem a presença de lamínulas de vidro estéreis. Os efeitos destes materiais na adesão foram analisados por microscopia óptica.

3.3. Curva de Crescimento e Densidade de Inóculo das CTLA

As CTLA foram investigadas quanto a melhor densidade de inóculo para análise de adesão, proliferação e tempo de dobramento celular através de uma curva de crescimento realizada por 12 dias. Para tanto, as células-tronco foram plaqueadas em triplicata na densidade de 1×10^3 , 5×10^3 , 25×10^3 e 50×10^3 células por cm^2 em placas de 48 poços (Corning, EUA) com meio de cultura selecionado no experimento anterior com 20% de SFB, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A cada dia, as células dos poços com diferentes densidades foram lavadas com PBS, dissociadas e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Ao final deste período os pontos (número de células) foram extrapolados para um gráfico linear (dias x número de células). O cálculo do tempo de dobramento (TD) foi realizado com auxílio da fórmula: $t / 3,3 \times \log (Y/Y_0)$ onde: T: tempo (horas), Y: n.º céls final e Y_0 : n.º céls inicial.

4. EXPANSÃO CELULAR

Para a expansão das CTLA, as mesmas foram semeadas no meio α -MEM com 20% SFB, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 (Thermo Forma, EUA) por 72 horas, para que ocorresse a separação da fração celular aderente das células não aderentes e que estas últimas fossem removidas no momento

da troca do meio de cultura. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia invertida e as trocas do meio de cultura foram realizadas a cada 3 dias. Após atingirem confluência de aproximadamente 80%, as células foram dissociadas da superfície de cultivo, contadas e replaqueadas para a realização da expansão celular.

As células-tronco foram cultivadas por diversas passagens até serem descartadas quando perdiam a capacidade de expansão e apresentavam características morfológicas sugestivas de células senescentes ou diferenciadas.

4.1. Dissociação Celular

As CTLA, como todas as células que crescem em monocamadas, secretam matriz extracelular e diferentes proteínas de membrana que permitem adesão das mesmas à superfície de crescimento. Para a dissociação dessas células foi necessário um tratamento prévio com uma enzima proteolítica, como por exemplo, a tripsina, que age degradando as proteínas de adesão. Antes da tripsinização, é importante que todo soro fetal bovino do meio de cultura seja removido através de lavagens com solução tamponada. Uma atenção especial deve ser dada ao tempo e à concentração da tripsina, que não devem ser excedidos, pois resultariam em lise e perda da viabilidade celular. Outro composto importante para liberação das células é o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), um composto quelante que sequestra íons bivalentes, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} , diminuindo a interação célula-célula e célula-superfície.

As culturas de CTLA após atingirem 80% de confluência tiveram o meio de cultura descartado e foram lavadas com PBS estéril por 5 minutos para remoção completa do SFB. Em seguida, testamos diferentes formas de dissociá-las: utilizando solução ATV (tripsina 0,2% + EDTA 0,02%, Instituto Adolfo Lutz, Brasil), solução de tripsina 0,25% (Gibco, EUA) ou somente solução de EDTA 0,05%. Em todos os procedimentos fez-se uma incubação em estufa a 37°C por 5 minutos. Estas garrafas foram agitadas levemente para o desprendimento total das células e em seguida foi acrescentado meio de cultura suplementado com SFB para inibir a ação dos agentes dissociantes. Logo após, as células foram transferidas para tubos cônicos de 15 ml (Corning, EUA) e centrifugadas (300 x g por 5 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o botão celular formado foi ressuspensão com 1 ml de meio de cultura completo. Em seguida foi realizada a contagem de células vivas utilizando a coloração de Azul de Tripán e, a partir dessa contagem, as CTLA foram novamente replaqueadas para o uso nos experimentos propostos. Cada etapa de dissociação e replaqueamento das células é determinada como passagem celular.

4.2. Análise do Ciclo Celular das CTLA

Para análise das fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M) utilizamos CTLA em terceira passagem cultivadas em garrafas T-75 até que atingissem aproximadamente 90% de confluência sendo, então, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Cerca de 1×10^6 células foram fixadas com 1 ml de etanol (Merck, Alemanha) e armazenadas em freezer -20 °C por

no mínimo 30 minutos. Após a fixação as células foram tratadas com solução contendo 0,5 mg/ml de iodeto de propídio (Sigma Aldrich, EUA), RNase (Qiagen, EUA) e Tween[®]100 (Merck, Alemanha) para permeabilização da membrana e marcação do DNA. Fez-se uma incubação de 15 minutos em geladeira ao abrigo da luz e aquisição em citômetro de fluxo *FacScaliburTM* (Becton Dickinson, EUA).

Para avaliar a DNAploídia das CTLA, ou seja, a quantidade de DNA presente no interior das células, utilizamos a seguinte equação com base nos histogramas da citometria: (pico de DNA da fase G0/G1 das CTLA) / (pico de DNA da fase G0/G1 das células controle). Os resultados foram analisados conforme os valores de referência do *DNA Peak Index* (do inglês: índice de pico do DNA) onde um número igual a 1.00 (1.00 ± 0.15) corresponde à células diploides e <0.85 ou >1.15 à células aneuploides.

O número de eventos adquiridos no citômetro foi sempre menor do que 200 células por segundo. Como controle foi utilizado células mononucleares extraídas de sangue periférico de doadores saudáveis. Os dados obtidos foram analisados com os programas Cell QuestTM e Mod Fit LTTM.

5. CARACTERIZAÇÃO DAS CTLA

5.1. Análise do Estado de Indiferenciação por RT-PCR

Para determinar o estado de indiferenciação das CTLA cultivadas *in vitro* foi realizada a análise da expressão gênica a partir do RNA total extraído das culturas celulares utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) para verificação dos

genes Oct-4, Sox-2 e Nanog. Como controle do RT-PCR das células mesenquimais do líquido amniótico humano foram utilizadas células da linhagem NTERA-2 c1.D1 (ATCC- CRL-1973, linhagem celular pluripotente de carcinoma testicular embrionário) e células MRC-5 (fibroblastos humanos diploides de pulmão, ATCC-CCL-171) correspondentes aos controles positivo e negativo, respectivamente. O gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno da reação de RT-PCR. Todos os *primers* utilizados estão descritos na Tabela

5.2. Extração de RNA total pelo Método do Trizol

Após remoção do meio de cultivo, foi adicionado 1ml de Trizol[®] (Invitrogen, EUA) para cada 1×10^6 céls. A mistura foi homogeneizada, coletada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um microtubo. Logo após, foram adicionados às amostras, 200 μ l de clorofórmio seguido de agitação vigorosa por 15 segundos em vórtex. Na sequência, esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada por 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo estéril previamente tratado com água DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, EUA) para inativação de nucleases.

Na próxima etapa da extração foi realizada a precipitação do RNA, utilizando-se para cada tubo 500 μ l de álcool isopropílico gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após esse período, centrifugadas por 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao RNA precipitado, 1 ml de

etanol a 75%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e 50ul de água DEPC foram utilizados para ressuspender o RNA total extraído. Todas as amostras foram analisadas quanto a sua integridade através de um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A quantificação foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop[®], Corbett, EUA) e o armazenamento em freezer -80°C até o momento do uso.

5.3. Reação em Cadeia da Polimerase – Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A síntese do cDNA (do inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*) e a reação de RT-PCR foram realizadas por meio do kit Illustra[®] Ready To Go (GE Healthcare, CA, EUA) no termociclador PTC-200[®] (MJ Research Inc., Watertown, EUA). Cada tubo do kit realizou 2 reações com 25 µl de volume final contendo 1,5 mM de MgCl₂, aproximadamente 2 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM de Tris HCl, 60 mM de KCl, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), transcriptase reversa e inibidores de nucleases. Aproximadamente 100 pg a 1 µg de mRNA (RNA mensageiro) ou 20 ng a 2 µg de RNA total foram utilizados nas reações. Todos os primers senso e antissenso foram ressuspensos em água tratada com DEPC.

A RT-PCR foi feita inicialmente com uma etapa de 50°C por 30 minutos, para a transcrição reversa do RNA, seguida por 95°C por 5 minutos para a desnaturação. Em seguida fez-se uma amplificação por 35 ciclos consistindo

de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 55°C a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos do RT-PCR foram analisados através de um gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) visualizado em transiluminador de luz ultravioleta

5.4. Imunofenotipagem

A caracterização da população de CTLA foi determinada pela análise de proteínas de membrana através do método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada através da utilização de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para a adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Todos os anticorpos foram adquiridos da empresa Caltag, Invitrogen, Brasil. Na tabela 1 estão descritos os anticorpos utilizados.

As células obtidas e quantificadas como descrito anteriormente foram coletadas na concentração de 1×10^6 em 500 µl de meio. Em seguida, 100 µl foram transferidos para um tubo específico para citometria (Becton Dickinson, EUA), previamente identificado e incubado com os anticorpos conjugados aos fluorocromos por um período de 15 minutos em campo escuro à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 2 ml de PBS e feita centrifugação a 300 x g por 5 minutos a 4°C.

Anticorpo	Especificidade	Fluorocromo conjugado	Diluição
CD14	Monócitos, macrófagos e neutrófilos	PE	1:50
CD29	Células endoteliais e CTM	PE	1:50
CD34	Precusores hematopoiéticos, células endoteliais	FITC	1:50
CD44	Células T e CTM	PE	1:20
CD45	Pan-leucocitário	FITC	1:50
CD90	Timócitos, CTM, células endoteliais	FITC	1:50
CD105	Células Endoteliais, fibroblastos e CTM	PE	1:50
IgG-1	Controle isotípico	FITC	1:100
IgG-1	Controle isotípico	PE	1:100

Tabela 1 - Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das CTLA por citometria de fluxo.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular homogeneizado e ressuspenso em 500µl de solução de formaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1% em PBS. Por fim as amostras foram estocadas em geladeira ao

abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo, sendo este tempo para a análise de no máximo 24 horas.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho *FacScaliburTM* (Becton Dickinson, EUA). Os dados foram analisados no *CELLQuestTM* (Becton Dickinson, EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 30.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

5.5. PLASTICIDADE DAS CTLA

5.5.1. Linhagem Osteogênica

Cerca de 5×10^3 CTLA foram semeadas em placas de 6 poços para realização da diferenciação osteogênica. O protocolo teve início no momento em que as culturas atingiram aproximadamente 70-80% de confluência, nesta ocasião, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para a diferenciação osteogênica, ou somente com o meio (α -MEM 20% SFB) para o controle de indiferenciação. O meio de indução foi o α -MEM 20% SFB e antibióticos suplementado com 100nM dexametasona, 50 μ g/ml ascorbato-fosfatase e 10 mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich, EUA). A placa foi mantida em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 21 dias, sendo o meio trocado duas vezes por semana. Para caracterizar a diferenciação osteogênica das CTLA, foi feita, além das colorações, a análise da expressão de genes chaves envolvidos neste processo pela

técnica de RT-PCR, como: osteopontina, osteocalcina e Wnt-1. Como controle endógeno de todas as reações foi utilizado o gene da β -actina (todos os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 02).

Para visualizar a produção de íons cálcio pelas células tratadas e confirmar o protocolo de diferenciação óssea foram realizados três métodos de coloração: Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, EUA), Fosfatase Alcalina e von Kossa.

5.5.2. Coloração por von Kossa

Para a coloração pelo método de von Kossa as células tratadas com meio indutor de diferenciação foram fixadas com paraformaldeído 1% por 15 minutos em temperatura ambiente, após esse período foram incubadas com solução de nitrato de prata 0,1% e mantidas diretamente sob a luz ultravioleta por 1 hora. Terminado o tempo de incubação na luz, as culturas foram lavadas com água destilada, recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio 0,5% durante 5 minutos e depois novamente lavadas com água destilada por 3 vezes. Os depósitos de cálcio apresentaram uma coloração negra e foram visualizados em microscópio de inversão.

5.5.3. Coloração por Vermelho de Alizarina

Para a coloração por Vermelho de Alizarina, primeiramente as células diferenciadas foram fixadas com paraformaldeído a 1% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as culturas foram lavadas 3 vezes em água corrente e coradas por 15 minutos com a solução de trabalho de

Alizarina. Esta solução foi preparada com a dissolução de 2 g do corante em 100 ml de água destilada sob vigorosa agitação. O pH da solução foi ajustado a 5 com solução 1% de hidróxido de amônio. Os depósitos de cálcio produzidos pelas células foram visualizados pela coloração avermelhada intensa.

5.5.4. Coloração por Fosfatase Alcalina

Para visualizar a atividade enzimática da fosfatase alcalina nas células diferenciadas foi realizada primeiramente uma lavagem das culturas com PBS, em seguida foi acrescentada a solução de coloração (Naftol AS-MX, N,N dimetilformamida (C_3H_7NO), Fast red e Tris-HCL) e feita incubação por 30 minutos em estufa a 37°C. Logo após, os poços foram lavados novamente com PBS, fixados com paraformaldeído 1% por 5 minutos e em seguida lavados com água destilada. A presença da enzima fosfatase alcalina pode ser observada pela coloração avermelhada.

5.6. Linhagem Adipogênica

As células-tronco foram plaqueadas na concentração de 4×10^3 céls/poço e cultivadas até atingirem aproximadamente 70-80% de confluência. Após esse período foram novamente incubadas por 21 dias, agora, em meio indutor α -MEM, SFB 20% contendo dexametasona 1 μ M, isobutimetilxantina 0,5 mM, indometacina 100mM e insulina 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich, EUA). O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. A diferenciação adipogênica foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos

lipídicos citoplasmáticos neutros através da coloração de Oil Red O (Sigma-Aldrich, EUA) e pela análise da expressão de genes típicos do tecido adiposo pela técnica de RT-PCR, como: PPAR-gama e lipoproteína lipase. Como controle endógeno de todas as reações foi utilizado o gene da β -actina. (todos os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 02).

5.6.1. Coloração de Oil Red O

Após o período de diferenciação o meio indutor foi descartado, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% e em seguida, coradas com a solução de Oil Red O por 15 minutos em temperatura ambiente. Dado o tempo de incubação fez-se a lavagem das culturas com água destilada por 3 vezes a fim de retirar o excesso de coloração. Em seguida as placas de cultura foram secas e visualizadas em microscópio de inversão. Os acúmulos lipídicos citoplasmáticos foram evidenciados na cor vermelha. A solução estoque do corante foi preparada com 0,5g de Oil Red O dissolvidos em 100 ml de isopropanol seguida de filtração. No momento das colorações era preparada a solução de trabalho que consistia na mistura de 20 ml da solução estoque mais 30 ml de água destilada seguida de filtração.

5.7. Linhagem Condrogênica

Ao atingirem 70% de confluência em meio de manutenção, as CTLA foram tripsinizadas e ressuspensas em α -MEM contendo 100 nm dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 ng/ml de TGF- β 1 (Calbiochem, EUA). As células foram semeadas em uma densidade de 2×10^6 células em

tubos cônicos de 15 ml, gentilmente centrifugadas a 400g por 10 minutos a fim de formarem botões de células compactos no fundo do tubo e mantidos em estufa com atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO₂. Após 28 dias em cultura, a diferenciação condrogênica foi confirmada através de coloração por Hematoxilina-Eosina (H&E) e imunofluorescência para colágeno tipo II em cortes histológicos do *pellet* celular. Durante o período de incubação o meio de cultura indutor foi trocado 2 vezes por semana com cuidado para não desfazer o botão de células no fundo do tubo cônico.

Paralelamente, a diferenciação condrogênica foi realizada também em placas de 6 poços. Para isso cerca de $3,5 \times 10^4$ céls/poço foram plaqueadas em meio α -MEM, FBS 20%, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 μ g/ml e quando atingiram 80% de confluência foram induzidas com meio acrescido de 100nM dexametasona (Sigma-Aldrich, EUA) e 10 ng/ml de TGF- β 1 (Calbiochem, EUA). Após 28 dias o botão celular formado foi analisado por coloração H&E e imunofluorescência para colágeno tipo II. Também foi realizada a reação de RT-PCR para pesquisa de genes associados com o processo de diferenciação condrogênica: perlecan, syndecan e colágeno 2A. Como controle endógeno de todas as reações foi utilizado o gene da β -actina. (todos os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 02).

5.7.1. Coloração por Hematoxilina-Eosina

Depois de 28 dias de cultivo, o meio de cultura indutor de diferenciação foi retirado totalmente e o botão celular fixado com paraformaldeído 1% por 10 minutos. Em seguida, o *pellet* foi emblocado em parafina, cortado em

micrótomo de 3 μm e por fim colocado sobre lâminas silanizadas. Para identificar a morfologia celular característica do tecido cartilaginoso foi utilizada a coloração de H&E realizada no laboratório de anátomo-patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

5.7.2. Técnica de Imunofluorescência para colágeno tipo II

Para verificar a presença de colágeno tipo II nos cortes histológicos provenientes da diferenciação condrogênica utilizou-se a técnica de imunofluorescência por marcação indireta. Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas com xilol (Merck, Alemanha) aquecido a 50°C por 20 minutos e, em seguida, submersas em diferentes concentrações de xilol e álcool em temperatura ambiente. Após os banhos as lâminas foram lavadas com água corrente, água destilada, PBS e então foram adicionados sobre suas superfícies 500 μl da solução de digestão (pepsina 0,2 g em 500 μl de ácido acético 0,5 M) de modo que todo o tecido fosse totalmente recoberto. As lâminas foram incubadas com atmosfera umedecida em estufa 37°C por 20 minutos. Dado o período na estufa as lâminas foram retiradas, lavadas com PBS por 3 vezes e recobertas com solução de leite em pó (5% em PBS) por no mínimo 30 minutos e novamente incubadas em estufa 37°C em atmosfera umedecida.

A solução de anticorpo “rabbit” primário anti-colágeno tipo II (Santa Cruz Biotechnologies, EUA) foi preparada na diluição de 1:30 (10 μl de anticorpo em 300 μl de diluente próprio) e um volume de 100 μL foi aplicada sobre as lâminas que foram incubadas *overnight* em geladeira. No dia

seguinte os cortes foram submersos 5 vezes em solução de PBS com Tween[®] por 5 minutos a cada lavagem. O anticorpo “rabbit” secundário, marcado com fluorocromo FITC, foi preparado na diluição de 1:100 em solução de Evans 6%. Cerca de 3ul deste anticorpo foram colocados nos cortes que permaneceram incubados em temperatura ambiente por uma hora e meia. Após esse período as lâminas foram lavadas com solução de PBS e Tween[®] 5 vezes, devidamente protegidas da luz com papel alumínio, para retirada do anticorpo excedente.

Em seguida as lâminas foram marcadas com solução contra-corante de DAPI (1 µl de DAPI em 500ul de PBS) por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período os cortes histológicos foram lavados mais 3 vezes com solução de PBS e Tween e, então, as lâminas foram montadas e visualizadas em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Alemanha).

5.8. Linhagem Neuronal

A diferenciação neuronal foi induzida com cerca de 5×10^3 céls em placas de 6 poços com meio de cultura α -MEM contendo 2% de soro fetal bovino e 1,25% de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA). Alternativamente, o meio de diferenciação neurogênica foi o meio α -MEM suplementado com 20% SFB e 1 mM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA). As células-tronco submetidas à diferenciação neuronal e aquelas tratadas apenas com meio de manutenção (controle negativo) foram incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 2 semanas no caso do DMSO e 24 horas com o β -mercaptoetanol.

O método utilizado para caracterizar a diferenciação neuronal foi a visualização das alterações morfológicas por microscopia óptica, reação de imunocitoquímica e análise da expressão gênica através da técnica de RT-PCR (CD133, nestina e neurofilamento) (todos os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2).

Gene	Primers	Produto (pb)	Tm (°C)
Oct-4	5'-cgt gaa gct gga gaa gga gaa gct g -3' 5'-caa ggg ccg cag ctt aca cat gtt c -3'	247	61
Sox-2	5'- cct ccg gga cat gat cag -3' 5'- ttc tcc ccc ctc cag tcc -3'	178	55
Nanog	5'- cat gag tgt gga tcc agc ttg -3' 5'- cct gaa taa gca gat cca tgg -3'	191	52
CD133	5' – cag tct gac cag cgt gaa aa -3' 5' – gcc cat cca aat ctt gtc cta -3'	200	52
Nestina	5' – gcc ctg acc act cca gtt ta -3' 5' – gga gtc ctg gat ttc ctt cc -3'	200	60
Neurofilamento	5' – acc cga ctc agt ttc acc ag -3' 5' – tca gcc tta gac gcc tca at -3'	314	56
Osteocalcina	5'-atg aga gcc ctc aca ctc ct - 3' 5' caa ggg gaa gag gaa aga ag- 3'	359	55
Osteopontina	5'-cat ggc atc acc tgt gcc ata cc - 3' 5'–cag tga cca gtt cat cag att cat c-3'	331	57
Wnt-1	5'-cac gac act cgt gca gta cgc - 3' 5' – aca gac act cgt gca gta cgc - 3'	233	58
Colágen 2A1	5'-cca gga cca aag gga cag aaa g - 3' 5' – ttc acc agg ttc acc agg att g - 3'	398	57
Perlecan	5'-cat aga gac cgt cac agc aag - 3' 5' – atg aac acc aca ctg aca acc - 3'	300	55
Syndecan	5'-cct tca cac tcc cca cac - 3' 5' – ggc ata gaa ttc ctc ctg ttg - 3'	410	54

Tabela 2 – Sequencia de *primers* (senso e antissenso) utilizados na reação de RT-PCR.

5.8.1. Técnica de Imunocitoquímica

Cerca de 1×10^3 CTLA foram cultivadas em lâminas de vidro com meio α -MEM suplementado com 20% FBS e antibióticos até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Em seguida estas células foram fixadas com paraformaldeído 1% por 30 minutos em temperatura ambiente e lavadas com PBS. A incubação foi feita com anticorpos primários contra neurofilamento de cadeia pesada humano (Santa Cruz Biotechnologies, EUA) por 14 horas e, logo após, fez-se a marcação secundária com anticorpos biotinizados (Santa Cruz Biotechnologies, EUA) por 1 hora. A revelação foi feita com diaminobenzidina (Invitrogen, EUA) também por 1 hora. A reação foi bloqueada com o reagente Trizma[®] (Sigma Aldrich, EUA). Entre todas as etapas foram feitas lavagens com PBS. A marcação foi visualizada em microscópio óptico.

6. CRIOPRESERVAÇÃO

Para o congelamento, as CTLA foram expandidas em garrafas de cultura T-175 (3^o passagem) ao atingirem 80-90% de confluência, tripsinizadas com ATV, contadas em câmara de Neubauer e transferidas para os tubos de congelamento (Corning, EUA) numa densidade de 1×10^6 células por tubo. Cada um destes tubos continha exatamente um volume final de 1 ml, somando meio de congelamento (meio de cultura completo) e criopreservante. Foram analisados dois métodos de congelamento:

6.1. Congelamento Padrão (*Slow Freezing*)

Designamos de congelamento padrão aquele protocolo mais utilizado no congelamento de diversas linhagens celulares em nosso laboratório. Consistiu em um processo lento no qual os tubos de congelamento contendo as CTLA suspensas em meio de congelamento e criopreservante foram devidamente identificados (sempre manipulados em cuba de gelo), resfriados por 20 minutos em geladeira (2 a 8°C), congelados “overnight” em freezer -80°C e por fim acondicionados em nitrogênio líquido (-196 °C) por períodos de 3 e 6 meses.

6.2. Congelamento Gradual (Automatizado)

Neste outro tipo de congelamento as CTLA foram acondicionadas nos criotubos, identificadas, receberam o criopreservante (sempre manipulados em cuba de gelo) e foram imediatamente levadas ao aparelho de congelamento (Thermo Forma Scientific, EUA). O resfriamento ocorreu primeiramente à taxa de 1°C/min até atingir a temperatura de -60°C, depois 3°C/min até -100°C. As amostras permaneceram a -100 °C por 10 minutos e, em seguida, foram armazenados em nitrogênio líquido (-196°C) por períodos de 3 e 6 meses.

6.3. Meio de Congelamento

O meio de congelamento no qual as CTLA foram suspensas foi o próprio meio de cultura α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino,

penicilina 100 UI/ml e estreptomicina 100 µg/ml acrescido de diferentes criopreservantes.

6.4. Criopreservantes

6.4.1. Dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como criopreservante em meio α -MEM completo nas concentrações de 5 e 10%. Devido a sua toxicidade em temperatura ambiente e sua fotossensibilidade as células tratadas com este crioprotetor foram manuseadas o tempo todo em cubas de gelo e protegidas da luz.

6.4.2. Glicerol

O glicerol (Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado como criopreservante em meio α -MEM completo nas concentrações de 5 e 10%. Por ser um composto altamente viscoso este criopreservante foi previamente aquecido em banho-maria a 37°C por 30 minutos antes de ser manipulado.

6.4.3. Sacarose

A sacarose (Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em água estéril (concentração 1M) foi utilizada como criopreservante no meio de congelamento α -MEM suplementado com 20% de SFB e antibióticos, encerrando as seguintes concentrações: 30 e 60 mM.

6.4.4. Trealose

A trealose (Sigma-Aldrich, EUA) dissolvida em água estéril (concentração 105 mM) foi utilizada como criopreservante no meio α -MEM suplementado com 20% de SFB e antibióticos encerrando as seguintes concentrações: 60 e 100 mM.

7. DESCONGELAMENTO

O descongelamento de todos os tubos de criopreservação com as CTLA congeladas em nitrogênio líquido foi feito pelo método rápido (*fast thawing*). Os tubos de congelamento eram retirados do galão de N₂ líquido e levados imediatamente ao banho-maria (37°C) onde permaneciam sob agitação vigorosa até o descongelamento. Em seguida as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 ml previamente completo com meio de cultura, tiveram uma alíquota de 10 μ l retirada para análise da viabilidade celular e então foram centrifugadas a 400g por 5 minutos para a retirada do excesso de criopreservante. Após esta lavagem as células foram plaqueadas em garrafas T-75 cm² e incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C.

8. ANÁLISES PÓS-DESCONGELAMENTO

Após o descongelamento foram feitas análises da viabilidade celular e caracterização das CTLA para avaliar se todas as amostras congeladas mantinham suas características pré-congelamento.

8.1. Viabilidade Celular

Imediatamente após os descongelamentos uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi utilizada para realização da contagem e do cálculo de viabilidade celular. Esta contagem foi feita em microscópio óptico com uso de câmara de Neubauer e corante Azul de Tripán.

8.2. Avaliação de Gene de Indiferenciação

Após atingirem confluência, as células de todas as amostras descongeladas tiveram seu RNA total extraído pelo método do Trizol e foram analisadas quanto à expressão do gene de diferenciação Oct-4 pela técnica de RT-PCR. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2. Os produtos foram analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

8.3. Análise de Marcadores de Superfície

Todas as amostras descongeladas, depois de expandidas, foram investigadas quanto à presença de determinadas proteínas de superfície através de citometria de fluxo. As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência captada em citômetro de fluxo *FacScaliburTM* (Becton Dickinson, EUA). Os dados foram analisados pelo programa *CELLQuestTM* (Becton Dickinson, EUA). Os anticorpos primários utilizados estão descritos na tabela 3.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição
CD11b	FITC	1:20
CD34	FITC	1:20
CD45	FITC	1:20
CD29	PE	1:20
CD44	PE	1:20
CD105	PE	1:20
IgG-1	FITC	1:20
IgG-1	PE	1:20

Tabela 3 – Anticorpos monoclonais usados na caracterização de CTLA por citometria de fluxo pós-congelamento

8.4. Ensaios de Diferenciação Osteogênica

Todas as amostras descongeladas tiveram suas células plaqueadas em placas de 6 poços (5×10^3 céls/poço) e foram submetidas à diferenciação osteogênica com meio indutor apropriado pelo período de 21 dias. Após este tempo as células foram coradas com Vermelho de Alizarina para visualização dos depósitos de cálcio e confirmação da sua plasticidade.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram expressos como média (\pm desvio-padrão) e comparadas pelos testes One-Way ou Two-Way ANOVA, Foram aplicados os pós testes *Dunnetts* (todos X controle) ou *Bonferroni* (comparando colunas selecionadas). As diferenças entre os valores das médias foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

1. PRÉ-CULTIVO

1.1 Tempo de Armazenamento da Amostra

As células progenitoras contidas nas amostras de líquido amniótico armazenadas em geladeira (2 – 8 °C) antes do processamento, por período de até 6 semanas, foram capazes de ser isoladas em cultura. Elas também mantiveram seu potencial de adesão e proliferação em cultivo mesmo após longo tempo de estocagem (Figura 13).

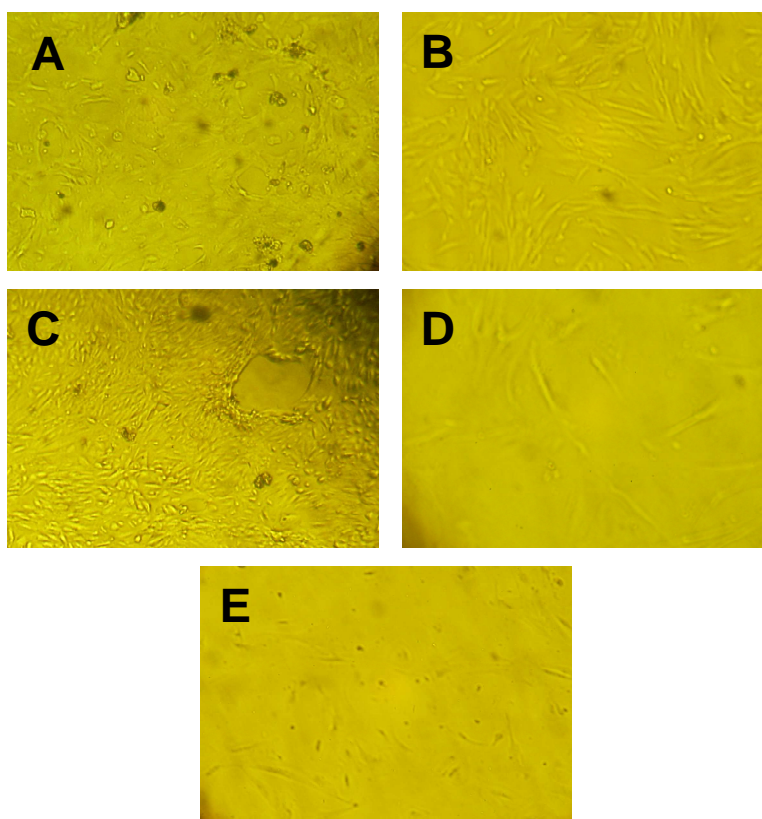


Figura 13 - Fotos das células progenitoras do LA visualizadas por microscopia óptica em cultivo após armazenamento em geladeira por diferentes períodos. A - 7 dias; B- 14- dias; C- 21 dias; D- 28 dias; E- 35 dias (aumento 40x).

As amostras de LA armazenadas por até duas semanas em geladeira mantiveram as viabilidades celulares equivalentes àquelas amostras processadas no dia do recebimento (semana 0). Já as amostras armazenadas por períodos maiores, que 3 a 6 semanas, demonstraram viabilidades menores (Gráfico 1).

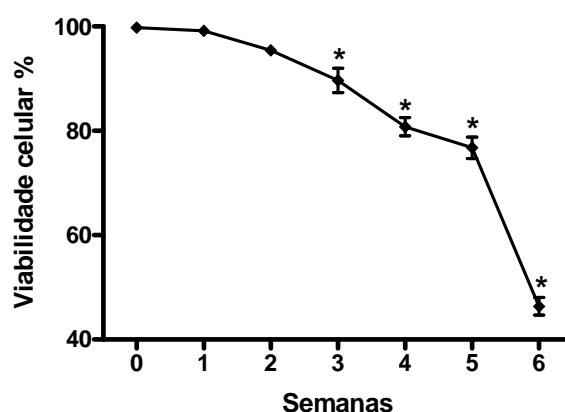


Gráfico 1 - Curva de viabilidade celular (%) de amostras de LA e armazenadas em geladeira por até 6 semanas. A semana 0 (zero) corresponde à viabilidade determinada imediatamente no dia do recebimento da amostra e foi usada na análise comparativa com os dados achados nas demais semanas. As médias foram comparadas por One-Way ANOVA e Dunnett pós-teste (* $p < 0.05$).

1.2. Contagem de células nas amostras de líquido amniótico

O número de “células de interesse” encontrado nas amostras de LA processadas (aquelas de morfologia globosa, refringentes e com tamanho aproximado a de células mononucleadas normais do sangue – Figura 14) foi de $0,6 \pm 0,2 \times 10^5$.

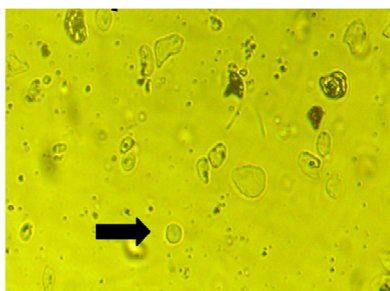


Figura 14 – Foto da cultura de líquido amniótico destacando a célula padronizada como sendo de interesse na amostra.

2. CULTIVO CELULAR

2.1. Determinação do meio de cultura apropriado

2.1.1. Análise de diferentes meios no isolamento, adesão e crescimento celular

Foi verificado, ao contrário da grande maioria dos protocolos, que o meio DMEM não é o mais indicado para o isolamento e cultivo de células progenitoras do LA. Ele proporcionou uma baixa taxa de adesão e um lento crescimento das células isoladas. Ainda, o número de colônias formadas após dias de cultivo foi menor, comparado aos outros meios analisados.

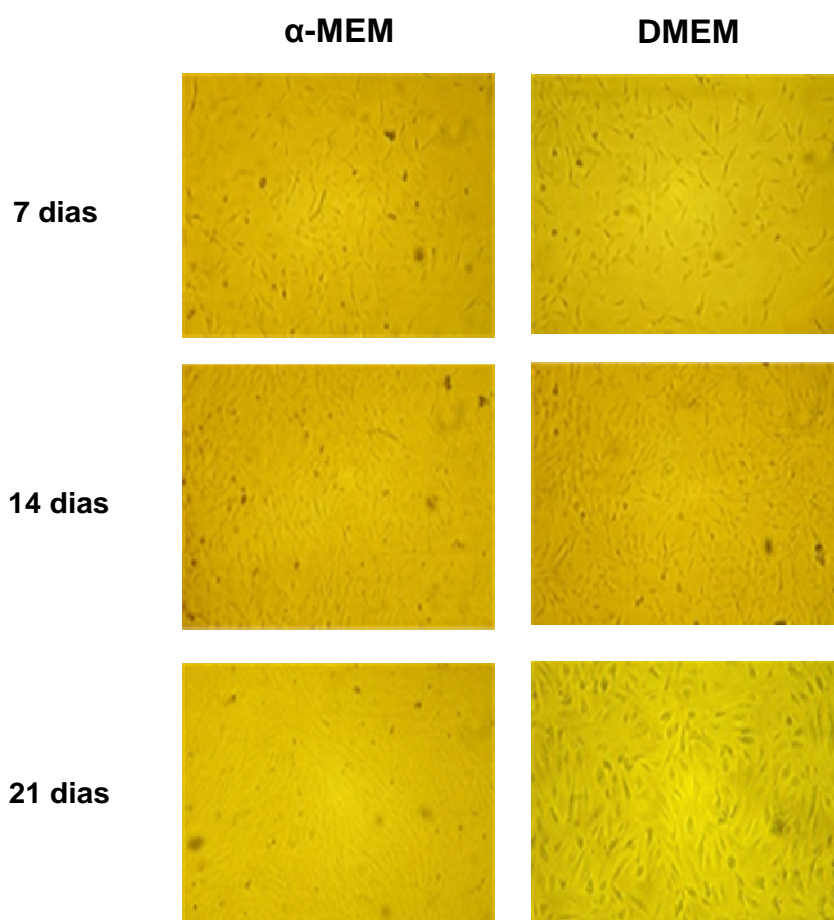


Figura 15 – Fotos das células progenitoras isoladas em cultivo com os dois principais meios utilizados na cultura de células-tronco, α -MEM e DMEM, após períodos de 07, 14 e 21 dias. Percebe-se uma maior taxa de crescimento nas células tratadas com o meio α -MEM.

O meio α -MEM, por sua vez, foi o que apresentou o maior número de colônias e de células aderidas por tempo de cultivo. Também foi o que melhor manteve a morfologia das células com um aspecto fibroblástico típico de células-tronco mesenquimais (Figura 15).

Os meios McCoy 5A e RPMI 1640 também apresentaram boas taxas de adesão e crescimento, mas provocaram mudanças na morfologia das células. Logo, poderiam estar promovendo algum tipo de diferenciação das mesmas e não foram utilizados nos experimentos posteriores.

2.1.2. Análise da influência dos diferentes meios na diferenciação celular pela expressão do gene Oct-4 por RT-PCR

As células cultivadas com todos os diferentes meios expressaram o gene Oct-4 (Figura 16), indicando uma manutenção do estado de indiferenciação celular. O fato interessante foi uma sugestiva menor expressão do mesmo gene naquelas células tratadas com os meios RPMI 1640 e McCoy 5A quando comparadas com os outros meios analisados. Por este motivo e as mudanças morfológicas provocadas por ambos, a utilização destes meios foi descartada no cultivo das CTLA. Por outro lado, o meio α -MEM manteve uma expressão gênica de Oct-4 semelhante às células NTERA-2 c1.D1, controle positivo, indicando que a sua utilização não promove diferenciação das CTLA em outros tipos celulares.

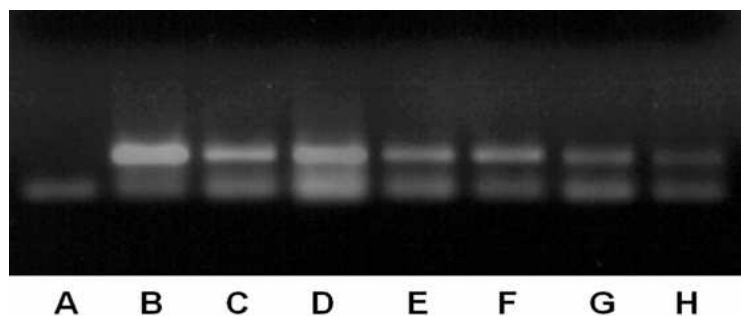


Figura 16 - Análise da expressão gênica do marcador de indiferenciação Oct-4 em CTLA cultivadas com diferentes meios de cultura em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. **A)** água; **B)** controle positivo NTERA-2 c1.D1; **C)** meio MEM; **D)** α -MEM; **E)** IMDM; **F)** DMEM; **G)** RPMI 1640; **H)** McCoy's 5A.

2.2 Isolamento das CTLA

As células-tronco do líquido amniótico mostraram uma alta capacidade de adesão à superfície de cultivo. As demais células não aderentes (hemácias, células epiteliais e células mortas) eram descartadas à medida que fazíamos a troca do meio de cultura.

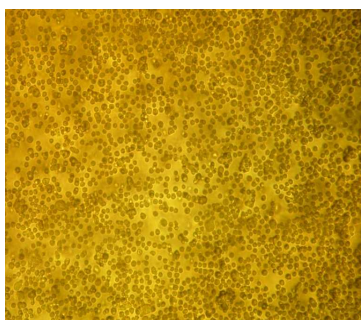


Figura 17 - Presença de hemácias no cultivo primário da amostra de líquido amniótico que dificultava a adesão e o isolamento das "células de interesse".

A presença de hemácias em determinadas amostras de líquido amniótico (Figura 17) dificultou a adesão celular à superfície das garrafas de cultura. Contudo, era possível obter uma cultura a partir destas amostras com um tempo maior de cultivo inicial para permitir a adesão das células de interesse.

Não observamos diferenças com a utilização ou não de lamínulas de vidro estéreis como substrato para a adesão celular e expansão das CTLA (Figura 18). No mais, as lamínulas eram potenciais fontes de contaminação e dificultavam o processo de dissociação, motivo pelo qual não foram utilizadas nas culturas de CTLA.

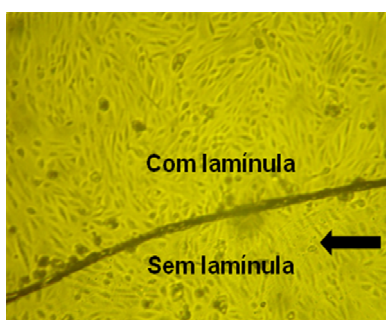


Figura 18 - Cultura primária de LA mostrando que não houve diferenças na adesão e isolamento celular com ou sem a presença de lamínula de vidro.

2.3. Diferentes Tipos Celulares isolados das Amostras de LA

Após a adesão e proliferação celular notou-se a existência de pelo menos 3 tipos celulares isoladas nas culturas primárias do líquido amniótico: endotelial (formato arredondado), epitelial (derivadas da pele e urina fetais) e fibroblástico (células alongadas; Figura 19).

Este fato comprova a grande diversidade celular e o potencial do líquido amniótico como fonte de células fetais e esta em acordo com outros trabalhos que também descreveram diferentes morfologias após cultivo do LA. Com as passagens realizadas nos cultivos houve predomínio da morfologia fibroblástica sobre as demais.

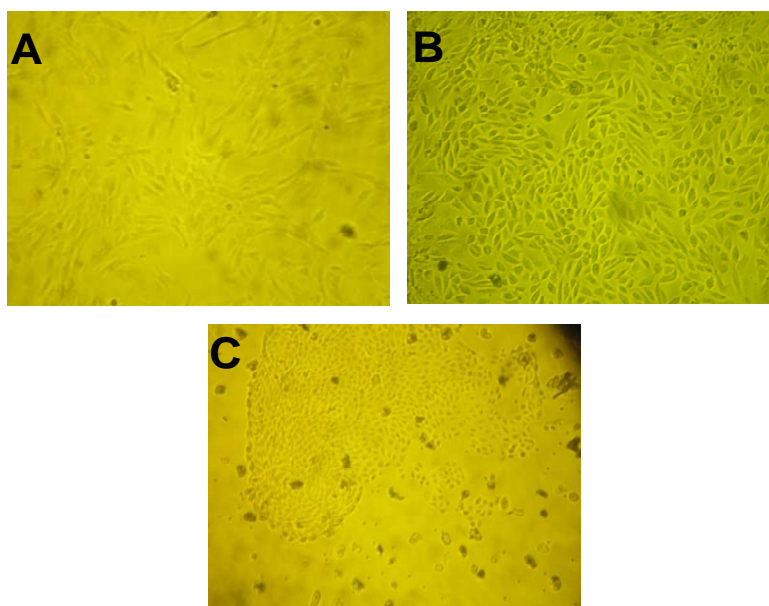


Figura 19 – Diferentes tipos celulares isolados na cultura do LA. **A)** células similares a fibroblastos; **B)** células do tipo endotelial; **C)** células do tipo epitelial (40x).

2.4. Curva de Crescimento e densidade de inóculo das CTLA

Foi padronizado que o inóculo contendo uma concentração de 5×10^3 células por cm^2 é o mais adequado para o cultivo das células progenitoras originárias de líquido amniótico. Inóculos com uma densidade menor apresentavam uma fase *lag* (período de adaptação das células às condições de cultivo) longa e, conseqüentemente, um crescimento mais lento, enquanto que densidades maiores chegavam mais rapidamente à fase de platô (período em que as células param de proliferar) e necessitavam de repiques constantes (Gráfico 2). Além do mais, a formação de colônias, evento utilizado também na caracterização das células-tronco, ficou mais evidente quando se cultivaram células com menores inóculos, visto que havia mais espaço para a adesão e proliferação celular.

O tempo de dobramento destas células, ou seja, o período que as células levaram para duplicar sua população foi de 1,6 dias ou aproximadamente 30 ± 4 horas.

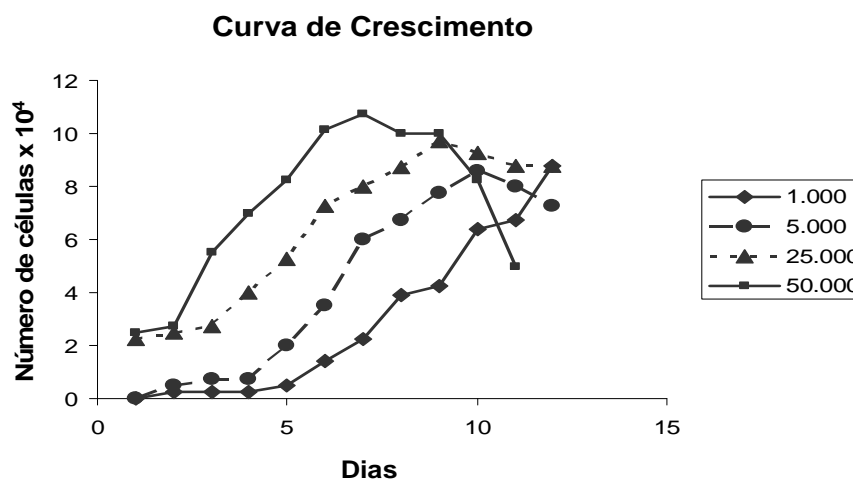


Gráfico 2 - Curva de crescimento das CTLA realizada por doze dias com diferentes inóculos iniciais (1.000, 5.000, 25.000 e 50.000 células).

3. EXPANSÃO DAS CTLA

3.1. Dissociação Celular

A associação entre tripsina e EDTA na concentração de 0,20 e 0,02% respectivamente (ATV) mostrou os melhores resultados na dissociação das CTLA. O procedimento era feito de maneira mais rápida e não afetava a integridade das células. O uso isolado de tripsina 0,25% ou EDTA 0,05% proporcionou um tempo maior para soltura das células e requeria a utilização de grandes volumes dos mesmos.

4. ANÁLISE DO CICLO CELULAR DAS CTLA

As células-tronco do líquido amniótico apresentaram porcentagens celulares de 76,17% ($\pm 3,48\%$) em fase G_0/G_1 , 7,41% ($\pm 1,12\%$) na fase de síntese (S) e 16,42% ($\pm 2,68\%$) na fase G_2M do ciclo celular (Gráfico 3),

confirmando sua grande capacidade proliferativa e poder replicativo quando em cultivo. As células controle (linfócitos saudáveis) nas mesmas condições de cultivo, por sua vez, tiveram uma porcentagem de 97,32% ($\pm 2,21\%$) em fase G_0/G_1 , 2,68% ($\pm 1,10\%$) em fase S e 0,02% ($\pm 0,18\%$) em fase G_2M .

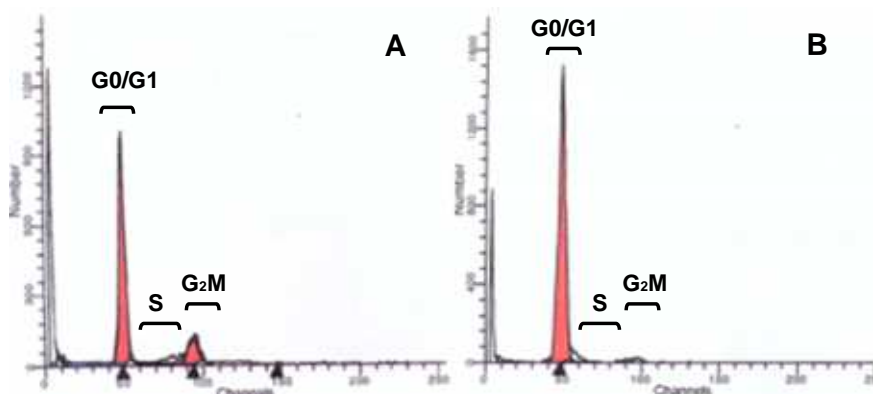


Gráfico 3 - Histograma do ciclo celular das CTLA em cultura analisado por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio. Verifica-se um acúmulo de células na fase de síntese e G_2M das CTLA (A) enquanto que os linfócitos do sangue periférico (B), nas mesmas condições de cultivo, apresentam-se em sua maioria na fase G_0/G_1 .

5. CARACTERIZAÇÃO DAS CTLA

5.1 Análise do estado de Indiferenciação por RT-PCR

As células isoladas do líquido amniótico humano expressaram genes responsáveis pela indiferenciação celular após análise por RT-PCR e visualização em gel de agarose (Figura 20). Assim, confirma-se que as CTLA isoladas não apresentavam comprometimento com nenhuma linhagem celular. Os genes chaves expressos foram Oct-4, Sox-2 e Nanog que são igualmente encontrados em células embrionárias pluripotentes e células neoplásicas.

Como controles na reação de RT-PCR destes genes foi utilizado o RNA total extraído de células da linhagem NTERA-2 c1.D1 (ATCC/CRL-1973,

linhagem celular pluripotente de carcinoma testicular embrionário) e de células MRC-5 (fibroblastos humanos diplóides de pulmão, ATCC/CCL-171) que foram os controles positivo e negativo, respectivamente.

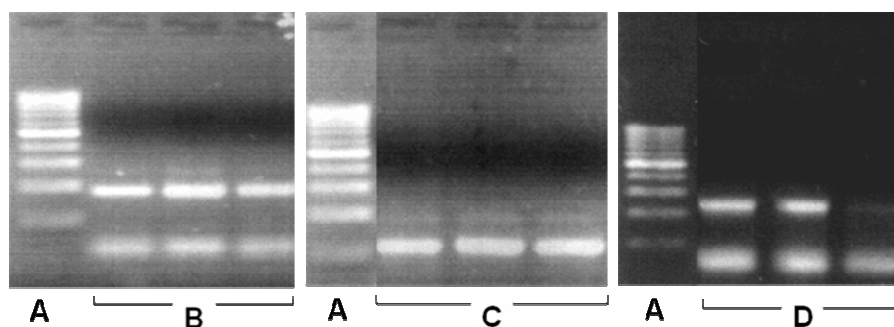


Figura 20 - Análise da expressão dos marcadores de indiferenciação Oct-4, Sox-2 e Nanog em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador de luz UV; **A)** marcador de peso molecular – 100pb; **B)** Nanog – triplicata; **C-** Sox-2 – triplicata e **D-** Oct-4 – triplicata.

5.2. Imunofenotipagem das CTLA

Os resultados obtidos pela citometria de fluxo demonstraram que as células derivadas e isoladas do líquido amniótico possuem características imunofenotípicas específicas de células-tronco de origem mesenquimal.

A expressão foi negativa para os marcadores típicos de células progenitoras hematopoiéticas como CD14, CD34 e CD45 e positiva para os antígenos característicos de CTM: CD29, CD44, CD90 e CD105. Os resultados estão representados na forma de histograma e porcentagem para cada antígeno avaliado (Figura 21).

Marcadores de Membrana das CTLA

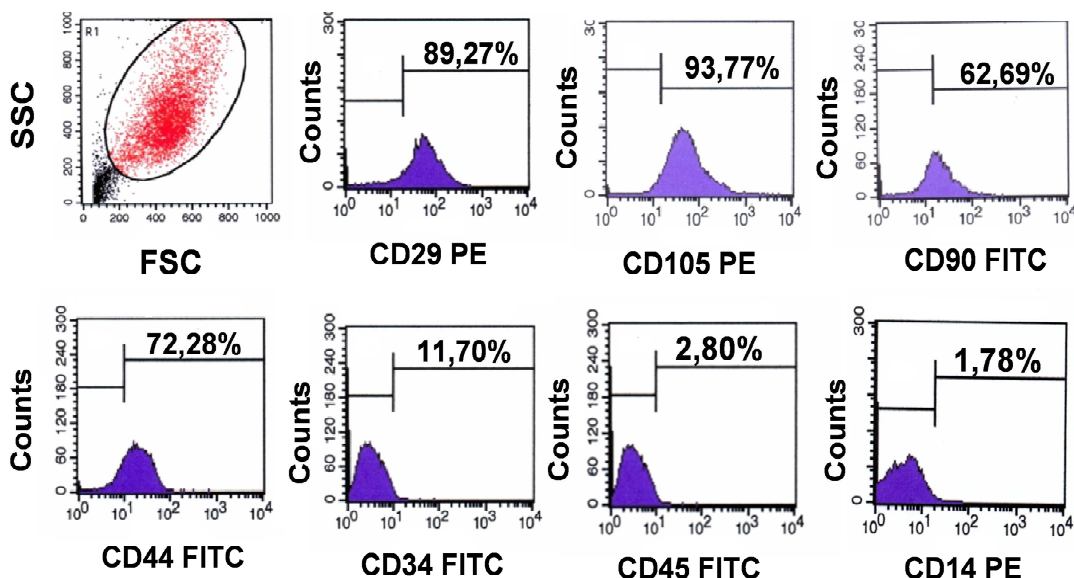


Figura 21 - Caracterização imunofenotípica das CTLA. Marcação positiva para CD29 ($89,27 \pm 8,23\%$), CD44 ($72,28 \pm 11,65\%$), CD90 ($62,69 \pm 18,84\%$), CD105 ($93,77 \pm 3,64\%$) e negativa para CD14 ($1,78 \pm 1,06\%$), CD34 ($1,70 \pm 1,14\%$) e CD45 ($2,80 \pm 0,74\%$).

5.3. PLASTICIDADE DAS CTLA

5.3.1. Diferenciação Osteogênica

A diferenciação osteogênica das CTLA foi confirmada após 21 dias de cultivo sob estímulo em meio de cultura indutor (50 μ M ascorbato fosfatase, 100 nM dexametasona e 10 mM β -glicerofosfato) com a realização de colorações específicas. Os acúmulos de cálcio foram visualizados com coloração de von Kossa e Vermelho de Alizarina, enquanto a presença da enzima fosfatase alcalina foi evidenciada com a coloração de mesmo nome (Figura 22).

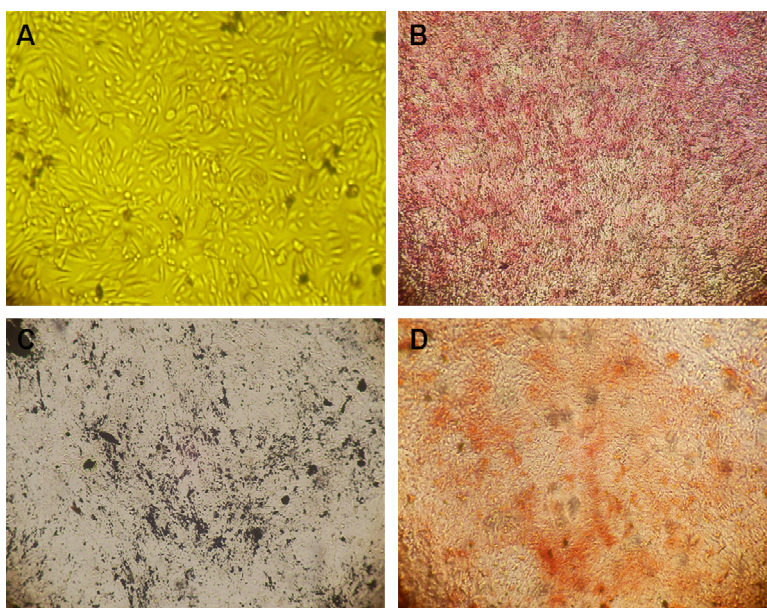


Figura 22 – Potencial de diferenciação osteogênica *in vitro* das CTLA **A)** Controle negativo da diferenciação, células cultivada somente com meio de cultura (40x); **B)** Coloração com Fosfatase Alcalina para visualizar a presença da enzima (vermelho; 40x); **C)** Coloração por von Kossa (depósitos em preto; 40x) e **D)** Coloração por Vermelho de Alizarina para demonstrar a presença de cálcio (depósitos em vermelho; 40x).

As CTLA induzidas à diferenciação osteogênica também expressaram genes como a osteopontina, a osteocalcina e Wnt-1 comumente encontrados em células ósseas (Figura 23). Esses genes estão geralmente ligados ao processo de formação e remodelação óssea promovida pelos osteoblastos, o que valida o potencial de diferenciação ósseo das células-tronco do líquido amniótico.

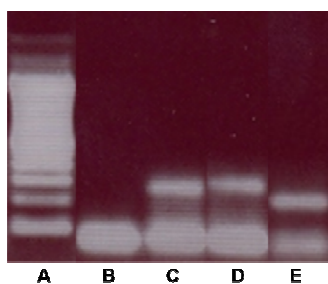


Figura 23 - Análise dos produtos de RT-PCR demonstrando a expressão de genes específicos da diferenciação osteogênica confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de UV; **A)** Peso molecular – 100pb; **B)** Água; **C)** osteopontina; **D)** osteocalcina e **E)** Wnt-1.

5.3.2. Diferenciação Adipogênica

A diferenciação adipogênica das CTLA tratadas por 21 dias com meio indutor (10 µg/ml de insulina, 100 nM de dexametasona, 0,5 mM de isobutilmetilxantina e 200 mM de indometacina) foi confirmada através da coloração com Oil Red O. Os depósitos de lipídeos citoplasmáticos aparecem corados em vermelho (Figura 24).

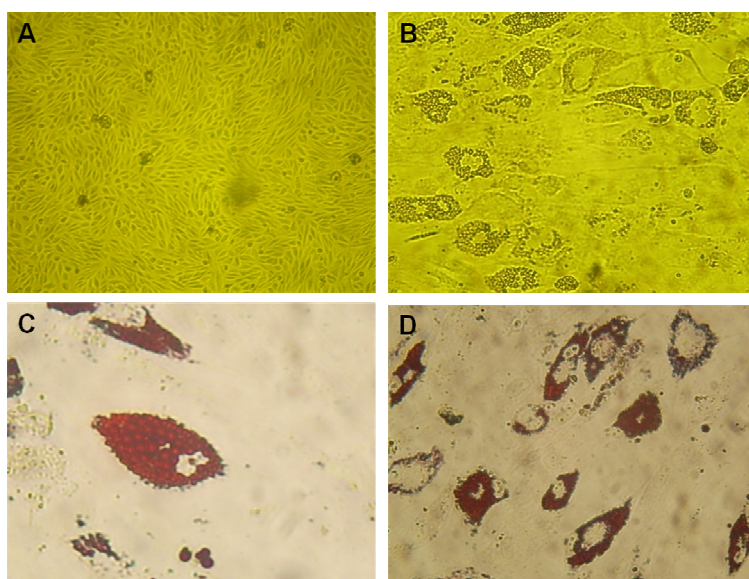


Figura 24 - Caracterização da diferenciação adipogênica de células-tronco isoladas de líquido amniótico. **A)** cultivo celular sem meio indutor (40x); **B)** cultura diferenciada sem coloração (100x); **C e D)** células coradas com Oil Red O (400 e 100x).

As CTLA induzidas à diferenciação adipogênica passaram a expressar genes típicos de células adiposas após o período de incubação com meio indutor (Figura 25). A expressão gênica de PPAR-gama (receptor ativado de proliferação de peroxissomos - gama) e lipoproteína lipase, confirmam a plasticidade das células-tronco do líquido amniótico.

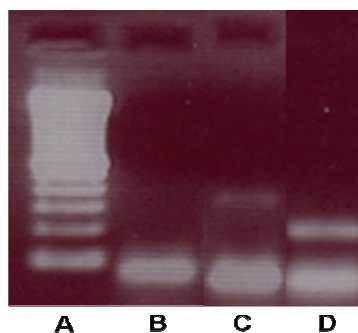


Figura 25 - Análise da expressão gênica após RT-PCR para os genes específicos de diferenciação adipogênica feita por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de UV; **A)** Peso molecular – 100pb; **B)** Água; **C)** PPAR-gama **D)** Lipoproteína lípase.

5.3.3. Diferenciação Condrogênica

A plasticidade celular das CTLA cultivadas também foi confirmada após estímulo com meio de indução condrogênico (10 ng/ml de TGF β e 100 nM dexametasona). Foi possível observar a formação de um botão celular, tanto nas diferenciações realizadas em tubo cônico quanto nas realizadas em placas (Figura 26), o que não ocorreu com as células controle, que não receberam meio indutor.

Estes botões celulares ao serem analisados por coloração de H&E apresentaram um arranjo e tipos celulares típicos do tecido cartilaginoso, como pericôndrio, condrócitos e condroblastos. Ao analisar a expressão de colágeno tipo II por imunofluorescência foi possível observar uma intensa positividade, indicando a produção deste tipo de colágeno por estas células (Figura 27).

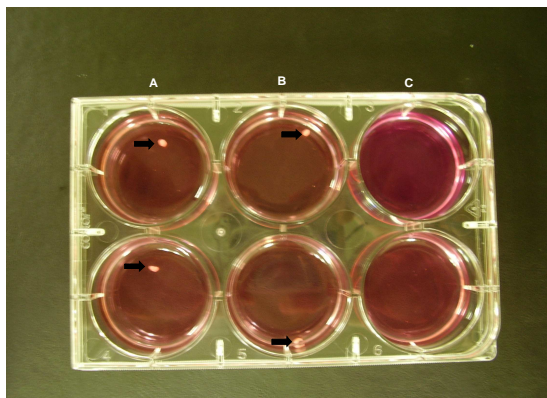


Figura 26 - Diferenciação condrogênica realizada em placa de 6 poços. **A e B)** formação de botão celular cartilaginoso (setas) após incubação com meio indutor; **C)** células controle incubadas somente com meio α -MEM e 20% de SFB

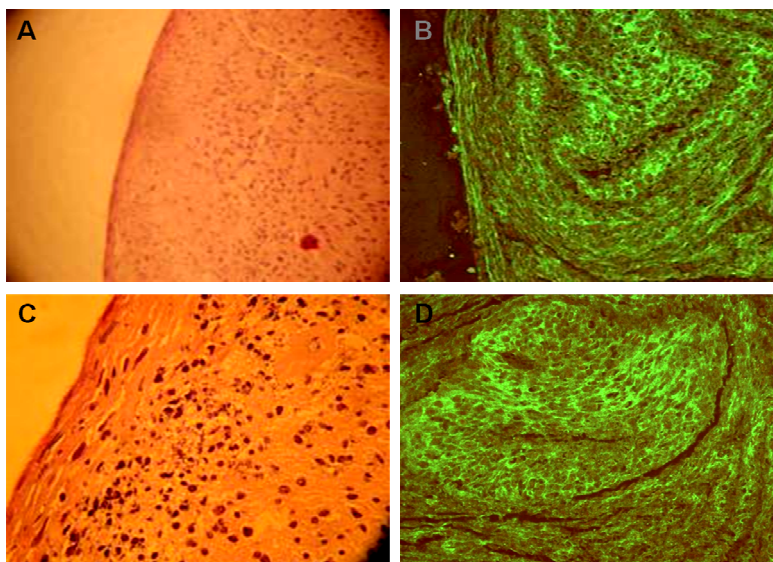


Figura 27 - Caracterização da diferenciação condrogênica de cortes histológicos de células-tronco isoladas de líquido amniótico coradas com hematoxilina-eosina (**A** – 40x e **C**- 400x) e marcadas por imunofluorescência com anticorpos anti-colágeno tipo II conjugado com FITC (**B** e **D**; 400x)

As CTLA diferenciadas em tecido condrogênico, tanto em tubos cônicos quanto em placas, passaram a expressar genes típicos encontrados em células cartilaginosas (Figura 28). Os genes syndecan, perlecan e colágeno tipo II são expressos principalmente em condroblastos e

condrócitos. Sua expressão após indução confirma a diferenciação condrogênica das células-tronco de líquido amniótico.

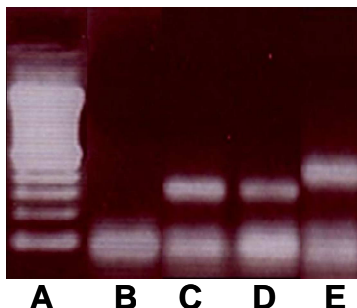


Figura 28 - Análise da expressão gênica após RT-PCR para os genes específicos de diferenciação condrogênica feita por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de UV; **A)** Peso molecular – 100pb; **B)** Água; **C)** Colágeno II; **D)** Perlecan; **E)** Syndecan

5.3.4. Diferenciação Neuronal

A diferenciação neuronal das CTLA pode ser realizada concomitantemente com os dois protocolos, o primeiro utilizando 1,2% de DMSO e o segundo 1mM de β -mercaptoetanol. As mudanças fenotípicas observadas durante o cultivo foram retração da população celular total e aparecimento de prologamentos citoplasmáticos semelhantes àqueles encontrados em células neuronais (Figura 29).

Verificou-se através do RT-PCR a expressão de genes típicos de células precursoras neuronais, como CD133, nestina; e, ainda, marcador presente em neurônios adultos, como o neurofilamento de cadeia pesada, confirmando o potencial de diferenciação neurogênica das células-tronco de líquido amniótico tratadas com os agentes químicos DMSO e β -mercaptoetanol (Figura 30).

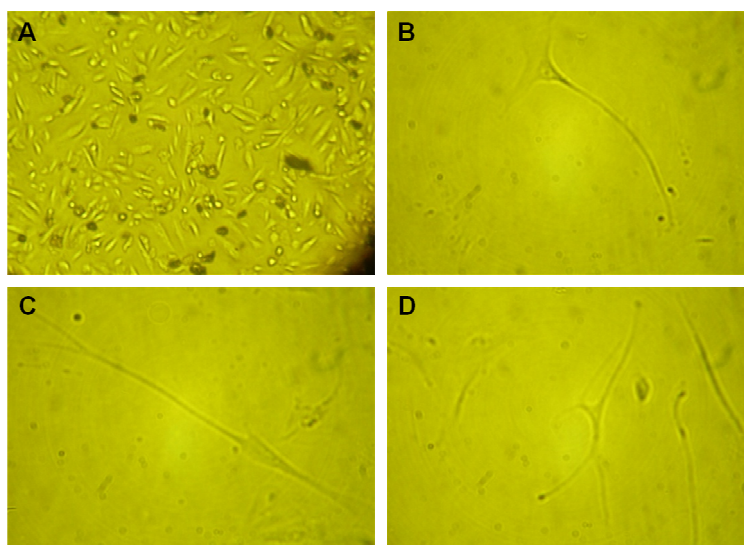


Figura 29 - Caracterização da diferenciação neurogênica de células-tronco isoladas de líquido amniótico induzida por DMSO (**B** e **C**; 100x) e por β -mercaptoetanol (**D**;100x). Em (**A**) o controle tratado apenas com meio α -MEM (40x).

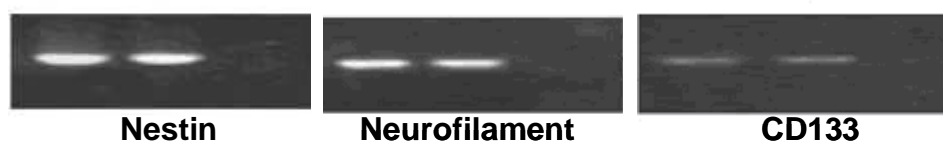


Figura 30 - Análise de expressão gênica após RT-PCR feita por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV dos genes associados à diferenciação neuronal. nestina (duplicata); neurofilamento (duplicata) e CD133 (duplicata).

As CTLA, após os estímulos de diferenciação em tecido neuronal, apresentaram neurofilamento de cadeia pesada em sua estrutura como demonstrado pela reação de imunocitoquímica (Figura 31).

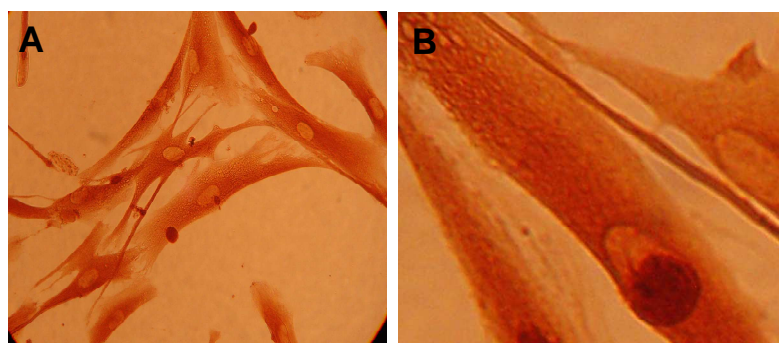


Figura 31 - Ensaio de imunocitoquímica em CTLA diferenciadas em linhagem neuronal marcadas com anticorpo anti-neurofilamento (**A**-100x e **B**-400x).

6. ANÁLISES APÓS A CRIOPRESERVAÇÃO

6.1. Viabilidade celular

Não houve diferenças significativas nas viabilidades das CTLA criopreservadas com ambos os métodos de congelamento analisados: gradual e padrão. As maiores taxas de viabilidade foram sempre obtidas nas CTLA congeladas com o DMSO 10%, que manteve números semelhantes às células pré-congelamento. Os criopreservantes extracelulares, sucrose e trealose, proporcionaram as menores viabilidades.

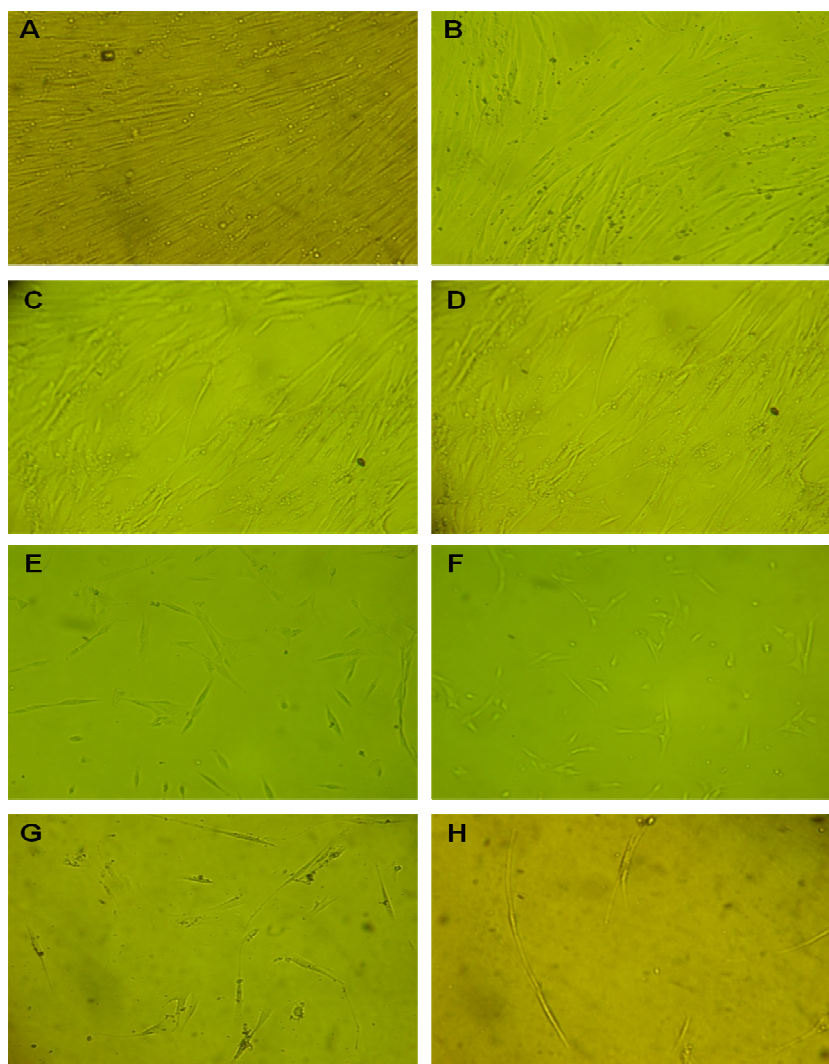


Figura 32 - CTLA no décimo dia de cultivo após serem criopreservadas com diferentes concentrações de criopreservantes (40x); **A)** DMSO 10%; **B)** DMSO 5%; **C)** Glicerol 10%; **D)** Glicerol 5%; **E)** Trealose 100 mM; **F)** Trealose 60 mM; **G)** Sacarose 60 mM; **H)** Sacarose 30 mM

O tempo gasto para que as CTLA chegassem à confluência quando colocadas em cultura foi menor nas células congeladas com os criopreservantes intracelulares DMSO e glicerol, fato que ocorreu aproximadamente por volta do décimo dia (Figura 32). As células congeladas com sucrose e trealose atingiram confluência por volta do décimo quinto dia em cultura.

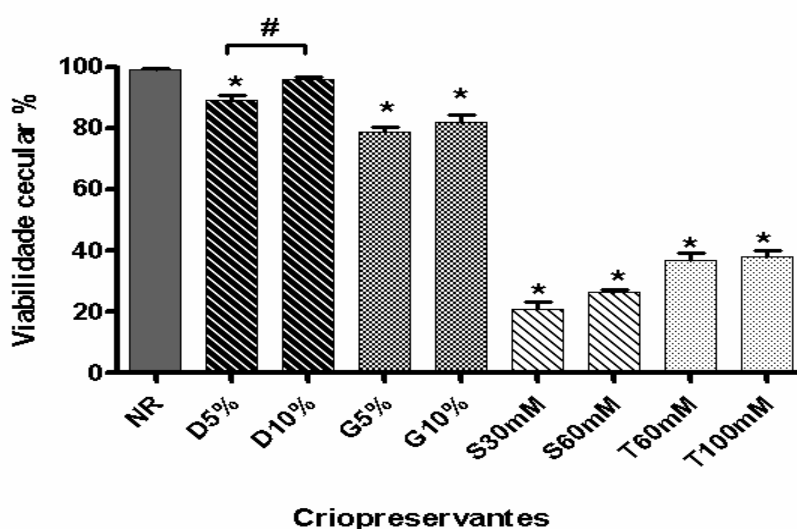


Gráfico 4 - Viabilidade da CTLA antes (NR) e após congelamento de 3 meses com diferentes criopreservantes pelo método padrão. As médias (desvio padrão) foram comparadas por One-Way ANOVA pós teste Dunnett (controle (NR) X criopreservantes * $p < 0.05$) e Bonferroni (concentração 1 X concentração 2 # $p < 0.05$)

As amostras de CTLA congeladas pelo método padrão após 3 meses de criopreservação com diferentes criopreservantes apresentaram viabilidades distintas (Gráfico 4). A maior viabilidade foi proporcionada pelo DMSO a 10% ($95,86 \pm 0,95\%$) que foi semelhante àquela encontrada antes do congelamento das células ($99,24\%$).

As amostras analisadas também por 3 meses, agora pelo método gradual de congelamento, demonstraram resultados semelhantes. Novamente a maior viabilidade foi proporcionada pelo DMSO a 10% ($94,62 \pm 1,34$) que foi semelhante àquela encontrada antes do congelamento das células (99,24%; Gráfico 5). A trealose 100 mM ($41,32 \pm 1,75\%$) teve uma viabilidade maior do que a trealose 60 mM ($30,48 \pm 1,96\%$).

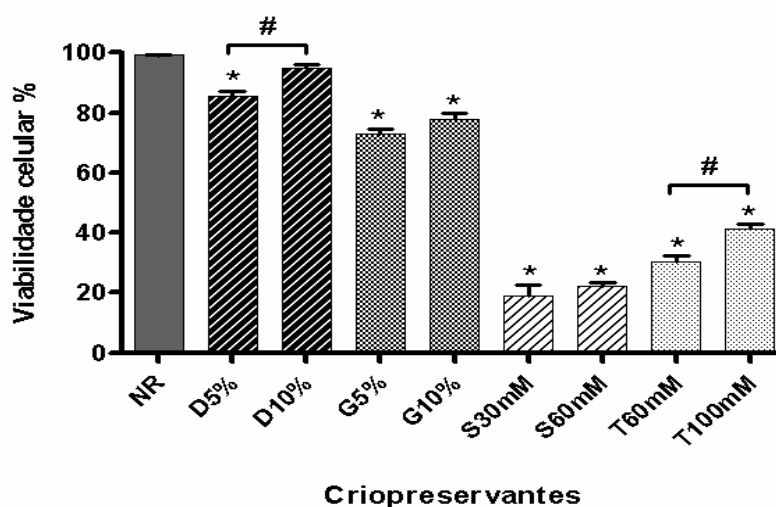


Gráfico 5 - Viabilidade das CTLA antes (NR) e após congelamento de 3 meses com diferentes criopreservantes pelo método gradual. As médias (desvio padrão) foram comparadas por One-Way ANOVA pós teste Dunnett (controle (NR) X criopreservantes * $p < 0.05$) e Bonferroni (concentração 1 X concentração 2 # $p < 0.05$)

A maior viabilidade obtida no congelamento das CTLA após 6 meses utilizando-se o método padrão foi obtida pelo criopreservante DMSO a 10% ($92,2 \pm 1,2\%$) que proporcionou uma taxa semelhante àquela encontrada nas células pré-congelamento (NR; 99,35%) (Gráfico 6). As CTLA congeladas pelo período de 6 meses através do método gradual que tiveram a maior viabilidade foram aquelas criopreservadas com DMSO 10% ($89,59 \pm 2,99\%$) (Gráfico 7).

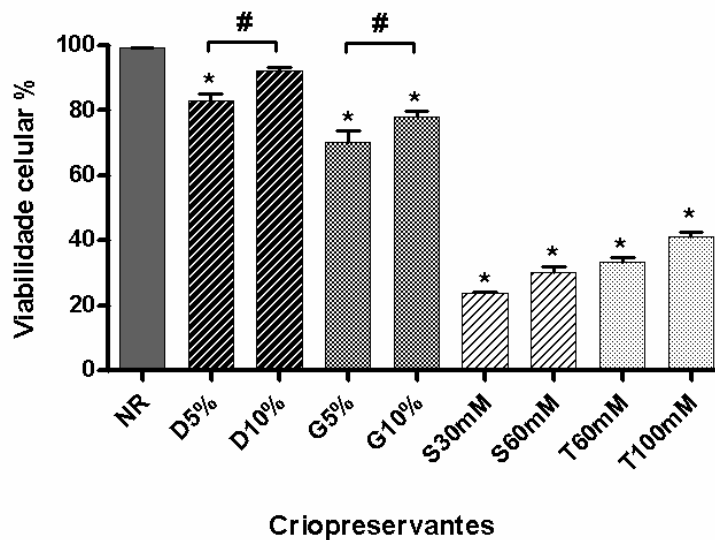


Gráfico 6 - Viabilidade das CTLA antes (NR) e após congelamento de 6 meses com diferentes criopreservantes pelo método padrão. As médias (desvio padrão) foram comparadas por One-Way ANOVA pós teste Dunnett (controle (NR) X criopreservantes $*p < 0.05$) e Bonferroni (concentração 1 X concentração 2 $\#p < 0.05$)

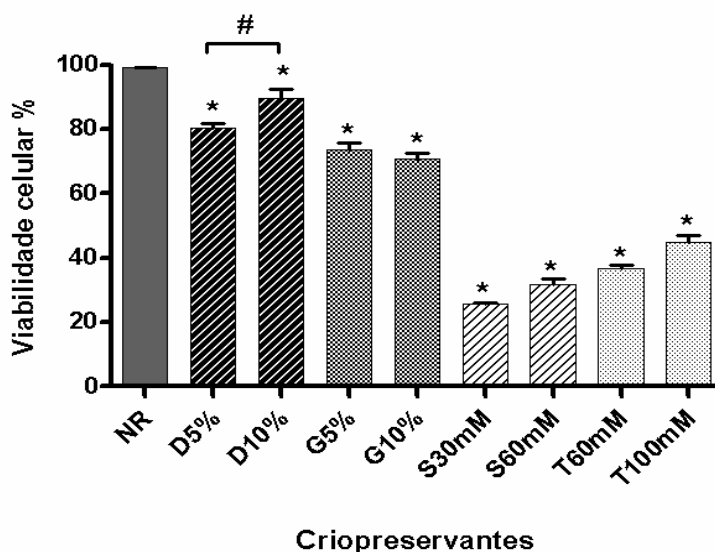


Gráfico 7 - Viabilidade das CTLA antes (NR) e após congelamento de 6 meses com diferentes criopreservantes pelo método gradual. As médias (desvio padrão) foram comparadas por One-Way ANOVA pós teste Dunnett (controle (NR) X criopreservantes $*p < 0.05$) e Bonferroni (concentração 1 X concentração 2 $\#p < 0.05$)

Na comparação entre as viabilidades obtidas entre o método padrão e gradual após 3 meses de congelamento não houve diferenças estatisticamente significativas.

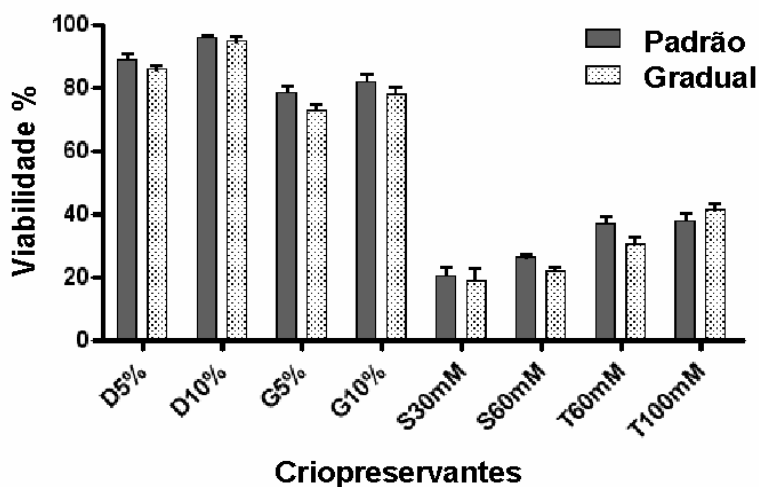


Gráfico 8 – Comparação da viabilidade celular obtida após congelamento das CTLA através do método gradual e padrão pelo período de 3 meses

Na comparação entre as viabilidades obtidas entre o método padrão e gradual após 6 meses de congelamento também não observamos diferenças estatisticamente significativas.

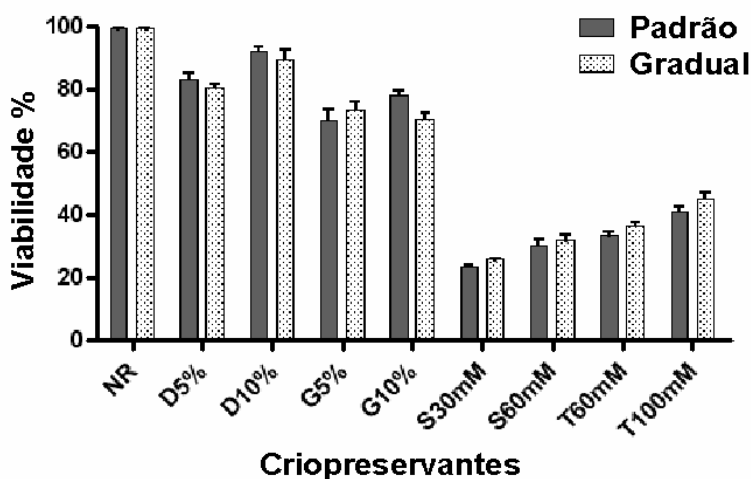


Gráfico 9 – Comparação da viabilidade celular encontrada após congelamento das CTLA através do método padrão e gradual pelo período de 6 meses

6.2 Análise dos marcadores de membrana pós-descongelamento

A maioria das proteínas expressa na membrana de células-tronco mesenquimais não tiveram sua presença alterada após o congelamento pelo

método padrão e gradual na análise por citometria de fluxo. A alta positividade para marcadores como CD29, CD44 e CD105 foi mantida e o mesmo aconteceu com os marcadores negativos: CD11b, CD34 e CD45. O mesmo resultado foi observado com as CTLA armazenadas durante 3 e 6 meses.

Padrão	CD11b	CD34	CD45	CD29	CD44	CD105
DMSO 5%	0,28%	0,29%	0,35%	98,30%	99,26%	33,89%
DMSO 10%	0,50%	0,74%	5,80%	99,81%	99,90%	99,18%
Glicerol 5%	0,40%	0,44%	0,84%	99,54%	99,91%	91,83%
Glicerol 10%	0,06%	0,09%	0,16%	99,10%	99,09%	10,60%
Sacarose 30mM	0,23%	0,81%	1,08%	99,74%	99,69%	32,03%
Sacarose 60mM	0,65%	1,14%	3,49%	99,43%	99,57%	71,71%
Trealose 60mM	0,30%	0,36%	0,37%	99,86%	99,98%	51,29%
Trealose 100mM	0,40%	0,48%	0,79%	99,91%	99,08%	32,40%

Tabela 4 – Marcadores de membrana (%) analisados por citometria de fluxo após congelamento pelo método padrão das CTLA

Gradual	CD11b	CD34	CD45	CD29	CD44	CD105
DMSO 5%	0,35%	0,58%	0,85%	96,06%	97,03%	39,82%
DMSO 10%	0,48%	75,00%	0,76%	99,67%	99,88%	12,35%
Glicerol 5%	0,17%	0,18%	0,39%	99,48%	99,85%	96,64%
Glicerol 10%	0,82%	1,07%	1,12%	99,71%	99,87%	9,70%
Sacarose 30mM	0,17%	0,22%	0,48%	99,29%	99,95%	49,28%
Sacarose 60mM	0,77%	0,96%	1,51%	99,35%	99,17%	26,69%
Trealose 60mM	0,29%	0,31%	0,48%	97,77%	99,85%	68,07%
Trealose 100mM	0,24%	0,46%	0,60%	99,50%	99,83%	81,93%

Tabela 5 – Marcadores de membrana (%) analisados por citometria de fluxo após congelamento pelo método gradual das CTLA

6.3. Avaliação do gene de indiferenciação Oct-4 pós-descongelamento

Todos os criopreservantes utilizados neste experimento mantiveram a expressão do gene de indiferenciação Oct-4 e, logo, a manutenção do seu estado indiferenciado das CTLA após 3 e 6 meses de congelamento como comprovado pela análise por RT-PCR (Figura 33).

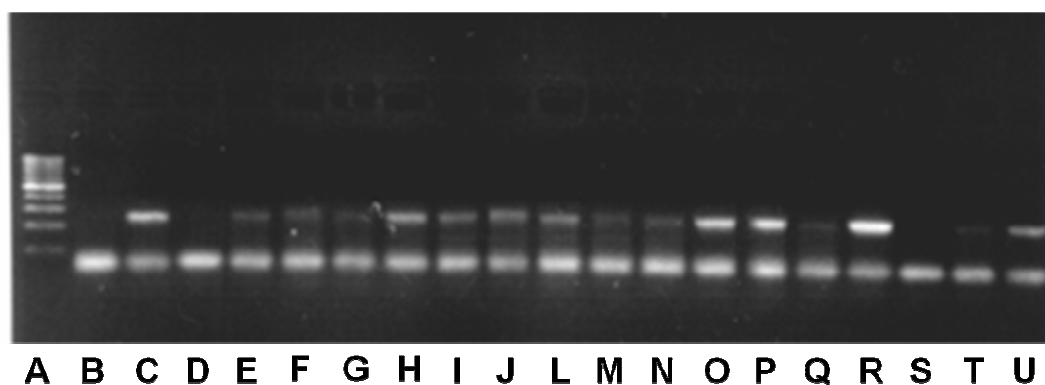


Figura 33 - Expressão do gene Oct-4 nas amostras de CTLA após descongelamento utilizando diferentes criopreservantes pelo método padrão e gradual; **A)** peso molecular – 100pb; **B)** água; **C)** NTERA-2 c1.D1; **D)** MRC-5; **E)** DMSO 5% padrão; **F)** DMSO 5% gradual; **G)** DMSO 10% padrão; **H)** DMSO 10% gradual; **I)** Glicerol 5% padrão; **J)** Glicerol 5% gradual; **L)** Glicerol 10% padrão; **M)** Glicerol 10% gradual; **N)** Sacarose 30 mM padrão; **O)** Sacarose 30 mM gradual; **P)** Sacarose 60 mM padrão; **Q)** Sacarose 60 mM gradual; **R)** Trealose 60 mM padrão; **S)** Trealose 60 mM gradual; **T)** Trealose 100 mM padrão; **U)** Trealose 100 mM gradual

6.4. Ensaio de diferenciação osteogênica pós-descongelamento

As amostras de CTLA congeladas por 3 e 6 meses com os criopreservantes DMSO, glicerol, sacarose e trealose, mantiveram seu potencial de diferenciação em tecido ósseo após estímulo com meio indutor próprio e coloração de Vermelho de Alizarina. A diferenciação osteogênica também foi possível com as CTLA congeladas pelos diferentes métodos: padrão e gradual (Figura 34).

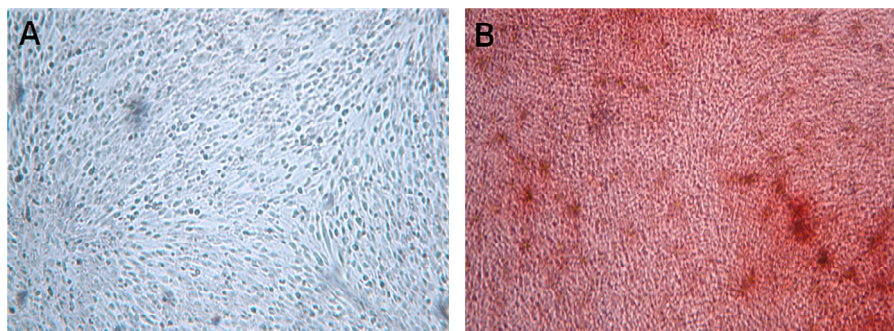


Figura 34 – Diferenciação osteogênica das CTLA confirmada pela coloração de Vermelho de Alizarina após criopreservação. **A)** controle negativo; **B)** diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados em vermelho.

DISCUSSÃO

As células-tronco são células progenitoras indiferenciadas que apresentam características peculiares, dentre elas, podemos destacar a alta taxa de proliferação em cultura, capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em inúmeros tecidos. As células-tronco mesenquimais, por sua vez, compõem um grupo particular de células-tronco adultas encontradas em várias partes do organismo com capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e não mesenquimais. As CTM mais bem estudadas, até o momento, são aquelas extraídas da medula óssea, entretanto esta fonte possui um procedimento de coleta relativamente difícil e apresenta uma concentração baixa de células mesenquimais em comparação com as células progenitoras hematopoéticas, fato que pode interferir no isolamento do tipo celular pretendido. O tecido adiposo, outro sítio celular que vem sendo amplamente estudado, também apresenta aspectos negativos visto que sua coleta envolve procedimentos cirúrgicos, seu processamento é mais elaborado e, conseqüentemente, mais demorado do que outras fontes. Recentemente os tecidos fetais, sobretudo a placenta e o cordão umbilical, passaram a receber maior atenção por apresentarem células com propriedades semelhantes àsquelas encontradas nas células-tronco embrionárias. Com todas estas constatações decidimos neste trabalho avaliar o líquido amniótico humano como uma fonte alternativa de CTM.

As amostras de LA foram obtidas sempre no segundo trimestre de gestação, visto que as punções intra-uterinas são contraindicadas nos

primeiros três meses de gestação por apresentarem alto risco de aborto, através da amniocentese. As coletas realizadas no último trimestre e a termo não foram utilizadas por nós já que poderiam conter células progenitoras com maior grau de diferenciação e, embora, trabalhos recentes tenham conseguido êxito no isolamento nestes períodos (You *et al.*, 2008), preferimos restringir nosso período de coleta.

Como no LA encontramos uma grande variedade de tipos celulares esfoliados do feto e, ainda, fatores como o tipo de coleta, a idade gestacional, meio de cultura empregado e densidade de inóculo utilizado sabidamente influenciam nas características das células que serão isoladas, resolvemos neste trabalho, padronizar técnicas de processamento, cultivo, expansão, diferenciação e, também, testar diferentes protocolos de criopreservação e criopreservantes para que pudéssemos bem caracterizar e criopreservar as células-tronco do LA.

Primeiramente constatamos que as amostras de LA recém coletadas podem ser armazenadas em geladeira antes do processamento por até duas semanas sem perder sua viabilidade e permitindo, desta forma, que suas células progenitoras sejam isoladas e expandidas em cultura. Mesmo nas ultimas semanas, onde a viabilidade celular das amostras caiu consideravelmente foi possível o isolamento e proliferação das células progenitoras. Trata-se de um achado importante visto que ele tira a urgência do processamento da amostra logo após a coleta e permite o transporte refrigerado da mesma por longas distâncias sem que esta perca suas características.

Para realização da contagem inicial das células presentes nas amostras recebidas determinamos primeiramente, um critério onde consideraríamos relevantes apenas àquelas células que denominamos como “células de interesse” (cerca de 1% do total encontrado no líquido amniótico) e descartaríamos as demais, como células esfoliadas do feto, hemácias, leucócitos e plaquetas. Isto significaria contar aquelas células de morfologia globosa, refringentes e com tamanho aproximado ao de células mononucleadas do sangue (linfócitos) que no nosso entendimento seriam as CTLA.

Após determinar o que contaríamos, padronizamos que as amostras de líquido amniótico contendo de 0 a 20.000 “células de interesse” seriam cultivadas em garrafas T-25 cm² (superfície pequena); de 20.000 a 50.000 em T-75 cm² (superfície média); e aquelas contendo mais de 50.000 células seriam plaqueadas em T-175 cm² (superfície grande). Desta forma definimos como seria o plaqueamento inicial de nossas amostras. A separação destas “células de interesse” do *pool* celular total através de anticorpos ou partículas magnéticas talvez seja o método mais adequado para isolamento, visto que assim não há possibilidade da presença de células indesejadas ou erros de contagem que prejudiquem o cultivo primário da amostra.

Na escolha do meio de cultura mais apropriado para o cultivo das células progenitoras oriundas do LA constatamos que o meio α -MEM proporcionou o melhor isolamento e crescimento dentre todos os meios analisados, diferentemente de muitos protocolos de cultura de células tronco que utilizaram o meio DMEM (Agha-Hosseini, 2010). Quando avaliamos se

os meios testados influenciavam na expressão celular do gene de indiferenciação Oct-4 pela técnica de RT-PCR notamos uma sugestiva diminuição e mudanças na morfologia das células quando da utilização dos meios RPMI 1640 e McCoy 5A. Isto se deve, provavelmente, a presença de uma maior concentração de nutrientes nas suas composições, principalmente neste último. Necessita-se agora quantificar precisamente a expressão do gene Oct-4 e confirmar estes dados. E, se comprovado tal fato, estudar qual diferenciação estas células estão sofrendo.

Durante o cultivo primário das amostras de LA percebemos a presença de três tipos celulares, com capacidade de aderência à superfície de cultivo (Milunsky, 1979; Kim *et al*, 2007): o primeiro epitelial, com células pequenas e compactadas provavelmente originárias da pele ou epitélio renal do feto; o segundo endotelial com células ovaladas e, por último, fibroblástico, com aparência alongada típica de fibroblastos e que predominou frente aos outros após o primeiro processo de dissociação e passagem celular. Os tipos epitelial e endotelial ainda requerem um maior estudo que permita seu isolamento das demais populações presentes no LA e possibilite um maior entendimento acerca de suas características biológicas, como expressão gênica, marcadores específicos e potencial de diferenciação.

Com os resultados provenientes da curva de crescimento padronizamos o número de 5.000 células a ser plaqueado por cm^2 de superfície a partir das passagens secundárias. Dessa maneira fica definido um número fixo a ser cultivado em função dos diferentes tamanhos de placas e garrafas de cultura, melhorando a reprodutibilidade dos

experimentos. Conseqüentemente também ficam padronizados os intervalos para troca de meio, o momento exato para a dissociação de cada garrafa de cultura e o número de células obtido a cada passagem.

O tempo de dobramento encontrado para as células progenitoras do LA, de aproximadamente 30 horas, assemelha-se a de outros estudos (Roubelakis, 2007) e, somado as análises de ciclo celular, comprovam o grande potencial proliferativo destas células. O estudo da DNAploídia, por sua vez, revelou que mesmo com a alta taxa replicativa, as CTLA não adquiriram alterações em seu genótipo. Contudo ainda são necessários estudos com tempos de cultura maiores para avaliação de genótipo, senescência celular e comprimento dos telômeros.

A expressão associada de genes chaves no processo de indiferenciação das células-tronco, como Oct-4, Sox-2 e Nanog deve ser amplamente investigada na caracterização das CTLA, visto que somente estes três juntos são responsáveis pelo controle de mais 2.000 outros genes. Os primeiros trabalhos que reportaram a existência de células-tronco no líquido amniótico (Prusa *et al.*, 2003; Tsai, 2004) limitavam-se na caracterização apenas pela expressão do gene Oct-4, mas é sabido por outros estudos que este gene, além de apresentar várias isoformas, sendo que algumas delas não têm papel na manutenção da indiferenciação, também é expresso em células adultas diferenciadas (Zangrossi *et al.* 2007).

A classificação proposta pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Horwitz, 2005) a respeito da definição de células-tronco mesenquimais baseia-se em três critérios o que, muitas vezes, gera dúvidas,

visto que estas propriedades sugeridas também são encontradas em outras células que nas as células-tronco (Haniffa, 2009). Para melhor caracterizá-las, além de avaliar o potencial de adesão à superfície, nos também utilizamos um painel longo de anticorpos primários marcados com fluorocromos para pesquisa de proteínas de membrana por citometria de fluxo. Este painel praticamente excluía a presença de células de origem hematopoéticas (CD14, CD34 e CD45 positivas) contaminantes na amostra de LA e valorizava a presença das proteínas de adesão típicas de células mesenquimais como CD29 e CD44. Diferentemente da maioria dos trabalhos com CTA, nós caracterizamos os ensaios de diferenciação celular não somente pelas colorações tradicionais, mas também pela expressão de genes típicos encontrados em cada tecido originado, fato que aumenta a credibilidade dos resultados encontrados. Outro aspecto importante avaliado neste trabalho foi a expressão dos genes de indiferenciação celular discutido anteriormente.

As CTLA confirmaram sua plasticidade através de ensaios de diferenciação em vários tipos celulares realizados conforme protocolos descritos na literatura (Pittenger, 1999). A diferenciação condrogênica mostrou-se capaz de ser realizada também em placas de cultura e não, somente, em tubos cônicos como mostrado na maioria dos trabalhos. A produção de colágeno do tipo II, típico de tecido cartilaginoso, foi semelhante nos dois materiais de cultivo utilizados. A expressão gênica de syndecan e perlecan, duas moléculas de glicosaminoglicanas encontradas na matriz extracelular da cartilagem corroboraram este achado. A presença do fator de

crescimento TGF-beta I no meio indutor de diferenciação é indispensável neste protocolo em acordo com pesquisas de outros autores (Worster *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2005). No protocolo adipogênico, a insulina apresenta grande importância na diferenciação visto que é capaz de ativar a expressão de um grande número de genes após se ligar a receptores da membrana celular (Meisler e Howard, 1989). As células diferenciadas passaram a expressar o receptor PPAR-gama que atua principalmente no metabolismo de lípidos e glicose e a enzima lipoproteína lipase que hidrolisa triglicerídeos e ácidos graxos e os armazena no interior dos adipócitos. A dexametasona, um hormônio glicocorticoide, também se mostrou indispensável visto que foi adicionada em todos os protocolos de diferenciação em tecidos mesenquimais. Acreditamos que as CTM apresentem vários receptores de glicocorticoides (GR) em sua membrana que interagem com este hormônio promovendo a ativação de inúmeros genes relacionados com o comprometimento à diferenciação celular.

A diferenciação neurogênica das CTM com obtenção de células neurais funcionais em cultura provoca muita discussão e requer, portanto uma caracterização mais ampla, visto que as sugestivas mudanças fenotípicas (prolongamentos citoplasmáticos) avaliadas podem ser causadas por possíveis efeitos de osmolaridade e toxicidade gerados pelo DMSO e pelo beta-mercaptoetanol (Neuhuber, 2004). A avaliação da expressão de certos genes, como nestina e CD133 para tal caracterização também é pouco segura já que estes são igualmente expressos em outros tecidos, não se tratando, portanto de marcadores específicos. Outro fato a ser considerado é

que o RNA mensageiro transcrito a partir destes genes pode não estar sendo traduzido em uma proteína funcional. Para uma caracterização mais fidedigna faz-se necessária a avaliação de parâmetros eletrofisiológicos, como canais de sódio e potássio voltagem dependentes, acúmulo de cálcio citossólico, potencial de membrana junto a uma extensa análise fenotípica e estudo de proteínas específicas.

No que diz respeito à capacidade imunomoduladora, outra importante característica das CTM, as CTLA também chamam a atenção, por estarem situadas no ambiente materno-fetal que se apresenta imunologicamente privilegiado. Além do mais, as células-tronco fetais expressam altos níveis de HLA-G, uma molécula do tipo I não-clássica pertencente ao Complexo de Histocompatibilidade Principal humano que desempenha um papel crucial na indução do estado de tolerância do feto semialogênico pelo sistema imune materno (Nauta, 2007). Outro ponto favorável é a presença de altas concentrações de progesterona disseminadas no líquido amniótico que promovem uma maior expressão de HLA-G. Fazem-se necessárias aqui investigações para comprovar de fato este potencial imunossupressor das CTLA que provavelmente seja superior àqueles encontrados em outras fontes de células tronco adultas. Comprovado isso, as CTLA seriam células promissoras no tratamento de doenças autoimunes, como a doença do enxerto versus hospedeiro, diabetes tipo I, esclerose múltipla, etc. (Aiuti, 2007; Wang, 2009).

A cultura de células-tronco, bem como na terapia celular em geral, necessita do congelamento para que estas possam ser preservadas a longo

prazo e utilizadas no futuro em outros ensaios *in vitro* e *in vivo*. Porém quando se trata da criopreservação de células-tronco, o tipo de congelamento e os criopreservantes utilizados devem ser escolhidos acertadamente para evitarem morte celular, efeitos colaterais ao receptor transplantado e, principalmente, a diferenciação destas células o que inviabilizaria o seu uso. Trabalhos como o de Sputtek e colaboradores, em 1997, demonstraram uma diminuição no potencial clonogênico de células-tronco sanguíneas bem como uma grande perda da integridade da membrana após o processo de congelamento e descongelamento. Com este intuito este trabalho testou também dois tipos de congelamento (padrão e gradual) e diferentes criopreservantes intra e extracelulares para a estocagem das CTLA em nitrogênio líquido.

Utilizamos dois dos principais protocolos de congelamento celular: o primeiro, o qual denominamos de padrão, foi realizado sempre manualmente com resfriamento gradativo feito em geladeira, freezer -80°C e, em seguida, nitrogênio líquido; o segundo chamado de gradual foi todo mecanizado com taxas de resfriamento programáveis antes do acondicionamento em N_2 . Entretanto, nós verificamos que não houve diferenças estatisticamente significantes quanto à viabilidade das CTLA após o congelamento de 3 e 6 meses entre os dois métodos. Talvez um aumento no tempo de congelamento destas células possa apontar um método preferencial. Com os resultados de momento resolvemos padronizar o método padrão como o de escolha para as CTLA visto que se trata de um protocolo de simples execução e economicamente mais viável do que o método gradual.

Quanto aos criopreservantes utilizados, podemos notar uma maior taxa de viabilidade pós-descongelamento e menor tempo de recuperação (tempo para atingir confluência) com o uso de DMSO na concentração de 10%. O fato de esta substância ser utilizada também para uma possível diferenciação neuronal não foi confirmado visto que as CTLA congeladas com ele mantiveram seu estado indiferenciado e plasticidade após o descongelamento. Isto pode estar relacionado ao fato de que as células após serem descongeladas eram lavadas com o próprio meio de cultura para retirada do excesso de criopreservante que poderia afetar o progresso das culturas. Com isso restavam quantidades ínfimas de DMSO no meio de cultura. Concluímos que este lavado prévio ao plaqueamento é de grande valia, visto que praticamente elimina o crioprotetor celular sem prejudicar as células e evita possíveis efeitos colaterais que as mesmas possam causar quando injetadas em pacientes ou modelos animais.

O glicerol, outro criopreservante intracelular, vem em seguida ao DMSO quando se trata do tempo de recuperação com alta viabilidade celular. Nota-se, que ambos agentes que apresentaram os melhores resultados são aqueles que penetram nas células evitando, sobretudo, a formação de cristais de gelo. O glicerol, contudo, é um criopreservante de difícil manuseio por apresentar uma alta viscosidade.

Sucrose e trealose, agentes criopreservantes extracelulares, proporcionaram baixas taxa de viabilidade e, conseqüentemente, longos tempo de recuperação celular em cultura. Provavelmente, estes dois

compostos não foram capazes de evitar a formação de cristais de gelo no interior das células resultando em uma grande taxa de morte celular.

Sob outro aspecto, verificamos que todos os criopreservantes utilizados mantiveram a expressão dos genes de indiferenciação Oct-4 e Nanog, não alteraram significativamente a presença dos marcadores de membrana e nem a plasticidade das CTLA que foram capazes de se diferenciar em tecido ósseo mesmo depois de congeladas como demonstrado no trabalho de Kotobuki *et al.*, 2005. cremos que o pouco tempo de contato entre as células-tronco e os criopreservantes proporcionado durante as etapas pré e pós-congelamento contribuíram na manutenção das características chaves das CTLA. Estudos recentes com a utilização de ambos os tipos de criopreservantes simultaneamente, intra e extracelulares, oferecem bons resultados na manutenção de células-tronco embrionárias e hematopoéticas como mostrado por Rodrigues, 2008, tornando-se uma opção para a criopreservação.

Com a confirmação do líquido amniótico como nova fonte de células-tronco mesenquimais, o melhor entendimento das características apresentadas pelas mesmas e a padronização das técnicas de isolamento, cultivo, diferenciação e congelamento fica possível caminhar a passos largos rumo à aplicação clínica destas células.

CONCLUSÃO

A partir de tudo que foi exposto e com base nos objetivos iniciais propostos para este trabalho, concluímos:

1. O líquido amniótico humano possui células-tronco mesenquimais passíveis de serem coletadas através da técnica de amniocentese no segundo trimestre de gestação e isoladas em cultivo;
2. O melhor meio de cultura para isolamento e cultivo das células-tronco do líquido amniótico que favorece sua rápida expansão sem interferir na plasticidade celular é o α -MEM suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células-tronco do líquido amniótico apresentam alta taxa de proliferação *in vitro* e não desenvolvem genótipo maligno até a terceira passagem em cultura;
3. As CTLA expressam os genes de indiferenciação Oct-4, Sox-2 e Nanog; apresentam também positividade para marcadores de membrana típicos como CD29, CD44, CD90 e CD105, enquanto não possuem os antígenos hematopoéticos: CD14, CD34 e CD45. Confirmando sua plasticidade são capazes ainda de se diferenciar em células da linhagem osteogênica, adipogênica, condrogênica e neurogênica;
4. Não há diferença estatisticamente significativa na viabilidade celular obtida pelos métodos padrão e gradual de congelamento das CTLA após 3 e 6 meses. Dentre os criopreservantes avaliados, as melhores taxas de viabilidade e de crescimento pós-congelamento foram obtidas com o

dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, embora todos os crioprotetores analisados tenham sido capazes de preservar o estado de indiferenciação e as demais características das CTLA, incluindo a expressão de Oct-4, plasticidade celular e marcadores de membrana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008. 15(2): 109-16.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005. 105: 1815-1822.

Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clin Transplant.* 2010. 1,24(2): 23-8.

Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology.* 2002. 57: 1801-1808.

Aiuti A, Cassani B, Andolfi G, Mirolo M, Biasco L, Recchia A. . Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J Clin Invest.* 2007. 117(8): 2233-40.

Alberio R, Campbell KH, Johnson AD. Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction.* 2006. 132(5): 709-20.

Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectant with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology.* 1987. 24: 324-331.

Anisimov SV, Christophersen NS, Correia AS, Li JY, Brundin P. "NeuroStem Chip": a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells. *BMC Genomics.* 2007. 8:46.

Arai F, Hirao A, Ohmura M. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell.* 2004. 118: 149–161.

Arakawa T, Timashe SN. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry.* 1982. 6536–6544.

Arnaud FG. Criopreservantion of human platelets with 14 M glycerol at -196C. *Thromb Res.*1989. 53:585-94.

Arom KV, Ruengsakulrach P, Jotisakulratana V. Intramyocardial angiogenic cell precursor injection for cardiomyopathy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008. 16(2): 143-8.

Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006. 355(12): 1222-32.

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004. 6(1): 7-14.

Bai X, Xiao Z, Pan Y, Hu J, Pohl J, Wen J, Li L. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 promotes the differentiation of mesenchymal stem cells into chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. 10,325(2):453-60.

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004. 8(3):301-16.

Balduino A. Análise Celular e Molecular do Componente Estromal da Região Subendosteal da Medula Óssea: o Nicho das Células-Tronco Hematopoéticas. 2006. Tese Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility viability and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*. 2001. 22: 1061-1069.

Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M. . Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002.30:42-48.

Baudot A, Caula C, Duarte ML, Fausto R. Thermal study of simple aminoalcohol solution. *Cryobiology*. 2002. 44:150-160.

Belfort P, Orland O. Medicina perinatal. São Paulo: Manole 1993. 39-45.

Benavides I .Utilidad de la citología del líquido amniótico en el diagnóstico prenatal del sexo. *Ginecol Obstet Mex*. 1983. 51(312): 83-7.

Bishop ML. Clinical Chemistry. Lippincott-Raven Publishers. 1996. 469-73.

Brittan M, Wright NA. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol*. 2002. 197: 492–509.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development bone repair and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994. 56(3): 283-94.

Byrne D, Azar G, Nicolaidis K. Why cell culture is successful after early amniocentesis. *Fetal Diagn Ther*. 1991. 6(1-2):84-6.

- Cancedda R, Bianchi G, Derubeis A, Quarto R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*. 2003. 21(5): 610-9.
- Caramia G. New perspectives in medicine: stem cells. *Pediatr Med Chir*. 2009. 31(3): 104-16.
- Cha S, Zugaib M. *Medicina Fetal*. São Paulo: Atheneu. 1993. 231-42.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype differentiation capacity immunological features and potential for homing. *Stem Cells*. 2007. 25(11): 2739-49.
- Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 2004. 23:7150–7160.
- Chen T, Acker JP, Eroglu A, Cheley S, Bayley H, Fowler A, Toner M. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells *Cryobiology*. 2001. 43:168–181.
- Cheng P, Zhou J, Gabilovich D. Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways. *Immunol Rev*. 2010. 234(1):105-19
- Chernykh ER, Stupak VV, Muradov GM, Sizikov MY, Shevela EY, Leplina OY .Application of autologous bone marrow stem cells in the therapy of spinal cord injury patients. *Bull Exp Biol Med*. 2007, 143(4): 543-7.
- Cheung AM, Kwong YL, Liang R, Leung AY. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006. 1(3): 305-15.
- Chiu C. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human marrow. *Stem Cells Dayton* 1996. 14:239-248.
- Clarke DL. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science Washington DC*. 2000. 288: 1660-1663.
- Colaco C, Sen S, Thangavelu M, Pinder S, Roser B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology (NY)*. 1992. 10: 1007–1011.
- Coquerelle C, Moser M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev*. 2010. 234(1):317-34.
- Crespigny L, Robinson HP, Ngu A. Pain with amniocentesis and transabdominal CVS. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1990. 30(4):308-9.
- Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. Anhydrobiosis Annu. *Rev. Physiol*. 1992. 54: 579–599.

Cunningham M, Williams Obstetricia. Buenos Aires: Médica Panamericana. 1998.20:859-66.

D'Amour KA, Agulnick AA, Eliazer S. . Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 2005. 23:1534–1541.

Dai W, Kloner RA. Myocardial regeneration by human amniotic fluid stem cells: challenges to be overcome. *J Mol Cell Cardiol.* 2007. 42(4): 730-2.

Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology.* 1997.48: 831-841.

Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development.* 2006. 133(6): 1193-201.

David NA. The pharmacology of dimethyl sulfoxide. *AnnuRev Pharmacol.* 1972. 2:353-374.

Davis JM, Rowley SD, Braine HG, . Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood.* 1990. 75:781-786.

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

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

Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med.* 2008. 6: 7.

Del Carlo RJ. Células-tronco. Revista do Conselho Federal de medicina Veterinaria Suplemento Técnico. 2005. 60-68.

Dhodapkar M, Goldberg SL, Tefferi A, Gertz MA. Reversible encephalopathy after cryopreserved peripheral blood stem cell infusion. *Am J Hematol.* 1994. 45:187-188.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002. 99: 3838-3843.

Ding XW, Wu JH, Jiang CP. ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* 2010. 24,86(17-

18):631-7.

Djouad F, Plence P, Bony C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003. 102:3837-3844.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003.17:984-9

Dzierzak E. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today*. 1998.

Elejalde BR de, Elejalde MM, Acuña JM, Thelen D, Trujillo C, Karrmann M. Prospective study of amniocentesis performed between weeks 9 and 16 of gestation: its feasibility risks complications and use in early genetic prenatal diagnosis. *Am J Med Genet*. 1990. 35 (2):188-96.

Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000. 109(1): 235-42.

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

Fahy GM, Macfarlane DR, Aangell CA. & Meryman H. T. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 1984.21: 407-426.

Farrant J. General observations on cell preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J. Low temperature preservation in medicine and biology. *Pitman Medical Limited Kent England*. 1980. 1-18.

Franchi-Pinto C, Pinto Jr. C, Beiguelman B. Meconium-Like Substance In Midtrimester amniotic fluid: significance for the neuropsychomotor evolution of the infant. *Brazilian Journal of Genetics*. 1994.105-108

Franks F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: Franks F. (Ed.) *Water: a comprehensive treatise*. New York Plenum Press. 1982. 215-218.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006. 24(4): 150-4.

Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974. 2(2):83-92.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell*. 2004. 116: 769–778.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science Washington DC*. 2000. 287: 1433-1438.

García JM, Español T, Gurbindo MD, Casas CC. Update on the treatment of primary immunodeficiencies. *Allergol Immunopathol*. 2007. 35(5): 184-92.

Garrett RW, Emerson SG. Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell*. 2009. 5,4(6): 503-6.

Gasper PW. The hemopoietic system. In: Feldman BF, . Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Williams & Wilkins 2000. 11: 63-68.

Gibbons RJ. Histone modifying and chromatin remodelling enzymes in cancer and dysplastic syndromes. *Hum Mol Genet*. 2005. 14 (1): 85-92.

Golbus MS, Stephens JD. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities and neural tube defects. *Clin Perinatol*. 1979. 6(2): 245-54.

Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone fat and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001. 7(11): 581-8.

Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1996.12: 131-147.

Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. *J. Physiol. Paris*. 2002. 96 1/2: 81-89.

Guettier C. Which stem cells for adult liver? *Ann Pathol*. 2005. 25: 33–44.

Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*. 2009. 94(2): 258-63.

Hashimoto J, Kariya Y, Miyazaki K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells*. 2006. 24(11): 2346-54.

Heissig B, Ohki Y, Sato Y. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology*. 2005. 10: 247–253.

Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004. 3: 1481–1483.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction*

Science. 2000.1/3: 3-22.

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

Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville E, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001. 1, 97(5): 1227-31.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009. 88(9): 792-806.

Humeau L, . Phenotypic molecular and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. *Blood*. 1996.

Huss R. Hematopoietic reconstitution of syngeneic mice with a peripheral blood-derived monoclonal CD34- Sca-1+ Thy-1(low) c-kit+ stem cell line. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000.

Hüttmann A, Gutersohn A, Noppeney R, Neumann T, Erbel R, Dührsen U. Rapid succession of peripheral blood progenitor cell mobilization cycles in patients with chronic heart failure: effects on the hematopoietic system. *Transfusion*. 2006. 46 (8): 1424-31.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, . Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001, 107(11): 1395-402.

Jain NC. Schalm's Hematology. 4 ed. Philadelphia: Lea and Fabiger 1986.

Jakubowski AA, Small TN, Young JW, Kernan NA, Castro-Malaspina H, Hsu KC . T cell depleted stem-cell transplantation for adults with hematologic malignancies: sustained engraftment of HLA-matched related donor grafts without the use of antithymocyte globulin. *Blood*. 2007. 110(13): 4552-9.

Kajiguchi M, Kondo T, Izawa H, Kobayashi M, Yamamoto K, Shintani S, . Safety and efficacy of autologous progenitor cell transplantation for therapeutic angiogenesis in patients with critical limb ischemia. *Circ J*. 2007. 71(2): 196-201.

Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, Cho DJ, Kang SG, You J. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Prolif*. 2007. 40(1):75-90.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, . Identification of bron- chioalveolar

stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005. 121: 823–835.

Kim I, Lee KH, Choi Y, Keam B, Koo NH, Yoon SS, . Allogenic stem cell transplantation for patients with advanced hematological malignancies: comparison of fludarabine-based reduced intensity conditioning versus myeloablative conditioning. *J Korean Med Sci*. 2007. 22(2): 227-34.

Knoblich JA. Asymmetric cell division during animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001. 2(1): 11-20.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells. Regulation of niche self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007. 9(1):204.

Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM, . Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic ultrastructural and metabolic studies. *J Comp Neurol*. 1996. 370(2): 203-30.

Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*. 2004. 28(1):33-9.

Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, . Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007, 8: 70.

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

Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *N Engl J Med*. 2001.

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

Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: Looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res*. 2004, 78: 433–446.

Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, . Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004. 60:307-315.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O.

Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003. 57:11-20.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, .Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103 (46): 17438-43.

Lemieux RU, Huber G. A chemical synthesis of sucrose. *J. Am. Chem. Soc.* 1953. 75 (16): 4118.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev.* 2005. 85: 1373–1416.

Liang L, Bickenbach JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells Dayton.* 2002. 20: 21-31.

Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport.* 1997. 8(14): 3-10.

Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2009. 106(6): 984-91.

Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, Brichard B, Li X, Nagler A, Giorgiani G, Haut PR, Brochstein JA, Nugent DJ, Blatt J, Woodard P, Kurtzberg J, Rubin CM, Miniero R, Lutz P, Raja T, Roberts I, Will AM, Yaniv I, Vermylen C, Tannoia N, Garnier F, Ionescu I, Walters MC, Lubin BH, Gluckman E, Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood.* 2001.101(6):2137-43.

Lovelock EJ, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulfoxide. *Nature.* 1959. 183:1394-5.

Maccario R, Podesta M, Moretta A, . Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* 2005. 90:516-525.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007.9(6):625-35.

Mazhari R, Hare JM. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007. 4(1): 21-6.

- Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research*. 1972. 71: 345-355.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Boccaletti R . Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*. 2006. 28(5): 523-6.
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N . Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*. 2008. 265(1-2): 78-83.
- McGuckin CP, Forraz N, Allouard Q, Pettengell R. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res*. 2004. 295(2): 350-9.
- McKay RD. Stem cell biology and neurodegenerative disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004. 359(1445): 851-6.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*. 2002. 57: 327-344.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M . Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 23-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004. 103:4619-4621.
- Meisler MH, Howard G. Effects of insulin on gene transcription. *Annu Rev Physiol*. 1989.51:701-14.
- Milunsky A. Alpha-fetoprotein and the prenatal detection of neural tube defects. *Am J Public Health*. 1979. 69 (6): 552-3.
- Milunsky A, Bender CS. Failure of amniotic-fluid cell growth with toxic tubes. *N Engl J Med*. 1979. 301(1): 47-8.
- Modlin IM, Kidd M, Lye KD . Gastric stem cells: An update. *Keio J Med*. 2003. 52:134–137.
- Moioli EK, Clark PA, Sumner DR, Mao JJ. Autologous stem cell regeneration in craniosynostosis. *Bone*. 2008. 42(2): 332-40.
- Morrison SJ, Shan NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997. 88:287-298.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by na easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002. 57: 1695-1706.

Nardi BN, Meirelles LS. Mesenchymal stem cells: isolation in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006. (174):249-82.

Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007. 110: 3499-3506

Nazareth HRS. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. *Rev. Bras. Genet*. IV. 1981. 450-470.

Negrin RS . Favorable treatment outcome in non-Hodgkin's lymphoma patients with "poor" mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000. 6(5): 506-12.

Neuhuber B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res*. 2004. 15,77(2):192-204.

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

Noguchi H. Stem cells for the treatment of diabetes. *Endocr J*. 2007. 54(1): 7-16.

Notarangelo LD, Forino C, Mazzolari E. Stem cell transplantation in primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006. 6(6): 443-8.

Odorico JS, Kaufmann DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dayton*. 2001. 19:193-204.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001, 410(6829): 701-5.

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

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

Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2004. 22(7): 1263-78.

Park KS, Lee YS, Kang KS. In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *J Vet Sci*. 2006. 7(4):343-8.

Patel AN, Sherman W. Cardiac stem cell therapy from bench to bedside. *Cell Transplant*. 2007. 16(9): 875-8.

Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2010. 90(1):67-74

Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl*. 2002. 38: 7-12.

Pinto Jr. W. Diagnóstico pré-natal e genético. *Neurologia Infantil*. Belo Horizonte. 1987. 74-82.

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. 284(5411):143-7.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004. 109: 656–663.

Polge C. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 1949. 164:166.

Prior HM, Walter MA. SOX genes: architects of development. *Mol Med*. 1996. 2(4): 405-12.

Prockcop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *J Cell Biochem*. 1997.

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

Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit*. 2002. 8(11): 253-7.

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

Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts conflicts and prospects. *J Clin Invest*. 2005. 115(12): 3318-25.

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Wei ES. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes.

Ann Thorac Surg. 2003. 75: 775–779.

Rapoport AP, Rowe JM, Packman CH. Cardiac arrest after autologous marrow infusion. *Bone Marrow Transplant.*1991. 7:401-403.

Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006, 312: 2169-2179.

Rasmusson I, Ringden O, Sundberg BL, Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res.* 2005. 305:33-41.

Reece EA. *Compêndio de Medicina Fetal e Materna.* Porto Alegre: Artes Médicas. 1996. 242-8.

Reiser J, Zhang XY, La Russa VF. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin Biol Therapy.* 2005.

Rezende J. *Obstetrícia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 8. ed.1998. 204-9.

Richards M, Tan SP, Tan JH. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells.* 2004. 22:51–64.

Robey PG. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest Thorofare.* 2000. 105(11): 1489-1491.

Rodrigues JP. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology.* 2008. 56:144–151.

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res.* 2008. 314(9): 1937-44.

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

Rowley SD. Haematopoietic stem cell cryopreservation. A review of current techniques. *J Hematother.* 1992. 1:233-250.

Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants trehalose and praline. *Cryobiology.* 1985. 22 367–377.

Sadler TW. Langman Embriologia Médica. 9ª ed. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro: 2005, 131-137.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002. 294: 371–379.

Sakai A, Larcher W. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Berlin Heidelberg Springer-Verlag*. 1987.

Sakashita K, Koike K, Kinoshita T, Shiohara M, Kamijo T, Taniguchi S. Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *J Clin Invest*. 2001, 108(8):1195-204.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*. 2000. 164(2): 247-56.

Sato M, Nakano T. Embryonic stem cell. *Intern Med*. 2001, 40(3): 195-200.

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

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002. 97:11307–11312.

Selmani Z, Naji A, Gaiffe E, Obert L, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2009. 15,87(9):62-6.

Slack JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science Washington*. 2000. 287:1431-1433.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006.107:1484-1490.

Sputtek A, Jetter S, Hummel K, Kühnl P. Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells: characteristics of suitable techniques. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*. 1997,34:79-83.

Stagg JS, Pommey N, Eliopoulos J, Galipeau. Interferon gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006. 107: 2570–2577.

Steponkus PL. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annual Review of Plant Physiology*. 1984. 35: 543-584

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005. 46(9): 1651-8.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Keio Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *J Med*. 2005. 54(3): 132-41.

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

Stroncek DF, Fautsch SK, Lasky LC. Adverse reactions in patients transfused with cryopreserved marrow. *Transfusion*. 1991. 31:521-526.

Tabor A, Jerne D, Bock JE. Incidence of rhesus immunisation after genetic amniocentesis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986. 30, 293 (6546):533-6.

Thomas ED, Lochte HL Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*. 1959. 38:1709-16.

Timmer M, Müller-Ostermeyer F, Kloth V, Winkler C, Grothe C, Nikkhah G. Enhanced survival reinnervation and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp Neurol*. 2004. 187(1): 118-36.

Toricelli F, Brizzi L, Bernabei PA, Gheri G, Di Lollo S, Nutini L. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Ital J Anat Embryol*. 1993. 98(2): 119-26.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev*. 2006. 27:208-219.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*. 2004. 19. 6 1450-1456.

Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003. 75: 389-397.

Tumbar T, Guasch G, Greco V. Defining the epithelial stem cell niche in skin.

Science 2004. 303: 359–363.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006. 36: 2566-2573.

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2005. 100(1): 12-27.

Urban VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, Uher F. Mesenchymal stem cell cooperate with bone marrow cells therapy in therapy of diabetes. *Stem Cells.* 2008. 26: 244-53.

Urbaniak Hunter K, Yarbrough C, Ciacci J. Stem cells in the treatment of stroke. *Adv Exp Med Biol.* 2010. 671:105-16.

Van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA, Mummery C. Heart repair and stem cells. *J Physiol.* 2006. 577(2): 467-78.

Vanderheyden M, Vercauteren S, Mansour S, Delrue L, Vandekerckhove B, Heyndrickx GR. Time-dependent effects on coronary remodeling and epicardial conductance after intracoronary injection of enriched hematopoietic bone marrow stem cells in patients with previous myocardial infarction. *Cell Transplant.* 2007. 16(9): 919-25.

Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MB, Mota A, Pinho-Filho JA, Almeida AJ. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. *Arq Bras Cardiol.* 2006. 87(2): 159-66.

Vogel G. Can old cells learn new tricks? *Science Washington.* 2000. 287: 1418-1419.

Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL. Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther.* 2002. 9(10): 606-12.

Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004. 22:1330-1337.

Wang L, Zhao RC. Mesenchymal stem cells targeting the GVHD. *Sci China C Life Sci.* 2009. 52(7): 603-9.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Sciece.* 2000. 481-492.

Watt FM, Hogan BLM. Out of the Eden: stem cells and their niches. *Science Washington DC.* 2000. 287: 1427-1430.

Watts C, McConkey H, Anderson L. Anatomical perspectives on adult neural

stem cells. *J Anat.* 2005. 207: 197–208.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science Washington DC.* 2000. 287:1442-1446.

Wolfe J, Bryant G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration.* 2001. 24: 438-450.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000. 15,61(4):364-70.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000.15, 61(4): 364-70.

Woodward WA, Chen MS, Behbod F. On mammary stem cells. *J Cell Sci.* 2005. 118: 3585–3594.

Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res.* 2001. 19 (4):738-49.

Yao S, Chen S, Clark J. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103: 6907–6912.

You Q, Cai L, Zheng J, Tong X, Zhang D, Zhang Y. Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008.103(2):149-52.

Yu BD, Mukhopadhyay A, Wong C. Skin and hair: models for exploring organ regeneration. *Human Molecular Genetics.* 2008. 17: 54-59.

Zaheer HA, Gibson FM, Bagnara M. Differential sensitivity to cryopreservation of clonogenic progenitor cells and stromal precursors from leukemic and normal bone marrow. *Stem Cells.* 1994.12:180-186.

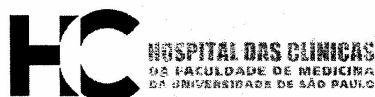
Zangrossi S, Marabese M, Brogginini M, Giordano R, D'Erasmo M, Montelatici E, Intini D, Neri A, Pesce M, Rebullia P, Lazzari L. Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells.* 2007. 25(7):1675-80.

Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002. 174(1): 11-20.

Zhou H, Ding S. Evolution of induced pluripotent stem cell technology. *Curr Opin Hematol.* 2010

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000. 2(6): 477-88.

ANEXO



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/06/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0410/09**, intitulado: "**CARACTERÍSTICAS DE EXPANSÃO, DIFERENCIAÇÃO E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO NO SEGUNDO TRIMESTRE DE GESTAÇÃO**" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski**

Pesquisador (a) Executante: **Felipe de Lara Janz**

CAPPesq, 19 de Junho de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)