

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

SAÚDE DA MULHER

Renata de Lima Bossi

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DA MASSA
CELULAR INTERNA DE BLASTOCISTOS PARA OBTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

SAÚDE DA MULHER

Renata de Lima Bossi

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DA MASSA
CELULAR INTERNA DE BLASTOCISTOS PARA OBTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Saúde da Mulher da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Reprodução Humana e Patologia Ginecológica e Mamária

Orientador: Prof. Dr. Selmo Geber

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2011

Renata de Lima Bossi

**AVALIAÇÃO DAS TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DA MASSA
CELULAR INTERNA DE BLASTOCISTOS PARA OBTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES**

Dissertação de mestrado defendida pela aluna acima e aprovada
pela banca de examinadores:

Prof. Dr. Selmo Geber – Orientador - UFMG

Prof. Dr Alfredo Miranda de Goes- UFMG

Profa. Dra. Márcia Mendonça Carneiro – UFMG

Belo Horizonte, 10 de novembro de 2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meu agradecimento ao Professor Doutor Selmo Geber, por acompanhar, orientar e proporcionar meu crescimento profissional e acadêmico;

Agradeço ao Professor Doutor Alfredo pela receptividade e apoio no desenvolvimento do projeto;

Aos professores da Faculdade de Medicina, pelos ensinamentos compartilhados;

Ao Dr. Marcos Sampaio, pelos questionamentos que sempre instigaram a busca pelo conhecimento;

Às amigas e amigos da Origen, pela compreensão, auxílio no desenvolvimento da pesquisa e momentos de descontração;

Às amigas Paula e Ju Lott, que muito ajudaram nos campos teórico e prático;

À Carol, pela ajuda essencial com o microscópio confocal;

Aos pacientes que colaboraram com a pesquisa, depositando sua confiança em nossos atos;

Aos meus pais, por serem meu modelo de ética, determinação e profissionalismo;

Aos meus irmãos, Guilherme, Isabela, Leonardo, Henrique e Fernando, por serem uma alegria em minha vida;

À minha família sempre presente;

E por último, e não menos importante, Samuel, pela inspiração, compreensão e ajuda nos momentos difíceis. Sua perseverança é o que me faz seguir em frente. Obrigada por sempre estar ao meu lado!

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

Albert Einstein

RESUMO

As células-tronco embrionárias são pluripotentes, podendo dar origem a células e tecidos dos três folhetos embrionários. Elas oferecem uma alternativa para o tratamento e até mesmo cura de várias doenças, uma vez controladas a sua diferenciação e condições de cultivo. As células-tronco embrionárias oferecem também um modelo para teste de fármacos e de toxicidade, além de permitir o acompanhamento das modificações moleculares e celulares associadas às doenças. Diversas formas de cultivo já foram utilizadas com sucesso para originar novas linhagens de células-tronco embrionárias. Foram testadas algumas formas de isolamento da massa celular interna; vários tipos de meios de cultivo; diversos tipos de suplementos como soro, hormônios, fatores de crescimento, citocinas e determinados tipos de células alimentadoras. O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes métodos de isolamento das células-tronco pluripotentes da massa celular interna de blastocistos utilizando a técnica mecânica, à laser, imunocirurgia ou plaqueamento total. Foram doados 27 embriões para pesquisa. Um embrião (3,7%) foi isolado mecanicamente; 3 (11,1%) isolados com imunocirurgia; 2 (7,4%) isolados com laser e 21 (77,8%) plaqueados total. A adesão foi confirmada 48 horas após o plaqueamento. Dezenove (70%) massas celulares internas isoladas aderiram às placas de Matrigel. Observamos que, após o plaqueamento total, 81% das células aderiram às placas, após a imunocirurgia a adesão foi de 33,3% e após o isolamento mecânico a adesão foi de 100%. Não observamos adesão quando isolamento foi feito com laser. Um total de 16 blastocistos era de boa qualidade com blastocele expandida, massa celular interna distinta e compacta. Onze blastocistos eram de baixa qualidade com blastocele pequena e massa celular interna indistinta. Não observamos diferença quando comparamos os resultados de adesão quando as células foram isoladas nos dias 5 ou 7 (66,7% x 77,8% , $P=0,67$). Também não observamos diferença nas taxas de adesão quando comparamos os métodos de retirada da zona pelúcida por laser ou pronase (33,3% x 75%, $P= 0,20$). A adesão foi significativamente maior quando os blastocistos eram de boa qualidade (87,5% x 63,6%, $P= 0,011$). Podemos concluir que dentre as técnicas utilizadas, a de plaqueamento total é de fácil aplicação e possui uma elevada eficácia para isolamento de células-tronco embrionárias.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias. Técnicas de isolamento. Massa celular interna.

ABSTRACT

Embryonic stem cells are classified as pluripotent and are able to differentiate into many of cell types and tissues from three germ layers. They represent an alternative for treatment and even cure of many diseases. Until now many different forms to isolate the inner cell mass have been tested, but none have shown to be a better option. Therefore the aim of this study was to evaluate different methods of stem cells isolation from a blastocyst's inner cell mass, using mechanical, laser, immunosurgery and whole blastocyst culture. Twenty seven embryos were donated for this research. One embryo (3,7%) was mechanically isolated; 3 (11.1%) were isolated by immunosurgery, 2 (7.4%) were isolated by laser and 21 (77.8%) by whole blastocyst culture. Cell adhesion was confirmed 48 hours after cells plating. Nineteen (70%) isolated inner cell mass were attached in plates with Matrigel solution. We observed that after whole blastocyst culture, 81% of the cells were attached in plates; after immunosurgery, cell adhesion was 33% and after mechanical isolation the cell adhesion was increased 100%. Cellular adhesion was not observed when the cells were isolated by laser technique. A total of sixteen blastocysts presented good quality, expanded blastocoele and inner cell mass compact, large and distinguishable. Eleven blastocysts presented low quality, with small blastocoele and tiny or indistinguishable inner cell mass. No significant differences were observed in cellular adhesion when comparing the day of inner cell mass isolation on day 5 or 7 blastocysts (66,7% x 77,8% , $P=0,67$). Rates of cell adhesion were not significantly different when we compared the methods of zona pellucida removal by laser or Pronase (33,3% x 75%, $P= 0,20$). Cellular adhesion was significantly higher when good quality blastocysts were used (87,5% x 63,6%, $P= 0,011$). We can conclude that whole blastocyst culture is easily applicable and highly efficient for isolation of embryonic stem cells.

keywords: *embryonic stem cells, isolation techniques, inner cell mass*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| µl | Microlitros |
| BCIP | Bromo-cloro-indol fosfato |
| bFGF | Fator de crescimento fibroblástico básico |
| BMP | Proteínas morfogenéticas ósseas |
| BSA | Soro albumina bovina |
| CDX2 | <i>Caudaltype homebox transcription factor 2</i> |
| CGH | Hibridização genômica comparativa |
| COEP | Comitê de Ética em Pesquisa |
| CONEP | Comissão Nacional de Ética em Pesquisa |
| CTEh | Células-tronco embrionárias humanas |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| EBSS | <i>Earle's balanced salt solution</i> |
| ESHRE | Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia |
| FBS | Soro fetal bovino |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FISH | Hibridização fluorescente <i>in situ</i> |
| FIV | Fertilização <i>in vitro</i> |
| FSHr | Hormônio folículo estimulante recombinante |
| GABA | Ácido aminobutírico |
| GnRH | Hormônio liberador de gonadotrofina |
| GSK3 | Inibidor da enzima glicogênio sintase kinase-3 |
| hCGr | Gonadotrofina coriônica humana recombinante |
| HEPES | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico |

| | |
|--------|---|
| HLA | Antígeno leucocitário humano |
| HSA | Albumina sérica humana |
| ICSI | Injeção intracitoplasmática de espermatozoide |
| IGF-II | Fator de crescimento insulínico II |
| kSR | Substituto <i>knockout</i> do soro |
| LIF | Fator inibidor de leucemia |
| MCI | Massa celular interna |
| mg/mL | miligramas por mililitros |
| MI | Metáfase I |
| MII | Metáfase II |
| mm | Milímetros |
| mM | Milimolar |
| N | Normal |
| NBT | <i>Nitro blue tetrazol</i> |
| NIH | <i>National Institutes of Health</i> |
| NP-40 | Nonil Fenoxi Polietoxietanol |
| OCT-4 | <i>Octamer-binding transcription factor 4</i> |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| Pg/mL | Picogramas por mililitros |
| PGD | Diagnóstico genético pré-implantação |
| PVP | Polivinilpirrolidina |
| RPM | Rotações por minuto |
| SSC | Tampão citrato de sódio |
| SSEA-4 | <i>Stage-specific embryonic antigen-4</i> |
| SSS | Substituto sintético do soro |

| | |
|--------------|--|
| TCLE | Termo de consentimento livre e esclarecido |
| TGF- β | Fator de crescimento transformador beta |
| UI/mL | Unidades internacionais por mililitros |
| VG | Vesícula Germinal |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Embriões no estágio de pró-núcleo..... | 38 |
| FIGURA 2 – Embriões no dia dois de desenvolvimento..... | 39 |
| FIGURA 3 – Biópsia Embrionária..... | 41 |
| FIGURA 4 – Hibridação Fluorescente <i>in situ</i> | 42 |
| FIGURA 5 – Retirada da zona pelúcida utilizando laser diodo..... | 43 |
| FIGURA 6 – Placa de cultivo da massa celular interna..... | 45 |
| FIGURA 7 – Blastocisto sem zona pelúcida..... | 46 |
| FIGURA 8 – Isolamento da massa celular interna utilizando-se laser diodo.... | 47 |
| FIGURA 9 – Isolamento mecânico da massa celular interna..... | 48 |
| FIGURA 10 – Isolamento da massa celular interna por imunocirurgia..... | 49 |
| FIGURA 11 – Causa de infertilidade das pacientes que doaram embriões para pesquisa de células-tronco embrionárias..... | 53 |
| FIGURA 12 – Blastocistos..... | 55 |
| FIGURA 13 – Métodos de isolamento da massa celular interna dos blastocistos..... | 57 |
| FIGURA 14 – Adesão celular à placa de cultivo..... | 58 |
| FIGURA 15 – Células da massa celular interna com 26 dias de cultivo..... | 60 |
| FIGURA 16 – Teste da fosfatase alcalina..... | 61 |
| FIGURA 17 – Teste da fosfatase alcalina 2..... | 62 |
| FIGURA 18 – Células isoladas da massa celular interna antes e depois do repique..... | 63 |
| FIGURA 19 – Imunohistoquímica..... | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com dia de desenvolvimento do blastocisto..... | 54 |
| TABELA 2 – Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com o método de retirada da zona pelúcida..... | 55 |
| TABELA 3 – Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com a qualidade embrionária..... | 56 |
| TABELA 4 – Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com método de isolamento da massa celular interna e média de dias de cultivo.... | 57 |
| TABELA 5 – Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com a qualidade embrionária e a técnica de isolamento utilizada..... | 59 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1 REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA..... | 16 |
| 1.2 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS..... | 18 |
| 1.2.1 Células-tronco pluripotentes e células-tronco multipotentes..... | 20 |
| 1.2.2 Fonte de embriões para pesquisa | 21 |
| 1.2.3 Meios de cultivo | 23 |
| 1.2.4 Células alimentadoras (feeder cells) | 26 |
| 1.2.5 Métodos de isolamento da massa celular interna..... | 28 |
| 2 OBJETIVO | 32 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 3.1 Tratamento de Reprodução Assistida | 35 |
| 3.2 Fonte de embriões para isolamento de massa celular interna..... | 39 |
| 3.2.1 Biópsia embrionária e diagnóstico genético pré-implantação | 40 |
| 3.3 Cultivo embrionário | 42 |
| 3.4 Retirada da zona pelúcida | 43 |
| 3.5 Isolamento da massa celular interna | 45 |
| 3.5.1 Plaqueamento total..... | 46 |
| 3.5.2 Plaqueamento após laser | 46 |
| 3.5.3 Plaqueamento após isolamento mecânico | 47 |
| 3.5.4 Plaqueamento após Imunocirurgia | 48 |
| 3.6 Cultivo da massa celular interna | 49 |
| 3.7 Imunohistoquímica | 49 |
| 3.8 Ensaio da fosfatase alcalina | 50 |
| 3.9 Análise estatística..... | 51 |
| 4 RESULTADOS | 52 |
| 5 DISCUSSÃO | 66 |
| 6 CONCLUSÃO | 85 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |
| APÊNDICE | 103 |

1 INTRODUÇÃO

Células-tronco são definidas como células indiferenciadas que possuem capacidade de se subdividir indefinidamente durante toda a vida do indivíduo. Quando submetidas a estímulos ou condições ideais, desenvolvem a capacidade de se diferenciar e originar células especializadas dos tecidos constituintes do organismo (PASQUALOTTO, 2007). Elas podem ser classificadas, quanto a sua natureza, como embrionárias ou adultas. Células-tronco embrionárias são originalmente obtidas de embriões fertilizados *in vitro* no quinto dia de desenvolvimento, o blastocisto (STOJKOVIC et al., 2004). Células-tronco adultas por sua vez, são obtidas de diversos tecidos: cordão umbilical, medula óssea, sangue, líquido amniótico, retina, cérebro, tecido adiposo, polpa dentária, dentre outros (BAKSH et al., 2004). Quanto à capacidade de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. Totipotentes são aquelas capazes de gerar todos os tecidos do organismo e anexos embrionários. Pluripotentes são aquelas capazes de gerar todos os tecidos do organismo, mas não os anexos embrionários. Multipotentes são aquelas que dão origem a tipos celulares do mesmo folheto embrionário da qual se originaram. Unipotentes são aquelas que dão origem a um único tipo celular (BAKSH et al., 2004; RIPPON & BISHOP, 2004; KLIMANSKAYA et al., 2008).

As primeiras linhagens de células pluripotentes estabelecidas foram obtidas de carcinoma embrionário, derivadas de tumores de células germinativas (RIPPON & BISHOP, 2004). Em 1981, células pluripotentes foram isoladas de blastocistos de camundongos e somente em 1998 cultivadas e propagadas com sucesso a partir de blastocistos humanos (MARTIN 1981; EVANS & KAUFMAN 1981; THOMSON 1998).

As células-tronco hematopoéticas foram as primeiras células-tronco tecido-específicas a serem isoladas, a partir da medula óssea de camundongos, na década de 80. As células-tronco hematopoéticas são também as únicas utilizadas clinicamente de forma rotineira para tratamento de doenças sanguíneas como leucemia e doenças autoimunes (Pasqualotto, 2007).

Estudos com células-tronco de diversas naturezas, fontes e variados potenciais de diferenciação, têm sido realizados em todo o mundo. Essas pesquisas podem auxiliar no tratamento e cura de diversas doenças, como diabetes, alterações cardíacas, lesões medulares, câncer, doenças autoimunes, hepáticas, doenças relacionadas ao trato urinário, infertilidade, doenças oculares, neurodegenerativas, dentre outras.

1.1 REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA

As técnicas de reprodução humana assistida, desenvolvidas para o tratamento de casais inférteis, apresentaram seu primeiro sucesso no ano de 1978 com o nascimento da primeira criança concebida por meio de fertilização *in vitro* clássica (FIV), na Inglaterra (STEPTOE & EDWARDS, 1978). A partir daí, seu uso clínico disseminou-se e o desenvolvimento da técnica se deu em ritmo crescente. Diversos conhecimentos foram obtidos a respeito do mecanismo de fertilização, desenvolvimento embrionário, objetivando a melhoria dos resultados para o tratamento de casais com menores chances de gravidez. Inicialmente, os embriões eram cultivados até o segundo dia de desenvolvimento, quando possuíam 2 a 4 células, sendo então, transferidos para o útero. Posteriormente, o desenvolvimento até o terceiro dia foi bem sucedido com resultados de gestação semelhantes aos obtidos em transferências no dia 2 (DAWSON et al., 1995).

O cultivo *in vitro* de embriões humanos até o estágio de blastocisto, também proporcionou grandes avanços no conhecimento das fases precoces do desenvolvimento humano. Inicialmente foi avaliado o tempo de divisão celular, posteriormente o número de células alcançadas a cada dia de desenvolvimento e, em seguida, o mecanismo de diferenciação celular, este ainda conhecido parcialmente (HARDY et al., 1989). As taxas de formação de blastocistos *in vitro* passaram a ser significantes, mas as taxas de gestação ainda eram diminutas (BOLTON et al., 1991).

Em seguida, iniciou-se o uso de técnicas de micromanipulação dos embriões cultivados *in vitro*. Blastômeros foram retirados de embriões, sem que houvesse danos ao seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto, (HARDY et al., 1989) e na contagem geral do número de células observada após 5 dias de clivagem. Também não houve danos para a primeira diferenciação celular, com geração de células do trofotoderma e da massa celular interna (GEBER et al., 1998). A partir destes resultados, iniciou-se uma nova possibilidade terapêutica, o diagnóstico genético pré-implantação (PGD). Essa técnica permitiu que casais com elevada chance de transmissão de doenças genéticas para seus descendentes pudessem ter os embriões avaliados, possibilitando a seleção de embriões isentos das doenças genéticas antes da transferência para o útero (GEBER et al., 1995; GERAEDTS et al., 1999; SERMON et al., 2005; HARPER et al., 2008). No final da década de 80, obtiveram-se os primeiros nascimentos de crianças sem doenças genéticas identificadas. (HANDYSIDE et al., 1990; GRIFFIN et al., 1994).

A descoberta de que espermatozoides poderiam ser injetados diretamente em óvulos recém captados sem danos a estes, com taxas de gravidez obtidas semelhantes às da fertilização *in vitro* clássica, revolucionou o tratamento para casais inférteis cuja gravidade do fator masculino impossibilitava a realização deste procedimento. Assim, uma nova opção terapêutica foi conquistada (PALERMO et al., 1992).

Posteriormente, o uso de meios de cultura foi reavaliado e embriões em estágio de blastocisto transferidos para o útero passaram a apresentar taxas de implantação semelhantes às aquelas obtidas com transferências realizadas em estágio de clivagem precoce (GARDNER et al., 1998). Esse novo conhecimento aumentou consideravelmente o entendimento a respeito do metabolismo e desenvolvimento embrionário *in vitro*, permitindo a obtenção de um maior número de blastocistos em laboratório (SAMPAIO & GEBER, 2001).

Paralelamente a estes avanços em medicina reprodutiva, vários estudos foram realizados com intuito de preservar a fertilidade por meio da criogenia. Embriões em todos os estágios de clivagem passaram a ser congelados e

descongelados, sendo mantida a possibilidade de proporcionar boas chances de gestação (TROUNSON & MOHR, 1983). Diante disso, casais com número elevado de embriões obtidos pelo tratamento com técnicas de reprodução assistida podem optar por mantê-los congelados por tempo indeterminado (Resolução do Conselho Federal de Medicina, número 1.358 de 1992 e resolução 1.957 de 2010). Não ocorrendo a gestação, os embriões excedentes podem então ser descongelados e transferidos para o útero, com razoáveis chances de implantação.

1.2 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

Os primeiros estudos com células-tronco embrionárias de camundongos foram descritos na década de 80, quando células da massa celular interna de blastocistos desenvolvidos *in vitro* foram isoladas (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). A partir desses resultados observaram-se indícios de que as células da massa celular interna poderiam dar origem a todos os tipos celulares. Esta descoberta inicial fez surgir uma nova alternativa terapêutica.

Outras espécies animais têm sido estudadas e algumas linhagens de células-tronco embrionárias já foram estabelecidas como as de coelhos (GRAVES & MOREADITH, 1993), primatas (THOMSON et al., 1996), porcos (LI et al., 2003) e cães (HAYES et al., 2008).

Bongso et al. (1994) foram os primeiros a isolar a massa celular interna de blastocistos humanos e cultivá-las *in vitro*. O primeiro estudo que apresentou derivação de células-tronco a partir de blastocistos cultivados *in vitro*, porém, foi publicado em 1998. Nesse trabalho, os autores demonstraram que linhagens de células pluripotentes formadas a partir de blastocistos humanos apresentam cariótipos normais com elevada atividade da telomerase, além de expressarem marcadores de superfície que caracterizam células-tronco embrionárias. Após proliferação indiferenciada por 4 ou 5 meses, os autores observaram que as células-tronco mantiveram o potencial de desenvolvimento

das três camadas germinativas, incluindo intestino, ossos, cartilagem, músculo, epitélio neural, epitélio estratificado escamoso (THOMSON et al., 1998).

A partir de então, vários trabalhos foram realizados envolvendo células-tronco embrionária (CTEh), criando seu conceito atual. As CTEh são capazes de autorrenovação ilimitada, podem ser propagadas em cultura por longos períodos e têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares provenientes dos três folhetos embrionários. A capacidade de direcionar esse processo de diferenciação permitiria que, a partir de células-tronco embrionárias, fossem cultivados controladamente os mais diferentes tipos celulares, possibilitando a construção de tecidos e órgãos *in vitro*, tornando, assim, viável a chamada bioengenharia de tecidos (MIKKOLA et al., 2006). As CTEh são, portanto, uma alternativa para o tratamento e até mesmo cura de doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, diabetes, lesões medulares (ODORICO et al., 2001; RIPPON&BISHOP, 2004; SIMÓN et al., 2005; MATEIZEL et al., 2006; TROPEL et al., 2010).

As diversas linhagens de CTEh oferecem também uma abordagem de estudo inovadora para doenças já que oferecem um modelo para teste de fármacos e de toxicidade, além de permitir o acompanhamento das modificações moleculares e celulares envolvidas na enfermidade.

Guhr et al. (2006) estimaram que havia aproximadamente 414 linhagens de CTEh obtidas em todo o mundo, das quais 78 eram registradas no *National Institutes of Health (NIH)*. Loser et al.(2009) verificaram que existiam aproximadamente 1071 linhagens de CTEh sendo que 179 foram caracterizadas e estariam disponíveis para pesquisas. O desenvolvimento de linhagens em várias partes do mundo é importante para sejam criadas células com diversos fenótipos de antígenos leucocitários humanos (HLA) de várias etnias proporcionando uma menor taxa de rejeição a transplantes das CTEh (ALLEGRUCCI & YOUNG, 2006).

O objetivo primário dos estudos das CTEh é identificar o processo pelo qual as células indiferenciadas tornam-se diferenciadas e quais os estímulos necessários para essa diferenciação, bem como para a manutenção do estado

indiferenciado. Já se sabe que as condições de cultivo são um fator determinante para o destino das CTEh, podendo influenciar na expressão gênica, modificando, assim, muitas propriedades dessas células (SKOTTMAN & HOVATTA, 2006).

Desde então, têm-se desenvolvido inúmeras técnicas de isolamento, cultivo, manutenção e armazenamento das CTEh visando à otimização e padronização dessas técnicas para possível utilização em terapias celulares.

1.2.1 Células-tronco pluripotentes e células-tronco multipotentes

As células-tronco embrionárias são células pluripotentes que podem dar origem a células e tecidos dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma (MIKKOLA et al., 2006). As células-tronco adultas, em sua maioria, são multipotentes, dando origem a células do mesmo folheto embrionário do qual foram originadas (BAKSH et al., 2004)

Diferentemente das células-tronco adultas, as células-tronco embrionárias possuem alta atividade de telomerase, o que conserva o comprimento dos telômeros, evitando que a células entrem em senescência precocemente (KSIAZEK 2009).

Diversos trabalhos já foram realizados com células-tronco adultas, sendo diversas as suas fontes: tecido adiposo (ZUK et al., 2001; KERN et al., 2006; CASTANHEIRA et al., 2009; GIUSTA et al., 2010), polpa dentária (PETROVIC & STEFANOVIC, 2009), cordão umbilical (BROXMEYER et al., 1990; ERICES et al., 2000; KERN et al., 2006), líquido amniótico (DE COPPI et al., 2007), medula óssea (PERIN et al., 2003; CASTANHEIRA et al., 2009; KERN et al., 2006; ASSIS et al., 2010), sangue periférico (RUHNKE et al., 2005; DAMON 2009). Para obter essas células, porém, alguns procedimentos cirúrgicos podem ser necessários. O cultivo *in vitro* prolongado muitas vezes é realizado para aumentar a quantidade de células disponíveis para serem utilizadas, e, mesmo assim, a quantidade pode não ser suficiente para um

transplante(PASQUALOTTO, 2007). Outro fator que deve ser considerado é o mecanismo pelo qual as células tronco adultas propiciam uma possível regeneração tecidual. Com isso, é importante saber se ocorre de fato o evento conhecido como plasticidade ou se as células-tronco adultas funcionam como células com efeito parácrino que vão somente produzir fatores solúveis para reparo, e não uma efetiva regeneração tecidual(KUCIA et al., 2005; KLIMANSKAYA et al., 2008).

Células pluripotentes podem ser obtidas de maneira alternativa retirando-se uma célula do embrião e cultivando-se o blastômero até o estágio de blastocisto para posterior isolamento da massa celular interna (KLIMANSKAYA et al., 2006; FEKI et al., 2008; GEENS et al., 2009). Podem ser obtidas também, por meio da ativação partenogenética de oócitos(LIN et al., 2007; MAI et al., 2007; REVAZOVA et al., 2007), indução de pluripotência de células adultas(TAKAHASHI et al., 2007; YU et al., 2007; PARK et al., 2008), transferência nuclear alterada(MEISSNER & JAENISH, 2006).

Todas as células-tronco e as técnicas desenvolvidas possuem suas vantagens e limitações, sendo igualmente importantes, pois permitem novas descobertas e avanços para cura de doenças. Frequentemente as pesquisas são complementares e ajudam a compreender os mecanismos envolvidos na manutenção e propagação do cultivo celular.

1.2.2 Fonte de embriões para pesquisa

As células-tronco podem ser obtidas de embriões de baixa qualidade, anormalmente fertilizados ou com alterações genéticas, não utilizados para transferência em ciclos de Reprodução Assistida. Vários autores relataram derivação de linhagens de células-tronco de embriões de baixa qualidade e fragmentados (MITALIPOVA et al., 2003; CHEN et al., 2005; LEROU et al., 2008; LIU et al., 2009; INAMDAR et al., 2009), de embriões fertilizados anormalmente (SUSS-TOBY et al., 2004), de embriões com alterações

verificadas por PGD (PICKERING et al., 2005; VERLINSKY et al., 2005; MATEIZEL et al., 2006; PEURA et al., 2007; TURETSKY et al., 2008; TROPEL et al., 2010). Para Cheng *et al* (2008) a qualidade do blastocisto, verificada, por exemplo, pelo tamanho da blastocele, está associada ao sucesso de derivação de linhagens pluripotentes. O número de células presentes na massa celular interna dos blastocistos segundo O'Leary et al.(2011) está diretamente relacionado à capacidade de gerar linhagens de células-tronco pluripotentes. Ström et al. (2010) não observaram, porém, relação entre a qualidade embrionária e o sucesso na obtenção de células-tronco embrionárias.

Os embriões fragmentados, com clivagem atrasada ou multinucleados, isto é, de baixa qualidade, determinam baixas taxas de gestação (ALIKANI et al, 1999), baixas taxas de implantação (GIORGETTI et al., 1995; ALIKANI et al., 1999), baixas taxas de sobrevivência nos procedimentos de congelamento e descongelamento (KARLSTROM et al., 1997) e altas taxas de anormalidades cromossômicas (SANDALINAS et al., 2001). Apesar de estes embriões formarem menos blastocistos e de serem de qualidade baixa, eles podem gerar linhagens de células-tronco normais e com importância significativa para formação de bancos públicos que contenham células de diversos grupos étnicos do mundo (INAMDAR et al., 2009). Fan et al. (2010) desenvolveram um meio de cultivo específico para embriões que apresentavam baixa qualidade. Esse meio aumentou as taxas de formação de blastocisto e melhorou a qualidade embrionária. Com isso, aumentaram também as chances de obtenção de novas linhagens de células-tronco a partir desses embriões. Os autores adicionaram ao meio de cultivo fator inibidor de leucemia (LIF) e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) o que aumentou em duas vezes a taxa de formação de blastocisto e sete vezes a qualidade dos blastocistos.

As células-tronco derivadas de embriões alterados após PGD podem ser úteis para testes de toxicidade e eficiência de drogas, além de servirem de modelo para estudos de doenças. Pickering et al. (2005) derivaram e caracterizaram uma linhagem de células-tronco que possuía uma mutação para o gene de fibrose cística. Esta linhagem pode ajudar a entender o desenvolvimento da doença e como ocorre a modificação das células para

fenótipo pulmonar. Verlinsky et al. (2005) reportaram obtenção de 18 linhagens de células-tronco com doenças genéticas, dentre elas, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, síndrome do X frágil, talassemia, adrenoleucodistrofia. Mateizel et al. (2006) derivaram três linhagens: uma de embriões alterados com fibrose cística, uma com distrofia muscular do tipo I e outra com doença de Huntington. Turetsky et al. (2008) obtiveram mais quatro linhagens de células-tronco embrionárias alteradas com distrofia miotônica tipo I, síndrome do X frágil, hemofilia A e fibrose cística, utilizando laser como forma de isolamento da massa celular interna. Em 2010, Tropel et al. derivaram mais linhagens oriundas de embriões alterados com diversas outras síndromes como: síndrome de Fabry, ataxia espinocerebelar, miopatia miotubular ligada ao X, neoplasia endócrina tipo 2a.

Peura et al. (2007) derivaram algumas linhagens de células-tronco normais de embriões alterados após PGD por Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). Embriões triplóides para cromossomos 13 e 21, por exemplo, deram origem a uma linhagem XX, normal. Embriões caóticos, com cinco sinais para cromossomo 13, três sinais para cromossomo X e 18, deram origem a uma linhagem igualmente normal. Narwaniet al. (2010) também obtiveram linhagens de células-tronco normais utilizando embriões com alterações verificadas por FISH. Os embriões possuíam trissomia dos cromossomos 14, 15 ou 18 e monossomias dos cromossomos 14, 16, 18 ou 21, mas provavelmente eram mosaico e durante a derivação e condições de cultivo houve seleção das células euploides normais.

1.2.3 Meios de cultivo

O meio de cultivo também tem um papel importante para manter as CTEh em seu estado de pluripotência. O primeiro meio de cultura utilizado foi o Eagle's MEM suplementado com soro fetal bovino (FBS), β mercaptoetanol, antibióticos e aminoácidos não essenciais. Esse meio mostrou-se eficaz na manutenção da pluripotência e desde então tem sido muito utilizado no cultivo

de CTEh. Meios de cultivo comerciais, já prontos para o uso, representam uma nova alternativa viável, segura e padronizada, com menor variação lote a lote para o cultivo de CTEh (HEINS et al., 2004; LI et al., 2005; GENBACEV et al., 2005, LUDWING et al., 2006).

Kim et al. (2009) observaram que altas concentrações de glicose no meio de cultivo das células-tronco embrionárias de camundongos era de fundamental importância para eficiência da derivação. Várias substâncias, como fatores de crescimento, já foram adicionadas aos meios de cultivo na tentativa de aprimorá-los. O fator inibidor de leucemia, por exemplo, não consegue manter as CTEh em estágio indiferenciado como mantém as células-tronco embrionárias de camundongos (SMITH et al., 1988; THOMSON et al., 1998; SATO et al., 2003).

Dois grupos (WANG et al., 2005; XU et al., 2005) observaram que a combinação de Noggin, um antagonista da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), e altas concentrações de bFGF são suficientes para manter as células indiferenciadas em meios de cultura livres de *feeder cells*. Várias outras substâncias complementares já foram adicionadas ao meio de cultura na tentativa de prolongar o estágio indiferenciado das CTEh, como ácido hialurônico (HEINS et al., 2004), fator de crescimento transformante beta (TGF- β), bFGF, LIF (AMIT et al., 2004), bFGF e inibidor da enzima glicogênio sintase kinase-3 (GSK3) (SATO et al., 2004), ativina A (BEATTIE et al., 2005) ativina A e bFGF (XIAO et al., 2006), TGF- β e fator de crescimento insulínico (IGF-II) (MONTES et al., 2009).

Uma tendência atual, no entanto, tem sido o desenvolvimento de sistemas de cultivo livre de substâncias animais a fim de se evitar os potenciais riscos de transmissão de patógenos animais para populações humanas, visando uma possível aplicação clínica. Já foi detectado no cultivo de células tronco-embrionárias humanas o ácido siálico não humano Neu5Gc, capaz de induzir uma resposta imunológica, quando mantidas em células murinas com substituto do soro (MARTIN et al., 2005).

Alguns autores como Vallier et al.(2005), Klimanskaya et al. (2005); Simón et al.(2005) ; Chen et al.(2006); Lu et al.(2006); Yao et al.(2006); Ludwing et al.(2006); Rajala et al.(2007); Navarro-Alvarez et al.(2008); Choo et al.(2008); Chen et al.(2009) já conseguiram algum sucesso no cultivo de CTEh sem substâncias provenientes de animais.

Baxter et al. (2009) analisaram as funções de fatores de crescimento e substratos necessários para manutenção e autorrenovação das linhagens de células-tronco embrionárias humanas. Os autores descreveram um meio contendo FGF2, ativina A, neurotrofina 4, suplemento N2 e B27 em matriz humana de fibronectina. Cada componente tem um papel essencial; o FGF2 e ativina A, por exemplo, previnem a diferenciação; neurotrofina 4 promove a sobrevivência celular; fibronectina suporta as altas taxas de expansão celular.

Li et al. (2005) e Genbacev et al. (2005) utilizaram para derivação de novas linhagens de células-tronco embrionárias o meio X-Vivo 10 que contém apenas proteínas humanas recombinantes e alguns fatores de crescimento também recombinantes, como bFGF, LIF, ligante recombinante flt3 e fator de células tronco. Ludwing et al. (2006) desenvolveram um meio de cultivo comercial mTeSR 1 contendo somente componentes recombinantes ou purificados humanos como o FGF, TGF β , ácido aminobutírico (GABA), ácido pipercolico, cloreto de lítio, além de anti-oxidantes, vitaminas, lipídeos e minerais.

O soro é outro componente fundamental para manutenção da pluripotência, pois contém diversos fatores de crescimento. O FBS foi o primeiro a ser utilizado no isolamento e propagação das células-tronco embrionárias, mas apesar de seu sucesso, seu uso tem sido evitado por se tratar de um produto animal, além da variação lote a lote verificada (THOMSONet al., 1998; REUBINOFF et al., 2000; CHASE&FIRPO 2007). Alguns autores utilizaram soro humano de adulto para cultivar as células pluripotentes (ELLESTROMet al., 2006; RICHARDS et al., 2002). Vários outros estudos, visando a utilização das células-tronco em terapias celulares, optaram por substitutos sintéticosou recombinantes de soro ao FBS. O substituto

*knockout*do soro (kSR), possui uma menor variação lote a lote quando comparado ao FBS, mas ainda possui proteínas animais, a exemplo da soro albumina bovina (BSA) (PRICE et al., 1998; GENBACEV et al. 2005; INZUNZA et al, 2005; RAJALA et al., 2007). Koivisto et al.(2004) observaram que quando foi utilizado o kSR, a taxa de crescimento era muito maior do que quando utilizava-se o FBS. Skottman et al., (2006) observou similaridades na expressão dos genes de pluripotência e também na morfologia das células indiferenciadas, ao utilizar FBS e kSR. Porém eles também observaram diferenças no perfil gênico das moléculas de adesão, como lamininas, integrinas e TGFBR1, que eram maiores no cultivo com FBS. Esse dado foi consistente com a observação que os autores fizeram de que há um decréscimo na adesão das células cultivadas em kSR. Rajala et al. (2007) verificaram a eficácia de substitutos do soro comercialmente disponíveis, no cultivo de células-tronco embrionárias. Os autores testaram cinco substitutos: *Lipumin 10x*, *SerEx 10x*, *Serum Replacement 3*, Substituto Sintético do Soro e *Plasmanate*, porém somente quando o meio continha 20% soro humano as células-tronco mantiveram-se indiferenciadas, resultado inferior ao uso kSR.

1.2.4 Células alimentadoras (*feeder cells*)

O primeiro trabalho no qual linhagens de CTEh foram estabelecidas utilizou fibroblastos embrionários de camundongos como *feeder cells* e meio de cultura condicionado suplementado com soro fetal bovino para manter as células no estado de pluripotência (THOMSON et al., 1998; SKOTTMAN & HOVATTA, 2006).

As células *feeders* têm um papel importante no cultivo de células-tronco embrionárias, pois liberam fatores de crescimento e citocinas que propiciam crescimento e inibem a diferenciação celular (LEI et al, 2007).

Sabe-se que para utilizar células como *feeders* é necessário inativá-las por radiação ou por substâncias químicas como mitomicina C, para que não

haja sobreposição e posterior diferenciação das células pluripotentes (THOMSON et al., 1998; PARK et al., 2003). Villa-Diaz (2009) determinou em seu estudo o melhor dia para inativar os fibroblastos embrionários de camundongos e plaquear as CTEh. O autor observou que quando as CTEh eram plaqueadas em fibroblastos, um dia após isolamento e preparo destes a partir de células de embriões de camundongos, havia um aumento no crescimento das células pluripotentes.

Alguns autores utilizaram também, com sucesso, células imortalizadas de camundongo para cultivo das CTEh, pois aquelas são mais fáceis de manusear e podem ser repicadas repetidamente por longos períodos (PARK et al., 2003; CAMARASA et al., 2009).

Para otimizar as condições de cultivo, muitos autores vêm optando por diferentes alternativas ao uso de células animais. Hovatta et al. (2003), Choo et al. (2004) e Inzunza et al. (2005) utilizaram fibroblastos de prepúcios humanos como suporte às CTEh para mantê-las indiferenciadas. Da mesma forma outros autores utilizaram fontes alternativas de fibroblastos humanos como: medula óssea (CHENG et al., 2003), tuba uterina (RICHARDS et al., 2002), placenta (MIYAMOTO et al., 2004; GENBACEV et al., 2005), endométrio (LEE et al., 2005). Células fetais, como pele e músculo, também já foram testadas com sucesso (FONG & BONGSO, 2006).

Vários grupos vêm desenvolvendo com sucesso sistemas de cultivo substituindo as *feeder cells* por matrizes extracelulares. Draper et al. em 2004 compararam a eficiência de diversas matrizes extracelulares no cultivo de células-tronco embrionárias, sendo que a associação de fibronectina e laminina mostrou melhores resultados. Outras matrizes celulares como o Matrigel (SATO et al., 2004; XU et al., 2005; PEBAY et al., 2005; FU et al., 2011), o Matrigel e laminina (CARPENTER et al., 2004; LI et al., 2005), fibronectina (AMIT et al., 2004; NOAKSSON et al., 2005), colágeno IV, fibronectina, laminina e vitronectina (LUDWING et al., 2006), mostraram-se eficientes na manutenção da pluripotência das CTEh. Klimanskaya et al. (2005) derivaram e

mantiveram células-tronco embrionárias em meio sem soro e com matriz extracelular.

Um outro sistema de cultivo foi criado utilizando-se células autogênicas. Ele consiste na diferenciação de algumas células-tronco em células tipo fibroblastose sua utilização para a manutenção da pluripotência. (XU et al., 2004; STOJKOVIC et al., 2005; YOO et al., 2005; CHOO et al., 2008). Posteriormente desenvolveu-se um sistema de cultivo com *feeder cells* autogênicas sem proteínas de origem animal que, juntamente com o meio de cultivo e fatores de crescimento, mantém a pluripotência das CTEh (CHEN et al., 2009). Cortes et al. (2009) observaram que ao cultivar as células-tronco embrionárias utilizando células-tronco mesenquimais como *feeders cells*, mais linhagens eram obtidas do que se fossem utilizadas células de prepúcio.

Aflatoonian et al. (2010) desenvolveram uma técnica de cultivo de células-tronco embrionárias baseada no cultivo dos embriões em microgotas, utilizando fibroblastos embrionários de camundongo ou fibroblastos humanos de gônadas fetais como *feeders cells*. Utilizando esse sistema os autores caracterizaram seis novas linhagens de células pluripotentes.

1.2.5 Métodos de isolamento da massa celular interna

O primeiro trabalho relacionado ao isolamento de massa celular interna de blastocistos de camundongos foi realizado por Solter & Knowles (1975). Foi utilizada a técnica de imunocirurgia, na qual blastocistos são expostos à pronase para retirada da zona pelúcida e a anticorpos em conjunto com complementos animais para lisar as células do trofotoderma. A partir daí, novas técnicas foram surgindo para tentar isolar a MCI de blastocistos de forma eficiente, sem utilização de componentes animais. Tanaka et al. (2006) e Cortés et al. (2006) utilizaram laser com auxílio de micromanipulador para isolamento da massa celular interna em embriões murinos. Apesar da promissora utilização em embriões murinos, o uso do laser para isolamento da

massa celular interna ainda não havia sido demonstrado em embriões humanos.

O primeiro trabalho de isolamento e propagação de células-tronco embrionárias humanas foi desenvolvido utilizando-se a técnica de imunocirurgia (THOMSON et al., 1998). Vários trabalhos posteriores também foram realizados utilizando-se essa técnica (REUBINOFF et al., 2000; LANZENDORF et al., 2001; AMIT&ITSKOVITZ-ELDOR 2002; MITALIPOVA et al., 2003; PARK et al., 2003; COWAN et al., 2004; STOJKOVIC et al., 2004; CHEN et al., 2005).

Em 1994, Bongso et al. reportaram a eficiência do isolamento mecânico da massa celular interna, porém sem posterior sucesso para manutenção e propagação das células-tronco. Visando um isolamento mais eficaz e menos prejudicial às células da massa celular interna de blastocisto, no qual não seriam utilizadas substâncias derivadas de animais, Genbacev et al.(2005) utilizou ácido Tyrode's para retirada da zona pelúcida, tendo sido o isolamento da MCI realizado mecanicamente, sem o uso de anticorpos ou substâncias derivadas de animais. Também foram utilizadas técnicas alternativas ao uso da imunocirurgia: dissecação mecânica e dissecação química das células do trofotoderma, por Hovatta et al.(2006) e Ellerstrom et al. (2006), respectivamente.

O plaqueamento total do blastocisto também é um método efetivo para derivação de linhagens de células-tronco embrionárias. Vários autores, evitando o uso de substâncias animais, utilizaram este método (HEINSE et al., 2004; SJÖGREN et al. 2004; STRELCHENKO et al., 2004; SUSS-TOBY et al., 2004; FINDIKLI et al., 2005; KIM et al., 2006)

Kim et al. (2006) desenvolveram e analisaram métodos de isolamento da massa celular interna de acordo com as características morfológicas dos blastocistos. Quando a massa celular interna era pequena e não muito distinta, foi utilizada a técnica de bissecção parcial do trofotoderma; quando a massa celular interna não era visível e indistinta, eles utilizaram a técnica de plaqueamento total do blastocisto. Após sete dias, as células remanescentes

de trofectoderma foram retiradas com auxílio de pipetas de luz reduzida. As duas técnicas foram tão eficazes ou melhores que a técnica clássica de isolamento – imunocirurgia – para isolamento da massa celular interna em embriões de qualidade inferior.

Peura et al. (2007) realizaram uma bissecção no blastocisto utilizando uma lâmina ultra-afiada, criando dois fragmentos: um contendo trofectoderma polar e a MCI, outro contendo somente células do trofectoderma mural.

Ström et al. (2007) utilizaram a técnica de isolamento mecânico para separar a massa celular interna de blastocistos. Os autores desenvolveram uma agulha de metal com pontas afiadas de 0,125 mm de diâmetro para a abertura da zona pelúcida e dissecação das células. A técnica se mostrou bastante eficaz para derivação de CTEh, sendo esta mais uma opção de isolamento da massa celular interna sem utilização de produtos animais.

Em 2008, o grupo de Cortés utilizou a técnica do plaqueamento total do blastocisto com posterior eliminação de células remanescentes do trofectoderma com auxílio de laser. (CORTÉS et al., 2008). Ainda em 2008, Turetsky et al. aplicaram o laser para isolamento de CTEh oriundas de blastocistos geneticamente anormais, verificado por PGD (TURETSKY et al., 2008). A técnica por eles empregada foi extraída daquelas utilizadas em isolamentos de massa celular interna de murinos, realizadas em 2006. As linhagens obtidas, das mais diversas síndromes, são importantes para o estudo do mecanismo destas doenças e para o desenvolvimento de modelos para testes de fármacos.

Em 2010 um grupo canadense criou um método de isolamento da MCI sem utilizar aparatos especializados de vidro ou agulhas de metal, utilizando apenas agulhas comuns de seringa. Eles obtiveram duas linhagens de células-tronco embrionárias utilizando este método alternativo, econômico e livre de produtos animais no cultivo (MENGET al., 2010).

As técnicas de isolamento da massa celular interna, portanto, são de suma importância para o sucesso da derivação de células-tronco embrionárias

e devem ser estudas para estabelecer e adequar o melhor protocolo a ser utilizado.

2OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes métodos de isolamento das células-tronco pluripotentes da massa celular interna de blastocistos utilizando a técnica mecânica, à laser, imunocirurgia ou plaqueamento total.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo experimental prospectivo para avaliar as diferentes técnicas para o isolamento de células do embrioblasto de blastocistos cultivados *in vitro* a partir das técnicas de reprodução assistida realizadas no Centro de Medicina Reprodutiva – Origen, do período de novembro de 2009 a março de 2011. Todos os casais receberam e assinaram termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) juntamente com uma explicação sobre a pesquisa a ser realizada (APÊNDICE). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Coep) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) em junho de 2009 sob o número 15153 (ANEXO 1 e 2).

3.1 Tratamento de Reprodução Assistida

As pacientes que doaram embriões para esse estudo foram submetidas ao tratamento pela técnica de Fertilização *in vitro* com injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Primeiramente foram submetidas à indução da superovulação, iniciada com supressão da função hipofisária com o uso de agonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Lectrum – Novartis – Brasil), administrado por via subcutânea no início da fase folicular ou na metade da fase lútea. Aproximadamente 10 dias após a aplicação, as pacientes foram avaliadas para confirmação da dessensibilização hipofisária, por meio de ultrassonografia endovaginal e pela dosagem dos níveis de estradiol sérico. Quando os níveis encontravam-se menores que 30 pg/mL e, ao ultrassom, observava-se uma espessura endometrial menor que 5 mm e ausência de cistos ovarianos, a paciente era considerada apta para a indução da superovulação. Todas as pacientes utilizaram o hormônio folículo estimulante na forma recombinante (FSHr – GonalF – Serono – Brasil) por via subcutânea. A dose inicial foi calculada de acordo com a idade da paciente e em seguida adequada de acordo com a resposta ovariana individual, avaliada por ultrassonografia endovaginal e pela dosagem dos níveis séricos de estradiol. Quando os folículos atingiam um diâmetro médio de 17 mm e os níveis de

estradiol estavam compatíveis, isto é, pelo menos 300 pg/mL por folículo, administrou-se 250 microgramas de hormônio da gonadotrofina coriônica recombinante (hCGr - Ovidrel – Serono – Brasil) para indução da maturação oocitária pela retomada da meiose. Aproximadamente 36 horas depois, foi realizada a punção folicular para aspiração oocitária, guiada por ultrassom endovaginal com auxílio de uma agulha ligada a uma bomba de vácuo, com a paciente sob sedação. (GEBER et al., 2001; GEBER et al., 2007)

Os folículos foram aspirados, e seu conteúdo coletado em tubos de ensaio de 14 ml (Falcon - EUA). Quando necessário, os folículos foram lavados utilizando-se meio de cultura de tamponado com ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES) (Sigma – EUA) a base de Earle's balanced salt solution (EBSS). O conteúdo foi colocado em placas de Petri, de 100 mm x 20 mm (Corning – EUA), dentro da capela de fluxo laminar, e foi observado sob aumento de 8 vezes em microscópio estereoscópico (Nikon - Japão). Os oócitos identificados foram colocados em placas de cultivo de 60 mm x 15 mm (Corning – EUA) contendo gotas de 20 µl de meio de cultura GIVF (Vitrolife-Suécia) suplementado com 10% de Albumina Sérica Humana (HSA) (Vitrolife-Suécia), cobertas com óleo de parafina (LifeGlobal – EUA), preparadas e equilibradas 12 horas antes (GEBER et al., 2002)

Os oócitos foram incubados durante duas horas na estufa com atmosfera de 7% de CO₂ a uma temperatura de 37° C. Após este tempo eles foram colocados em placas de 35 mm x 10 mm, contendo meio tamponado com HEPES e hialuronidase 80 UI/ml (Sigma – EUA) durante 30 segundos. As células do *cumulus* foram removidas enzimaticamente. As células da *corona* foram removidas através da denudação mecânica, utilizando-se pipetas Pasteur com luz reduzida. A remoção do *cumulus* dos oócitos possibilitou a verificação do estágio de maturação (GEBER et al., 2002)

O estágio de maturação dos oócitos foi confirmado em microscópio invertido (Nikon – Japão), utilizando-se o aumento de 200X. Os oócitos foram classificados como imaturos ou vesícula germinal (VG) se possuísem núcleo contendo um nucléolo; maturidade intermediária ou metáfase I (MI) se não

possuíssem corpúsculo polar e núcleo com nucléolo; maduros ou metáfase II (MII) se possuíssem corpúsculo polar no espaço perivitelinico (GEBERet al, 2002).

Os espermatozoides foram obtidos pela coleta do sêmen por masturbação. Após liquefação de 15 minutos, o sêmen foi analisado sob microscópio de contraste de fase (Nikon – Japão) para contagem de motilidade e concentração em câmara de Makler (Sefi-Medical Instruments – Israel). O sêmen foi preparado com gradiente de densidade (Isolate – Irvine Scientific – EUA) para retirar o líquido seminal, células e selecionar os espermatozoides viáveis. Em um tubo de 5 mL foi colocado 0.5 mL de solução *LOWER* do Isolate, depois delicadamente foi adicionada 0.5 mL da solução *UPPER* do Isolate e sobre esta camada foi colocado 0.5 mL do sêmen. O material foi centrifugado a 1500 rotações por minuto (RPM) por 20 minutos. Em seguida, a última camada formada no fundo do tubo foi retirada e colocada em um novo tubo para ser centrifugada com 1 mL de meio de cultivo tamponado com HEPES suplementado com substituto sintético do soro (SSS) (Irvine Scientific – EUA) e 0.47 mM de piruvato, por 10 minutos a 2000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de meio de cultivo com HEPES suplementado com SSS e piruvato, novamente centrifugado a 2000 RPM. O sobrenadante foi descartado e 0.3 mL de meio de cultivo GIVF (Vitrolife – Suécia) suplementado com 10% HSA (Vitrolife – Suécia) foi adicionado ao *pellet* e o tubo foi colocado na estufa úmida a 37° C e 7% de CO₂ para capacitação dos espermatozoides (GEBERet al., 2002; AHUMADA et al., 2006).

Os oócitos em MII foram utilizados para realização da ICSI. Para a realização da mesma, foram feitas placas de Petri 50 x 9 mm (Falcon – EUA) com seis gotas de 5 µl de meio tamponado com HEPES suplementado com SSS e piruvato, duas gotas de polivinilpirrolidina (PVP) (Irvine Scientific – EUA), cobertas com óleo de parafina (LifeGlobal – EUA). Nas gotas de meio foram colocados os oócitos e em uma das gotas de PVP foi colocado 1 µl do sêmen capacitado. A placa foi colocada sob o microscópio invertido (Nikon – Japão) acoplado ao micromanipulador (Narishige – Japão) para captação dos

espermatozoides morfologicamente normais com auxílio de micropipetas (Humagen – EUA). Foram imobilizados e capturados espermatozoides com motilidade progressiva, com acrossoma, cabeça, peça média e flagelo de tamanho normais. Um espermatozoide, devidamente imobilizado, foi injetado no citoplasma de um oócito com auxílio de duas micropipetas: uma para fixar o oócito e uma para alocar o espermatozoide dentro do ooplasma (PALERMO et al., 1992, GEBER et al., 2002)

Após a ICSI os oócitos foram colocados em placas de cultivo contendo gotas de 20 µl de meio G1 versão V (Vitrolife – Suécia) ou Global (LifeGlobal – EUA), cobertas com óleo de parafina (LifeGlobal – EUA) , em estufa úmida a 37° C e 7% CO₂. Dezenove horas após a injeção foi observada a fertilização em microscópio invertido no aumento de 200 vezes. Zigotos normais exibiam dois corpúsculos polares e dois pró-núcleos. Os zigotos anormalmente fertilizados possuíam três ou mais corpúsculos polares e/ou pró-núcleos ou somente um pró-núcleo e/ou um corpúsculo polar, tendo portanto, sua carga genética alterada sendo assim inadequados para a transferência (GEBER et al., 2002; BALABAN et al., 2004; NOYES et al., 2008) (FIG. 1). Esses embriões foram então solicitados para serem utilizados na pesquisa visto que, outros trabalhos já demonstraram a eficácia em derivar células-tronco de embriões de má qualidade (SUSS-TOBY et al., 2004; LEROU et al., 2008; LIU et al., 2009)

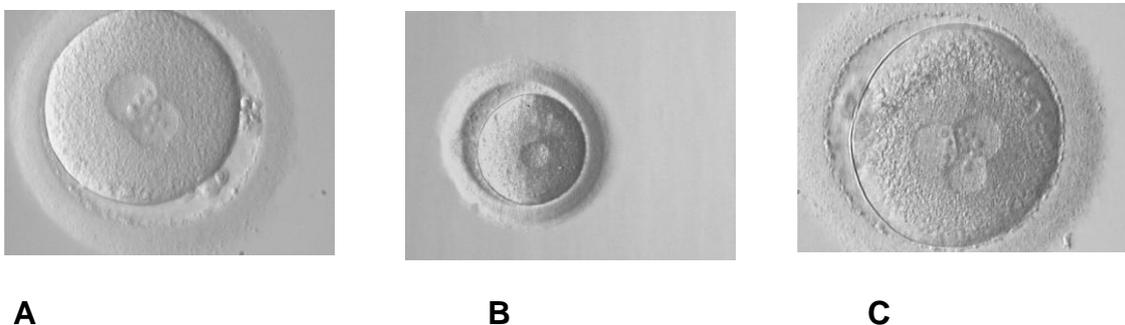


FIGURA 1- Embriões em estágio de Pronúcleo. A) Presença de dois pró-núcleos e dois corpúsculos polares **B)** Presença de um pró-núcleo **C)** Presença de três pró-núcleos.

Após 24 horas adicionais, os embriões deveriam apresentar duas a quatro células regulares e um grau de fragmentação menor que 20% para serem transferidos (FIG. 2). O número de embriões transferidos era definido pela idade materna em acordo com o código de ética médica (Resolução número 1.358 de 1992 e resolução 1.957 de 2010). Para o procedimento, os embriões foram colocados em um cateter (Sydney IVF – Cook – EUA) com meio de cultivo e depositados no endométrio com auxílio de ultrassom abdominal. Embriões excedentes, com características morfológicas acima citadas, eram congelados por congelamento lento ou vitrificação (TROUNSON & MOHR, 1983; KUWAYAMA et al., 2005; ABDELHAFEZ et al., 2010).

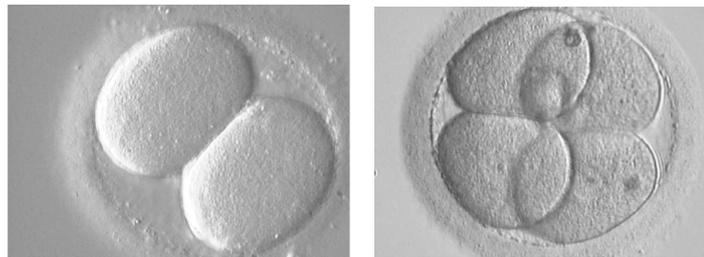
**A****B**

FIGURA 2- Embriões no dia dois de desenvolvimento. A- Embrião com duas células após 48 horas em cultivo **B-** Embrião com quatro células.

3.2 Fonte de embriões para isolamento de massa celular interna

Os embriões utilizados no estudo foram aqueles anormalmente fertilizados e alterados geneticamente após diagnóstico genético pré-implantação, doados pelos pacientes em tratamento para infertilidade conjugal (SUSS-TOBY et al., 2004; MATEIZEL et al., 2006; TURETSKY et al., 2008; VERLINSKY et al., 2009; TROPEL et al., 2010).

3.2.1 Biópsia embrionária e diagnóstico genético pré-implantação

O PGD pode ser realizado para buscar doenças genéticas nos embriões dos casais que possuem riscos elevados de transmissão destas. No caso de doenças monogênicas a reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para detectar alterações em genes conhecidos. Para alterações numéricas e estruturais, como translocação Robertsoniana, a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) é a técnica mais adotada (GRIFFIN et al., 1994; GERAEDTS et al., 1999; SERMON et al., 2005; MATEIZEL et al., 2006; HARPER et al., 2008).

No terceiro dia de desenvolvimento os embriões que possuíam cinco a dez células, das pacientes com indicação para procedimento, foram submetidos à biópsia embrionária para a retirada de uma célula, para análise cromossômica por FISH. Os embriões foram colocados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem cálcio e magnésio (Sigma - EUA) e com auxílio do laser dióxido (Octax - Alemanha) acoplado em microscópio invertido (Nikon - Japão) foi feito um orifício na zona pelúcida, com dois a quatro tiros de nove milissegundos. Micropipetas acopladas ao micromanipulador (Narishige - Japão) fixaram o embrião e uma célula foi retirada por aspiração (GEBER et al., 1995; HARPER et al., 2008, GEBER et al., 2011) (FIG. 3).

A célula retirada foi colocada em uma solução de citrato de sódio 1% (Sigma – EUA) suplementado com 0.2 mg/mL de HSA (Vitrolife – Suécia) para hipotonia. Após 1 minuto a célula foi transferida para uma solução a 1% de Tween 20 (Sigma – EUA) e ácido clorídrico 0.01 N (Merck – Alemanha) por 30 segundos, e colocada em uma lâmina para o processo final de fixação. Uma vez colocada na lâmina, a membrana celular rompeu-se extravasando citoplasma, liberando o núcleo para o processo de hibridação. Após a secagem completa da lâmina foi adicionada uma solução de metanol (Merck – Alemanha) e ácido acético (Merck – Alemanha) na proporção 3:1, para finalizar a fixação (DOZORTSEV & MCGINNIS, 2001).

As lâminas foram então lavadas em banhos com crescentes concentrações de etanol (Merck – Alemanha) 70%, 85% e 100%, durante 5 minutos, em cada. As lâminas foram colocadas em solução de desnaturação a uma temperatura de 73° C, por 5 minutos. Após a desnaturação, as lâminas foram passadas nas soluções com concentrações crescentes de etanol 70%, 85% e 100%, por um minuto em cada solução. As sondas de DNA (AneuVysion – Vysis CEP 18/X/Y-alfa satélite/LSI 13/21, Abbott – Alemanha) foram colocadas em banho-maria durante 5 minutos e 10 µl foi colocado sob as lâminas. Foram colocadas lamínulas e as lâminas foram colocadas em câmara úmida, dentro da estufa seca aquecida a 42° C por 6 a 24 horas, para o processo de hibridação. Após a hibridação as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram lavadas em solução de tampão citrato de sódio com detergente nonil fenoxi polietoxietanol (0.4X SSC/0.3% NP-40), em banho-maria a 72° C, por 2 minutos. Depois deste tempo as lâminas foram colocadas em solução de lavagem (2X SSC/0.1% NP-40) a temperatura ambiente, por um minuto. As lâminas foram retiradas e colocadas para secar no escuro. Após a secagem total, foi colocado 10 µl do contra corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e colocadas novamente as lamínulas. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (AxioStar Zeiss – Alemanha) para visualização das marcações fluorescentes nos cromossomos buscados (GRIFFIN et al, 1994; AneuVysion – Abbott, 2006) (FIG. 4).

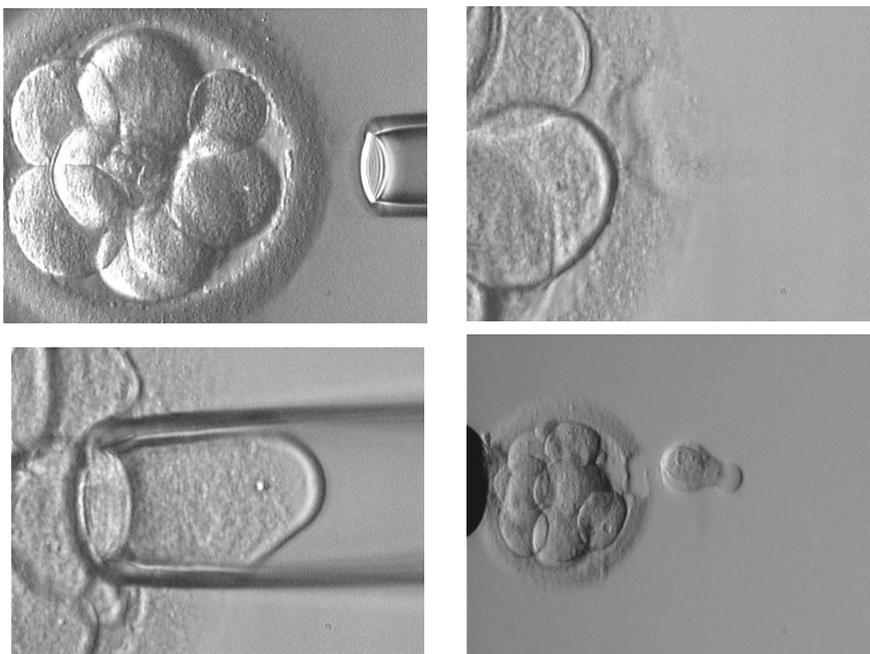
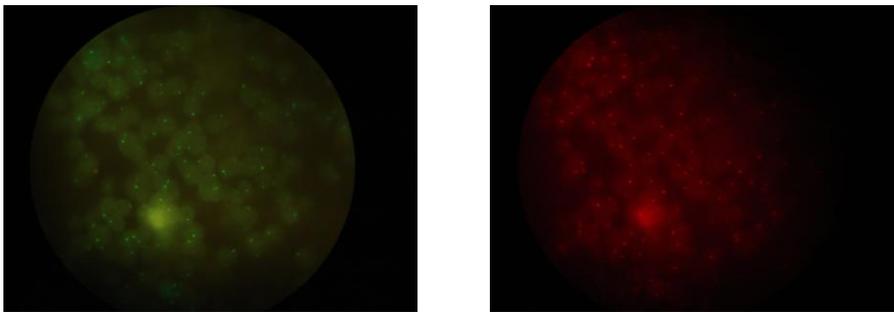


Figura 3- Biópsia embrionária. O embrião no terceiro dia de desenvolvimento possuía de 6 a 10 células. Três tiros de laser diodo foram realizados na zona pelúcida para que uma micropipeta acoplada ao sistema de micromanipulação pudesse retirar uma célula para análise. Através de uma pressão negativa a célula foi aspirada, o embrião ileso, voltava para o cultivo.



A. B.

FIGURA 4- Hibridização fluorescente *in situ*.A. Marcação fluorescente para cromossomo 13 em verde de um blastocisto **B.** Marcação fluorescente para cromossomo 21 em vermelho em um blastocisto. Microscópio Axiostar Zeiss, aumento 1000 X.

3.3 CULTIVO EMBRIONÁRIO

Os embriões foram mantidos em meio de cultura Global (LifeGlobal – EUA) suplementado com 10mg/mL de albumina sérica humana (LifeGlobal – EUA) em gotas de 20 μ l cobertas com óleo de parafina (Life Global – EUA) em estufa úmida a 37° C e 7.0% de CO₂ até atingirem o estágio de blastocisto. A partir daí, aqueles que atingiram adequadamente o estágio de blastocisto, após 7 dias de cultivo, foram incluídos no estudo (GARDNER & LANE, 2002;

BIGGERS & SUMMERS, 2008; WIRLEITNER et al., 2010; SAMPAIO & GEBER, 2001; GEBER et al., 2009).

3.4 RETIRADA DA ZONA PELÚCIDA

A zona pelúcida foi retirada daqueles blastocistos em que não ocorreu a extrusão espontaneamente após o sétimo dia de cultivo *in vitro*. Foi utilizado o laser diodo (Octax – Alemanha) acoplado em microscópio invertido com sistema de micromanipulação ou pronase 0.5% 10 UI/mL (Sigma - EUA). Quando o laser foi utilizado, foram disparados 15-20 tiros de 10 milisegundos na zona pelúcida dos embriões e posteriormente os resquícios da zona foram retirados com pipetas Pasteur com a luz reduzida (STRELCHENKO et al, 2004; GEBER et al., 2005; WANG et al., 2005; EBNER et al., 2005; KIM et al., 2006; TURETSKY et al., 2008; GEBER et al., 2011) (FIG. 5).



A.B.

FIGURA 5- Retirada da zona pelúcida utilizando laser diodo.A. Micromanipulador acoplado ao microscópio invertido com sistema de laser diodo Octax. B. Blastocisto tendo sua zona pelúcida retirada através do uso do laser, foram disparados 15 tiros de 10 milisegundos (seta). Posteriormente o excesso de zona pelúcida foi retirada com pipeta Pasteur com luz reduzida.

A outra forma de retirar a zona pelúcida foi utilizando-se a pronase, que foi aquecida a 37° C por 30 minutos. Após este tempo foi feita uma placa com três gotas de 20 µl de Pronase e seis gotas de 20µl de meio de cultivo (mTeSR™1 – StemCell Technologies – Canadá) para lavar os embriões, sob óleo. Os embriões foram colocados na Pronase utilizando-se uma pipeta Pasteur estirada por no máximo um minuto, sempre os observando sob estereomicroscópio (Nikon – Japão). Após este tempo os blastocistos foram lavados em meio de cultivo para retirar o excesso de enzima (LEE et al., 2004; FAN et al., 2010; STRÖM et al., 2010)

O Matrigel (Becton Dickinson – EUA) foi utilizado como matriz extracelular para o cultivo da MCI. Uma alíquota de Matrigel, conforme orientação do fabricante, foi diluída em 25 mL de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – StemCell Technologies – Canadá) gelado, alíquotadas (0,5 mL) em placas quatro poços (NUNC – Thermo Scientific – EUA) e deixadas a temperatura ambiente. Uma hora depois o excesso de Matrigel foi retirado, vertendo-se a placa. Foi colocado o meio de cultivo de células-tronco (mTeSR™1) na placa e depois de uma hora a placa já estava estável e pronta para ser utilizada. (XU et al., 2001; HEINS et al., 2004; HOFFMAN & CARPENTER, 2005; CHEN et al., 2006; STRÖM et al., 2010)(FIG. 6).

O meio de cultivo utilizado foi o mTeSR™1, meio comercial pronto para uso. O mTeSR™1 é um meio enriquecido com fatores de crescimento e substâncias que impedem a diferenciação como: FGF, TGFβ, GABA, ácido pipecólico e cloreto de lítio (LUDWING et al., 2006; STRÖM et al., 2010).

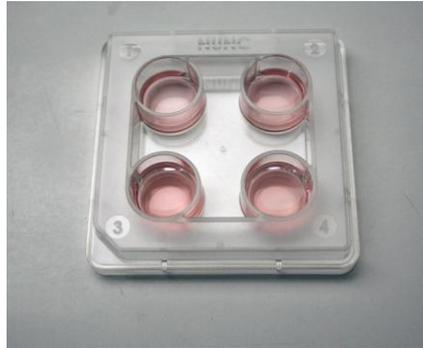


FIGURA 6- Placa de cultivo da massa celular interna. Placa de cultivo revestida com Matrigel e coberta com mTeSR.

3.5 ISOLAMENTO DA MASSA CELULAR INTERNA

Inicialmente o blastocisto foi classificado quanto ao tamanho e distinção da massa celular interna (MCI). A técnica de isolamento das células foi decidida de acordo com a qualidade da MCI. Quando as células encontravam-se grandes e distintas qualquer um dos quatro métodos, laser, isolamento mecânico, imunocirurgia ou plaqueamento total, poderia ser utilizado. Portanto, para cada embrião disponível uma das técnicas foi realizada. Quando as células encontravam-se pequenas e pouco distintas ou indistintas, o plaqueamento total do blastocisto foi a primeira escolha. (THONSON et al., 1998; LEE et al., 2004; TANAKA et al., 2006; KIM et al., 2006, STRÖM et al., 2007; TURETSKY et al., 2008; STRÖM et al., 2010; STEPHENSON & BRAUDE, 2010).

3.5.1 *Plaqueamento total*

No plaqueamento total foi retirada somente a zona pelúcida sem que houvesse manipulação das células do trofotoderma e MCI. A zona pelúcida foi retirada utilizando-se Pronase ou laser e o blastocisto foi colocado intacto nas placas de cultivo com Matrigel e mTeSRTM1. (KIMet al., 2006; CHEN et al., 2009; Sidhu et al., 2010)(FIG. 7).

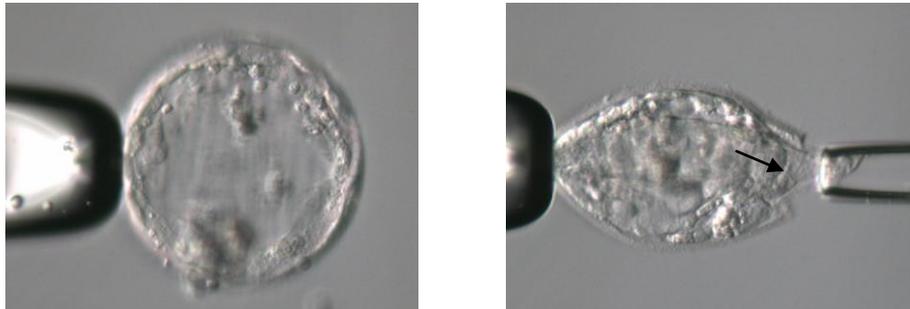


FIGURA 7- Blastocisto sem zona pelúcida. Blastocisto após retirada da zona pelúcida com enzima pronase 0.5%, pronto para o plaqueamento total, para cultivo das células-tronco embrionárias.

3.5.2 *Plaqueamento após laser*

Os embriões foram colocados em gotas de 5 μ l de PBS sem cálcio e sem magnésio sob óleo de parafina. Utilizando o microscópio invertido acoplado ao sistema de micromanipulação o blastocisto foi fixado por uma micropipeta (Humagen – EUA) pelo lado oposto à massa celular interna. Um orifício foi feito na zona pelúcida com 2- 3 tiros de 7 milisegundos, e a massa celular interna tornava-se acessível para outra micropipeta fixá-la e serem disparados 10-15 tiros de laser de 7 milisegundos para separá-la das células do trofotoderma. Após o procedimento a MCI era colocada em placas de cultivo previamente

preparada contendo Matrigel e mTeSR (KIM et al., 2006; TURETSKY et al., 2008) (FIG. 8).



A.

B.

FIGURA 8- Isolamento da massa celular utilizando-se o laser diodo. A. Blastocisto em uma gota de 5 μ l de PBS sem cálcio e sem magnésio sob óleo. **B.** Aspiração de parte do trofotoderma (seta) após disparo de 10- 15 tiros de laser de 7 milisegundos, nas junções celulares.

3.5.3 Plaqueamento após isolamento mecânico

Os blastocistos, foram colocados em gotas de 5 μ l de PBS sem cálcio e sem magnésio (Sigma – EUA) sob óleo de parafina . Primeiramente foi feito um orifício na zona pelúcida com cinco tiros de 10 milisegundos do laser diodo Octax. Utilizando o microscópio invertido acoplado ao sistema de micromanipulação o blastocisto foi fixado por uma micropipeta pelo lado da MCI e com auxílio de uma micropipeta (Humagen – EUA) células do trofotoderma foram retiradas. Após o procedimento a MCI era colocada em placas de cultivo previamente preparada contendo Matrigel e mTeSR(KIM et al, 2006; STRÖM et al, 2007). (FIG. 9).



A.

B.

C.

FIGURA 9- Isolamento mecânico da massa celular interna. A- Blastocisto com orifício na zona pelúcida. B- Remoção de células do trofotoderma. C- Blastocisto em colapso, em placa de Matrigel.

3.5.4 Plaqueamento após Imunocirurgia

Para o procedimento, os blastocistos, sem a zona pelúcida, foram expostos ao anticorpo contra todos os anticorpos humanos (Sigma – EUA) diluído 1:4, por 30 minutos em estufa úmida a 37° C e 7% CO₂. Após este tempo os embriões foram lavados sucessivamente em três gotas de mTeSR. Os blastocistos foram então colocados em gotas contendo complemento de cobaia (Sigma – EUA) diluídos 1:10, durante 10 minutos a 37° C. Os blastocistos então foram observados em estereomicroscópio e se as células do trofotoderma ainda estivessem intactas mais 5 minutos de exposição seria realizado. Após o procedimento o MCI era colocada em placas de cultivo previamente preparada contendo Matrigel e mTeSR . (SOLTER & KNOWLES, 1975; THONSOM et al., 1998; CHEN et al., 2005; KIM et al, 2006; STRÖM et al., 2010)(FIG. 10).



FIGURA 10-Isolamento da massa celular interna por imunocirurgia. Blastocisto após 10 minutos de exposição ao complemento de cobra, com lise do trofoblasto (seta).

3.6 CULTIVO DA MASSA CELULAR INTERNA

A massa celular interna foi colocada em placas de cultivo de quatro poços previamente preparadas com Matrigel e cobertas com meio comercial para células-tronco mTeSR™1, em estufas úmidas a 37° C e 5% CO₂. Após a adesão inicial por 48 horas, o meio foi trocado diariamente e as células foram documentadas (LUDWING et al, 2006; PEURA et al, 2007; STRÖM et al, 2010).

3.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

Para testar os anticorpos que serão utilizados na imunohistoquímica que será realizada após a linhagem de células-tronco embrionárias estar estabelecida, quatro blastocistos foram expostos à paraformaldeído 4%, em uma lâmina própria para o procedimento (EasyPatch – EUA), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo as lâminas foram lavadas com PBS gelado, durante 10 minutos. Para permeabilização dos anticorpos intracelulares, foi utilizada uma solução de 0.1% de Triton X- 100 (Sigma -

EUA) em PBS, durante 15 minutos em temperatura ambiente. Depois foi colocada solução de bloqueio, 5% de soro de cabra, durante 30 minutos. Após este tempo foram colocados os anticorpos primários monoclonais produzidos em camundongo, *Caudaltype homebox transcription factor 2* (CDX2), na diluição 1:100 (Abcam 15258 – EUA); anticorpos policlonais produzidos em coelho, *octamer-binding transcription factor 4* (OCT-4), na diluição 1:150 (Abcam 18976– EUA), anticorpos monoclonais produzido em camundongo, *Stage-specific embryonic antigen-4* (SSEA-4), na diluição 1:100 (Abcam 16287– EUA) durante 2 horas em temperatura ambiente. As lâminas então foram lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo e anti-coelho, produzidos em cabra, conjugados com Alexa 488 – verde (Invitrogen – EUA) e Alexa 555 – vermelho (Invitrogen – EUA), respectivamente, por 30 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em PBS por 5 minutos e então foi adicionado o DAPI (Sigma – EUA). As células utilizadas como controle foram tratadas apenas com os anticorpos primários. A lamínula foi colocada e as lâminas foram observadas em microscópio confocal Zeiss (Axiovert 200M – Alemanha), no aumento de 40 vezes. As lâminas foram fotografadas (THOMSON et al., 1998; ADJAYE et al., 2005; NIWA et al., 2005; GENBACEV et al., 2005; CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2009; SIDHU et al., 2010).

3.8 ENSAIO DA FOSFATASE ALCALINA

O ensaio de detecção de fosfatase alcalina celular utilizado no presente trabalho foi o de NBT/BCIP (Zymed), o qual se baseia na reação cromatogênica iniciada pela fosfatase alcalina presente nas células, que cliva o grupo fosfato do substrato BCIP (Bromo-cloro-indol fosfato). A reação produz um próton, que associado ao NBT (nitro blue tetrazol), gera um precipitado insolúvel púrpura.

O teste foi realizado após o isolamento, adesão e cultivo das células da MCI por 26 dias, para verificação da pluripotência. O meio de cultivo foi retirado

e substituído por 210 µL de solução de NBT/BCIP, preparada de acordo com as instruções do fabricante. Após 2 horas de incubação, a formação de precipitado púrpura foi documentada por foto (THOMSON et al., 1998; KLIMANSKAYA et al., 2005; GENBACEV et al., 2005; ELLERSTRÖM et al., 2006; NARWANI et al., 2010; SIDHU et al., 2010).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram analisadas utilizando-se o teste exato de Fisher com o programa Epi Info 7. Considerou-se relevância estatística $P < 0.05$.

4 RESULTADOS

No período novembro de 2009 a março de 2011 foram realizados 661 ciclos de Reprodução Assistida com posterior transferência. A idade das pacientes variou de 22 a 61 anos e a média foi de 36,75 anos. Foram injetados 6445 oócitos MII sendo que, 5025 oócitos fertilizaram normalmente (78%) e 146 (2,3%) foram fertilizados anormalmente. Foram transferidos 2029 embriões e 247 pacientes engravidaram (37,4%).

Foram utilizados na pesquisa 27 embriões doados por 19 casais. Três pacientes doaram 4 embriões alterados após PGD, os demais 23 embriões doados, possuíam fertilização anormal.

A média de idade das pacientes que doaram os embriões foi de 32,2 anos, variando de 21 a 39 anos. As causas de infertilidade foram: 3 (15,8%) falhas de inseminação, 3 (15,8%) idade; 4 (21%) causas múltiplas, 7 (36,8%) masculina; 1 (5,3%) ovariana; 1 (5,3%) PGD(FIG. 11).

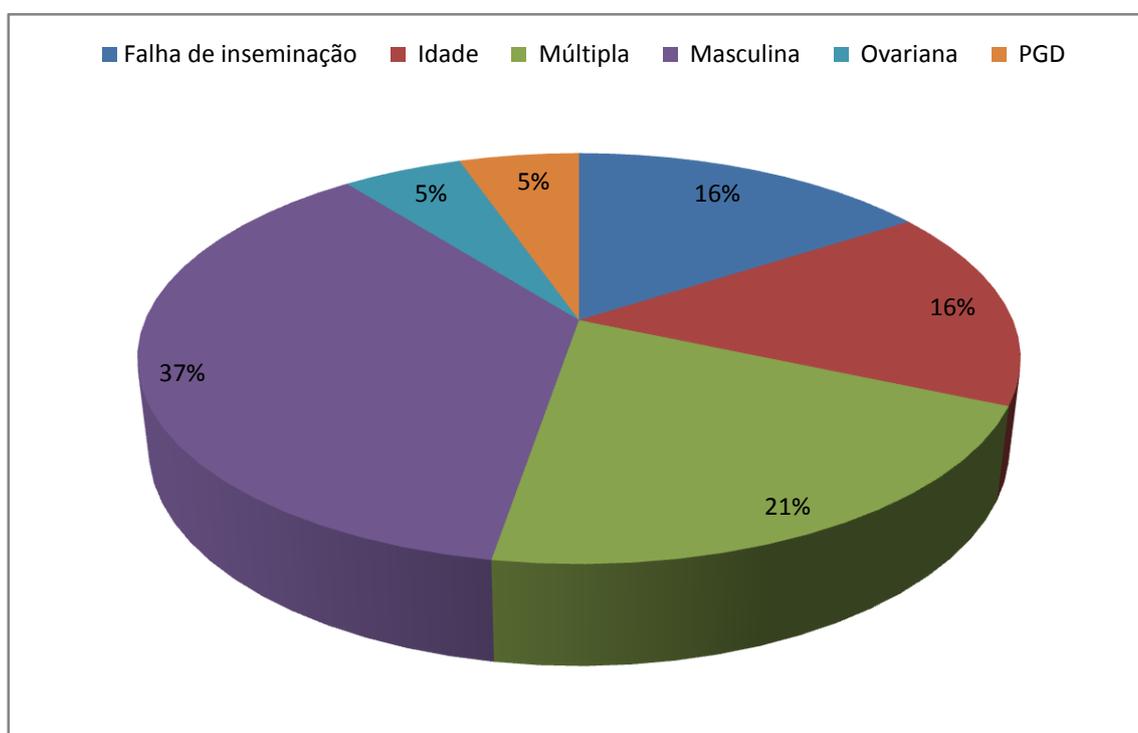


FIGURA 11- Causas de infertilidade das pacientes que doaram embriões para pesquisa de células-tronco embrionárias.

Dentre os embriões que apresentaram alterações após PGD, dois possuíam monossomia do cromossomo X e dois trissomia do cromossomo 21. Apenas um embrião desses era de boa qualidade morfológica. Das quatro MCI isoladas três (75%) aderiram. Uma MCI foi isolada através do uso do laser e três foram plaqueadas total. As três plaqueadas total aderiram às placas e a média de dias de cultivo foi de 7.5.

As células da MCI foram isoladas em dias diferentes do estágio de blastocisto. Dentre as células isoladas 18 (67%) foram obtidas de blastocistos no dia 5 de desenvolvimento, 9 (33%) foram isoladas no dia 7 do blastocisto. Não houve diferença estatística entre os dias em que as células foram isoladas do blastocisto e adesão (TAB. I).

Tabela I- Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com dia de desenvolvimento do blastocisto.

| Dia de plaqueamento do blastocisto | Aderidos (%) | Não aderidos |
|------------------------------------|--------------|--------------|
| 05 | 12 (66,7) | 06 (33,3) |
| 07 | 07 (77,8) | 02 (22,2) |
| P= 0.67 | | |

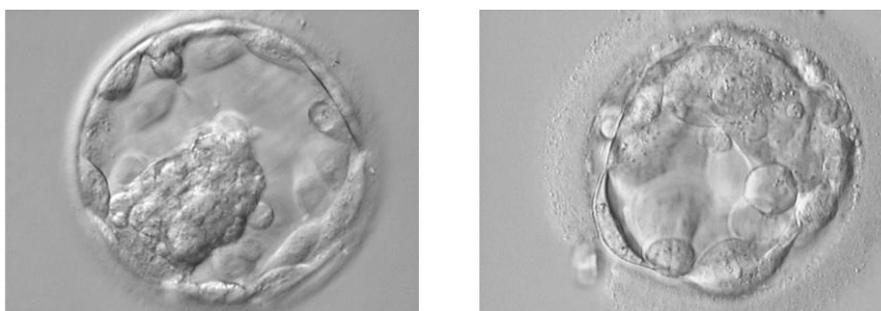
Vinte e quatro (89%) embriões tiveram a zona retirada com enzima Pronase e 3 (11%) com laser. Não houve diferença estatística quando comparamos as duas formas de retirada de zona pelúcida e adesão (TAB. II).

Tabela II- Adesão celular 48 horas após plaqueamento, de acordo com o método de retirada de zona pelúcida.

| Método de retirada da zona pelúcida | Adesão (%) | Não aderidos (%) |
|-------------------------------------|------------|------------------|
| Laser | 01 (33,3) | 02 (66,7) |
| Pronase | 18 (75) | 06 (25) |

P=0.20

Dezesseis blastocistos eram de boa qualidade com blastocele expandida, com MCI distinta e compacta. Onze eram de baixa qualidade com blastocele pequena e MCI indistinta. Células isoladas de embriões de boa qualidade aderiram significativamente mais às placas quando comparadas à células isoladas de embriões de má qualidade (FIG. 12 e TAB. III).



A.

B.

Figura 12- Blastocistos.A- Blastocisto de boa qualidade, células do trofotoderma distintas, massa celular interna definida e compacta. **B-** Blastocisto de má qualidade, sem massa celular interna definida. Aumento 200X.

Tabela III- Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com a qualidade embrionária.

| Qualidade do embrião | Adesão (%) | Não aderidos (%) |
|----------------------|------------|------------------|
| Boa | 14 (87,5) | 02 (12,5) |
| Ruim | 04 (63,6) | 07 (36,4) |

P=0.011

Um embrião (3,7%) foi isolado mecanicamente; 3 (11,1%) isolados com imunocirurgia; 2 (7,4%) isolados com laser e 21 (77,8%) plaqueados total. Não foi possível a realização de teste estatístico devido ao número reduzido em cada grupo. (FIG. 13 e TAB. IV).

A adesão às placas de cultivo foi confirmada 48 horas após o plaqueamento. Dezenove (70%) MCI isoladas aderiram às placas de Matrigel. A média de dias de cultivo foi de 6.25, sendo o mínimo 3 e o máximo 32 dias (FIG. 14).

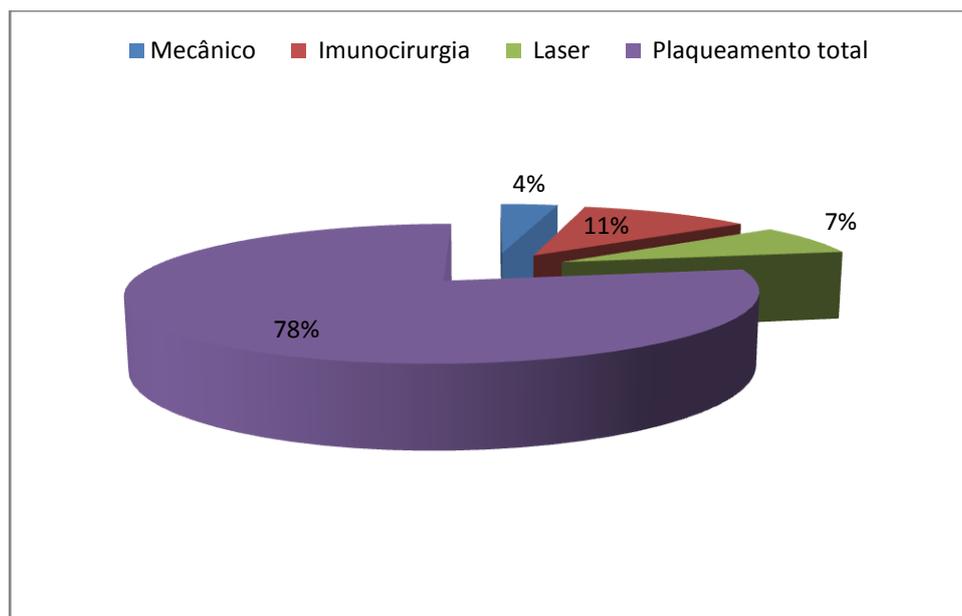


FIGURA 13- Métodos de isolamento da massa celular interna dos blastocistos

Tabela IV – Adesão celular 48 horas após plaqueamento, de acordo com método de isolamento da massa celular interna e média de dias de cultivo.

| Método de Isolamento | Adesão (%) | Não aderidos | Média de dias de cultivo |
|----------------------|------------|--------------|--------------------------|
| Mecânico | 01 (100) | 0 (0) | 09 |
| Imunocirurgia | 01 (33,3) | 02 (66,7) | 09 |
| Laser | 0 (0) | 02 (100) | 0 |
| Plaq. Total | 17 (81) | 04 (19) | 9,2 |

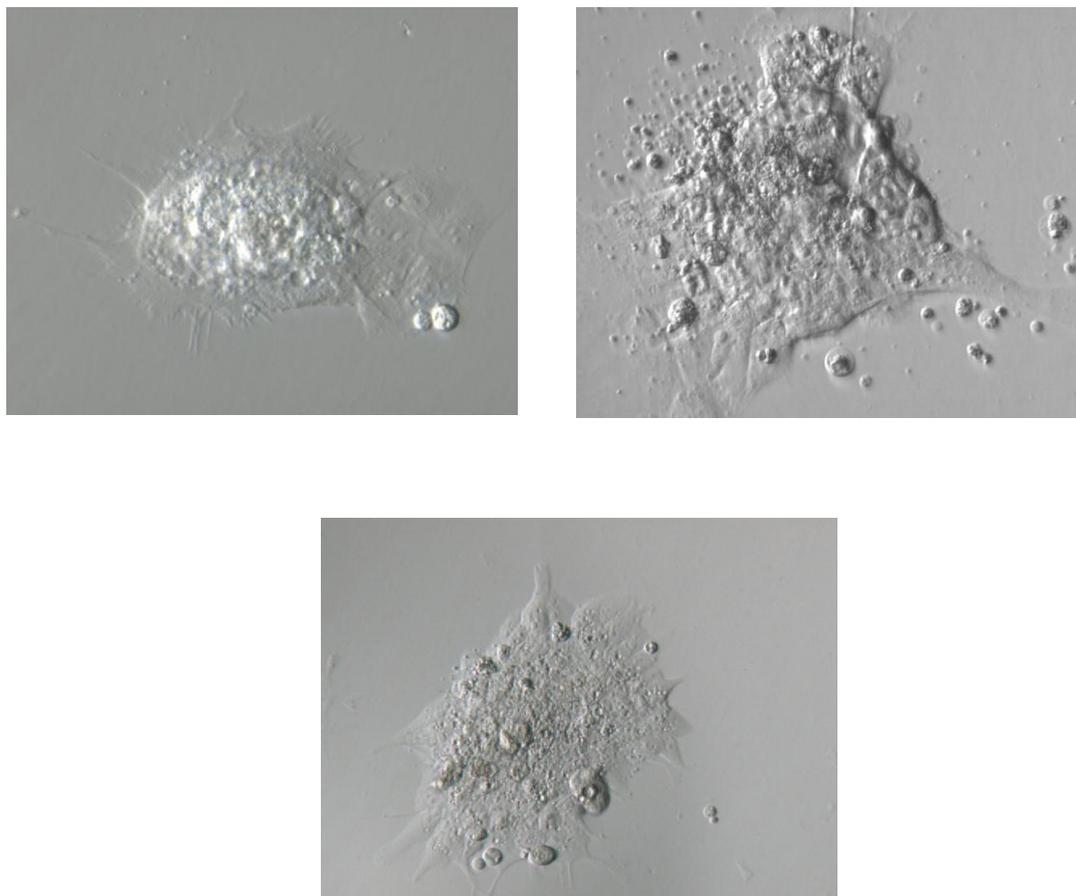


FIGURA 14- Adesão celular à placa de cultivo. Quarenta e oito horas após o isolamento, a adesão a placa de cultivo foi verificada, o que é essencial para manutenção da pluripotência. Aumento 200X.

Levando-se em conta a técnica de isolamento e qualidade embrionária analisamos a adesão celular às placas de cultivo (TAB. V). Não foi possível realização de teste estatístico devido ao número reduzido em cada grupo.

Tabela V- Adesão celular 48 horas após plaqueamento de acordo com a qualidade do embrião e a técnica de isolamento utilizada.

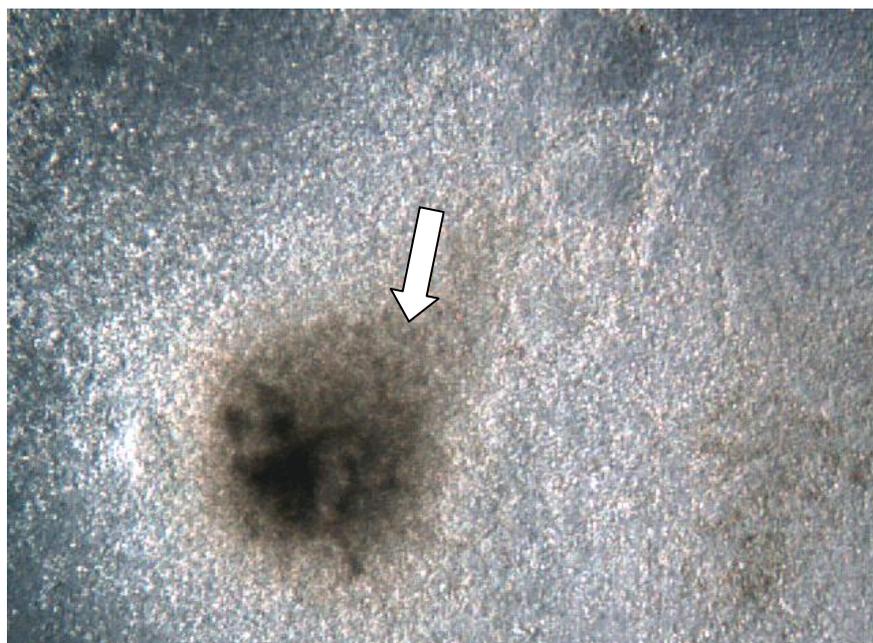
| Técnica de Isolamento | Qualidade boa aderido | Qualidade ruim aderido | Qualidade boa não aderido | Qualidade ruim não aderido |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Mecânico | 01 | 0 | 0 | 0 |
| Imunocirurgia | 01 | 0 | 0 | 02 |
| Laser | 0 | 0 | 0 | 02 |
| Plaq. Total | 14 | 3 | 01 | 07 |

Uma MCI foi colocada em uma nova placa de cultivo após 15 dias, mas não aderiu. Outra MCI que cresceu bem em cultivo foi repicada após 26 dias em três novos poços (FIG. 15). Dois dias após o repique, em um dos poços, foi feito o teste de fosfatase alcalina, que se mostrou positivo (FIG. 16, FIG. 17, FIG. 18). Os demais poços ficaram em cultivo até o 32º dia.

Para padronização da imunohistoquímica foi feito o teste em blastocistos fixados com os anticorpos CDX2, OCT4 e SSEA-4. A marcação dos núcleos foi feita com DAPI e apenas o anticorpo SSEA-4 mostrou-se positivo (FIG. 19).

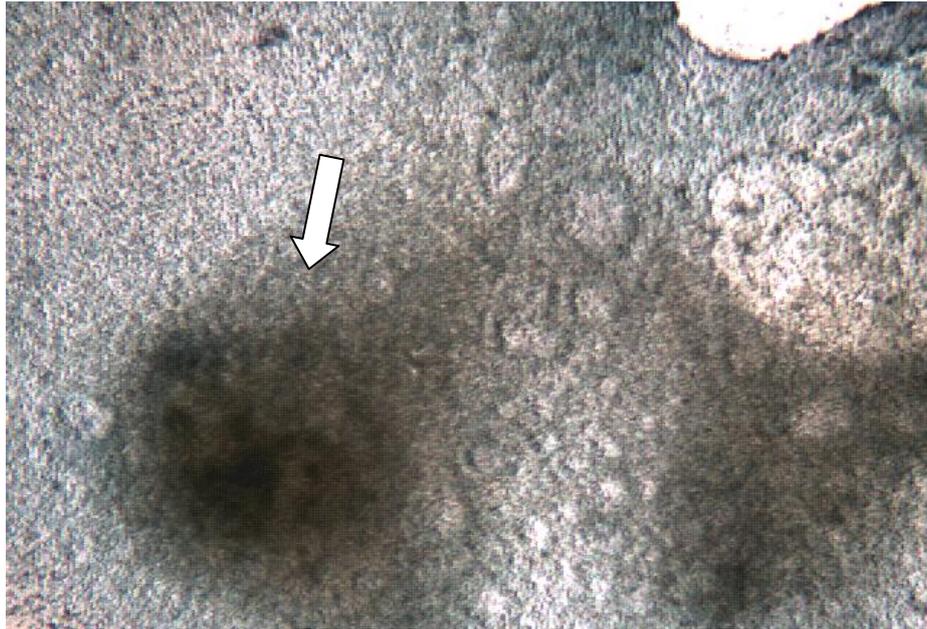


A.

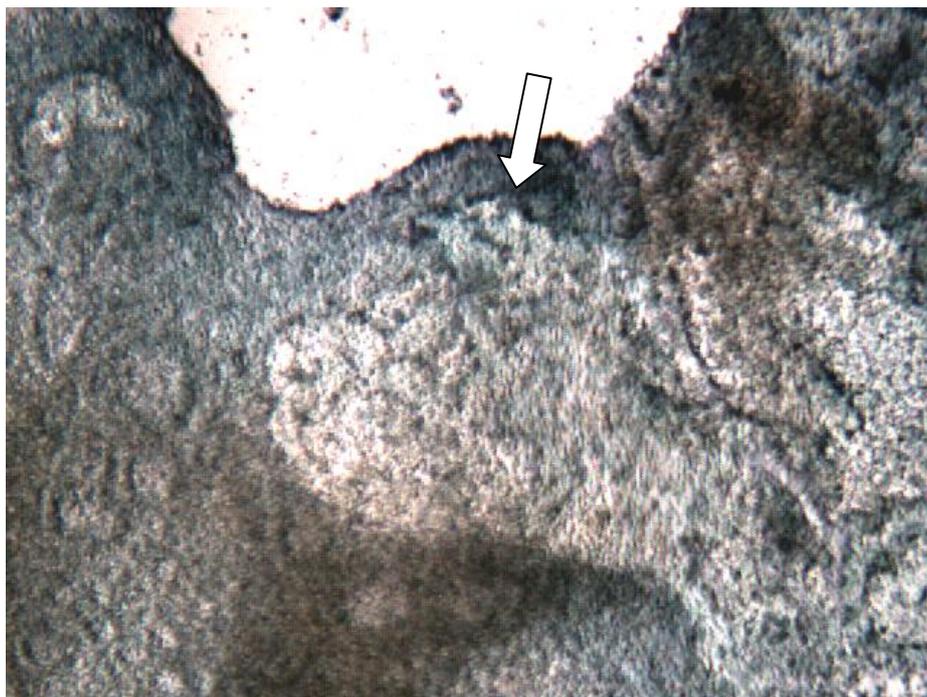


B.

Figura 15-Células da massa celular interna com 26 dias de cultivo. A. Células da massa celular interna após plaqueamento total, em cultivo há 26 dias. Aumento 40X. **B.** Células da massa celular interna com pontos de células diferenciadas (seta). Aumento 40X.

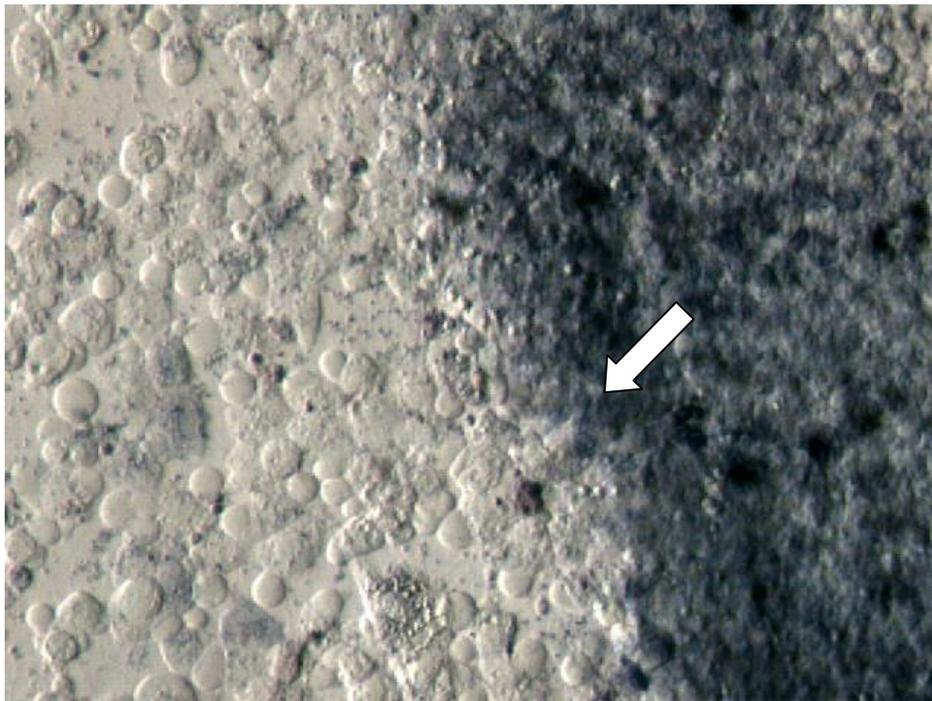


A.

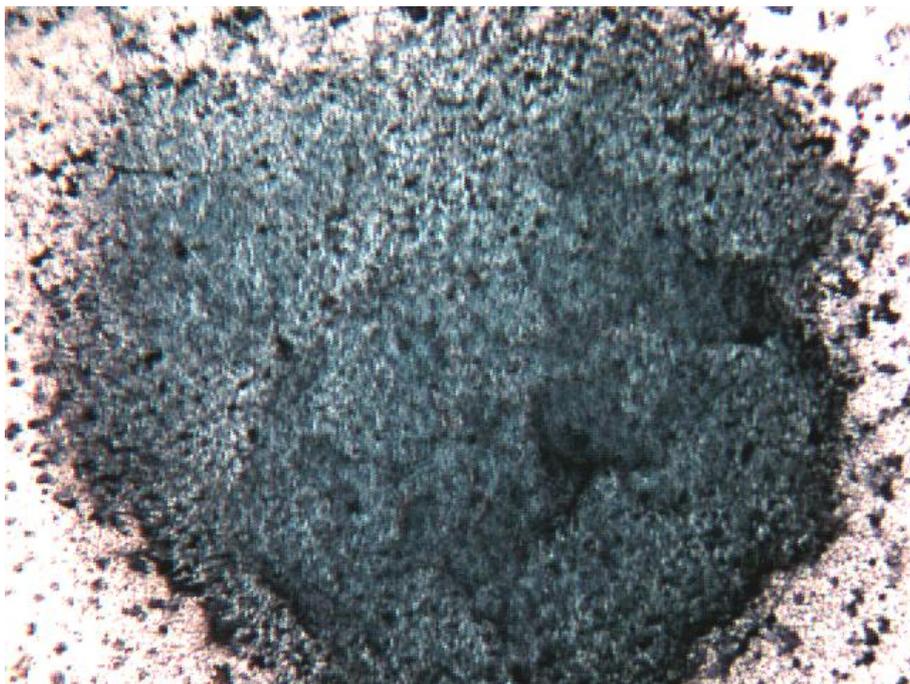


B.

FIGURA 16-Teste da fosfatase alcalina. A. Células indiferenciadas coradas pela fosfatase alcalina. Células diferenciadas não coradas pela fosfatase alcalina (seta). Aumento 40X. **B.** Limite da marcação com fosfatase alcalina mais escura, com área não corada mais clara (seta). Aumento 40X.



A.

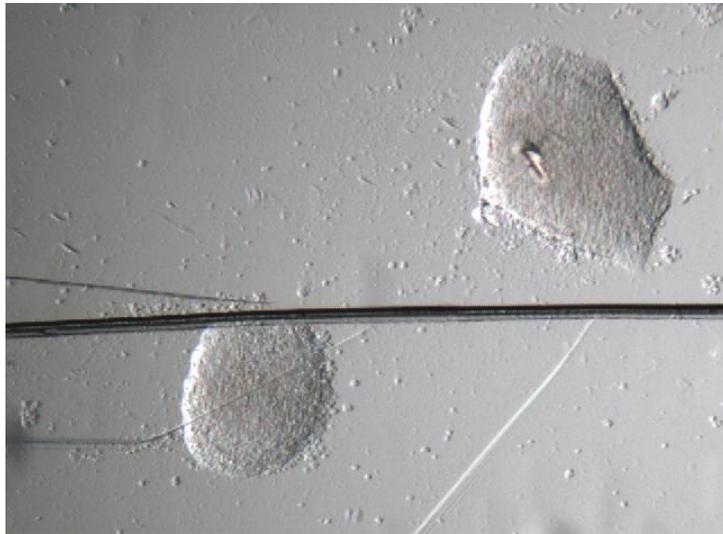


B.

FIGURA 17- Teste da fosfatase alcalina2. A. Limite da marcação com fosfatase alcalina mais escura, com área não corada mais clara (seta). Aumento 200X. .B. Aumento de 100X de um ponto fortemente positivo para fosfatase alcalina.



A.

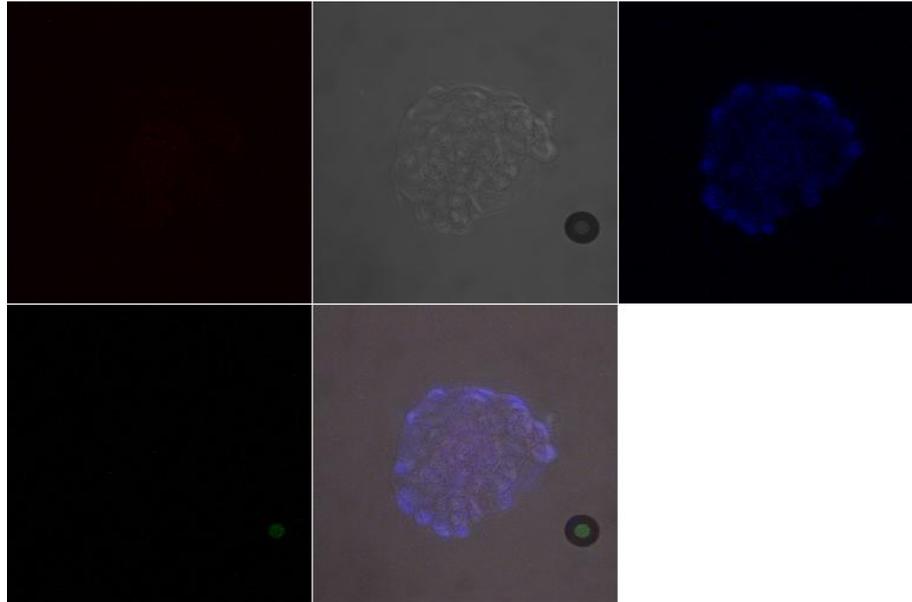


B.

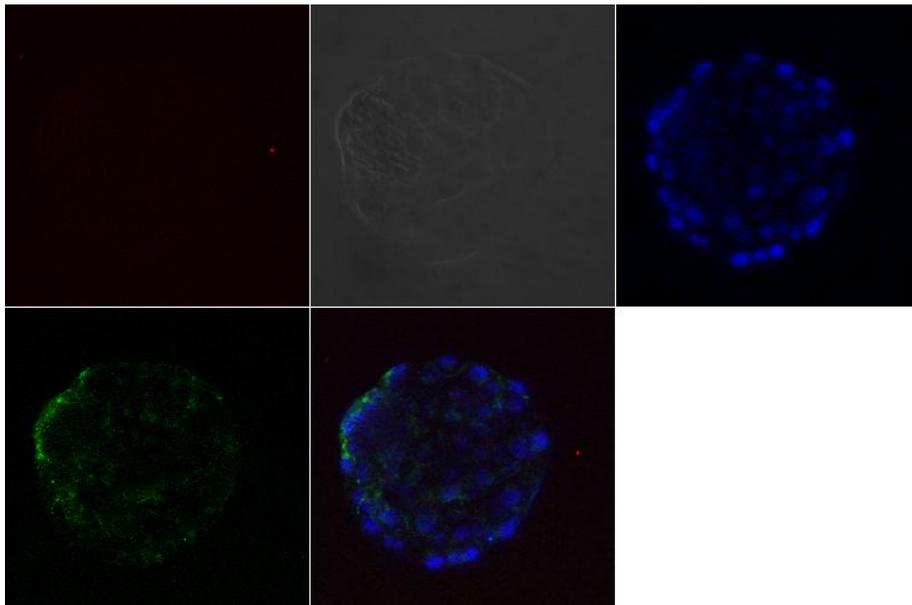


C.

FIGURA18- Células isoladas da massa celular interna em cultivo antes e depois do repique.**A.** Células em cultivo há 26 dias antes do repique. Aumento 40X .**B.** Células 48 horas após repique. Aumento de 40 X. **C.** Células após o repique. Aumento 100X.



A.



B.

FIGURA 19- Imunohistoquímica. A. Controle negativo da imunohistoquímica sem adição do anticorpo secundário. Núcleos corados com DAPI, em azul. **B.** Teste positivo de imunohistoquímica para anticorpo SSEA-4, em verde. Núcleos corados com DAPI, em azul.

5 DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo analisar as diferentes alternativas de isolamento da massa celular interna de blastocistos. Foram realizadas quatro técnicas: isolamento mecânico, com laser, imunocirurgia e plaqueamento total do blastocisto, sendo esta última a mais eficiente para adesão da MCI às placas de cultivo.

Vinte e sete embriões foram doados para o estudo de células-tronco embrionárias por 19 casais. O número de embriões utilizados varia bastante na literatura. Já foi relatada a obtenção de novas linhagens de CTEh utilizando-se de 3 blastocistos (LI et al., 2010), 140 (CHEN et al., 2009), 236 (STRÖM et al., 2010) até 352 embriões (MATEIZEL et al., 2010). Vários motivos podem influenciar a decisão de doação dos embriões para pesquisa como: o contexto político, ético, cultural, social, religioso do país; grau de esclarecimento sobre as pesquisas com CTEh; modo e o momento que a doação dos embriões é requerida, a idade do casal; sucesso no tratamento de FIV; período que os embriões estavam congelados (BANGSBOLL et al., 2004; CHOUDHARY et al., 2004; CORTES et al., 2007; HUG, 2008; LUNA et al., 2009).

A idade média das pacientes que doaram os embriões foi de 32,2 anos. Esse achado é semelhante ao observado por Bangsboll et al. (2004) que observaram que a idade menor que 35 anos da mulher representa um fator favorável para doação de embriões para pesquisas com células-tronco embrionárias. Krones et al. (2006) também demonstraram que mulheres com idade maior igual a 38 anos são menos suscetíveis a doarem os embriões para estudos com células-tronco embrionárias. Hammarberg & Tinney (2006),

entretanto, relataram que a idade materna e paterna não influencia na doação de embriões para as pesquisas.

Os embriões doados para o estudo eram fertilizados anormalmente (85,2%) ou alterados após PGD (14,8%). Suss-Toby et al. (2004) demonstraram que embriões anormalmente fertilizados podem ser utilizados para dar origem a linhagens de CTEh. Vários estudos já confirmaram que é possível obter linhagens de CTEh de embriões alterados após PGD. Embriões de má qualidade, fragmentados, com fertilização anormal, com aberrações cromossômicas, podem ter taxas de formação de blastocisto reduzidas (PICKERING et al., 2005; VERLINSKY et al., 2005; MATEIZEL et al., 2006; PEURA et al., 2007; TURETSKY et al., 2008; TROPEL et al., 2010; NARWANI et al., 2010).

A quantidade de embriões utilizados para cada técnica foi limitada devido à raridade do material envolvido. Do total de oócitos maduros somente 0,4% embriões com fertilização anormal foram doados para a pesquisa. Apenas 2,3% dos zigotos foram fertilizados anormalmente e desses, 15,8% foram doados para os estudos de CTEh.

No ano de 2009 foram realizados 22 ciclos de FIV com PGD na clínica Origen. Foram analisados 98 embriões sendo 69 normais (70%). No ano de 2010 foram 20 casos de PGD, sendo analisados 59 embriões e 35 (59%) eram normais. No ano de 2011, até março, foram 3 casos de FIV com PGD. Foram analisados 10 embriões, sendo 8 normais (80%). Desses 55 embriões anormais após PGD, quatro embriões (7,2%) foram utilizados na pesquisa, e desses quatro, três (75%) aderiram às placas de cultivo. Diversos trabalhos já

confirmaram a importância desses embriões para as pesquisas. As linhagens obtidas de embriões alterados servem para desenvolver modelos para estudos das doenças, teste de fármacos e de toxicidade (PICKERING et al., 2005; VERLINSKY et al., 2005; MATEIZEL et al., 2006; PEURA et al., 2007; TURETSKY et al., 2008; TROPEL et al., 2010; NARWANI et al., 2010). Linhagens normais já foram obtidas após PGD, isto pode estar associado às altas taxas de mosaicismos presentes no embrião, condições de cultivo e derivação que selecionaram células euplóides normais (PEURA et al., 2007; NARWANI et al., 2010).

Outras fontes de embriões para pesquisa, que podem aumentar consideravelmente o número para desenvolvimento de novos estudos, são embriões fragmentados, de baixa qualidade, com clivagem atrasada ou congelados. Vários grupos já demonstraram a eficiência em obter linhagens desses embriões de má qualidade (MITALIPOVA et al., 2003; CHEN et al., 2005; LEROU et al., 2008; LIU et al., 2009; INAMDAR et al., 2009) ou congelados (PARK et al., 2004; SIMÓN et al., 2005; KIM et al., 2006; SIDHU et al., 2010; STEPHENSON & BRAUDE, 2010; STRÖM et al., 2010).

Não houve diferença quando avaliamos os dias de cultivo em que o blastocisto foi plaqueado, dia 5 ou 7, e a taxa de sucesso de adesão (66,7% x 77,8; $P=0,67$). Skottman (2010) em seu estudo também não observou diferença entre o plaqueamento nos dias 5 e 6 do blastocisto. Porém, Chen et al. (2009) verificaram que quando os blastocistos eram plaqueados no dia 6, havia um sucesso dez vezes maior na derivação de novas linhagens de células-tronco, quando comparado com plaqueamento no dia 5. Eles acreditam que

esse maior sucesso de derivação no dia 6 seja devido a mudanças morfológicas e na expressão de OCT4 e CDX2. Skottman (2010) por sua vez, obteve 3 linhagens de CTEh de embriões de qualidade e dias diferentes. Uma linhagem veio de um blastocisto dia 6 com boa morfologia, um veio de um blastocisto dia 7 com boa morfologia e um veio de blastocisto dia 6 com morfologia ruim.

A retirada da zona pelúcida foi feita de duas maneiras: laser e pronase. Em nosso estudo não houve diferença entre as técnicas de retirada da zona e a adesão às placas (33,3% x 75%, $P=0,20$). A pronase é uma enzima derivada de bovinos, por isso seu uso deve ser evitado para obtenção de linhagens de células-tronco embrionárias que visam uma posterior utilização em terapias celulares. Como opção pode-se utilizar o ácido Tyrodes ou laser para a retirada da zona pelúcida. O cultivo também pode ser estendido para que o blastocisto apresente a eclosão *in vitro* sem a necessidade de utilizar enzimas ou laser. (GENBACEV et al., 2005; SIMÓN et al., 2005; ELLERSTRÖM et al., 2006; TURETSKY et al., 2008; SIDHU et al., 2010; CAMARASA et al., 2010; PEURA et al., 2010). A retirada da zona pelúcida, de maneira eficiente e menos prejudicial para as células, é essencial para a adesão às placas de cultivo e estabelecimento de novas linhagens de CTEh. Utilizamos o laser por acreditar que seja uma opção menos agressiva às células da MCI.

A qualidade embrionária é outro fator importante a ser levado em consideração para o isolamento da massa celular interna. Blastocistos de boa qualidade, com trofotoderma distinto e massa celular interna coesa, proporcionaram uma melhor taxa de adesão, quando comparados

comembriões de má qualidade (87,5% x 63,6%, $P= 0,011$). Vários autores também observaram esta relação de qualidade embrionária e sucesso na derivação de células-tronco embrionárias (PERA et al., 2000; MITALIPOVA et al., 2003; KIM et al., 2006; CHENG et al., 2008; STEPHENSON& BRAUDE, 2010; O'LEARY et al., 2011).

Cheng et al. (2008) observaram que, em embriões com a blastocela ocupando mais da metade do volume do blastocisto, havia mais chance de se obter linhagens de CTEh. Eles obtiveram de 14 blastocistos de boa qualidade, 5 (35,7%) novas linhagens, enquanto que as células de blastocistos de má qualidade paravam de crescer na segunda ou terceira passagem. Stephenson & Braude (2010) ao utilizarem embriões de boa qualidade obtiveram uma taxa de derivação de novas linhagens de CTEh de 25%, e quando utilizaram embriões de má qualidade obtiveram uma taxa de sucesso de 4% apenas. O'Leary et al. (2011) também comprovaram a importância da qualidade embrionária para sucesso na derivação de células-tronco pluripotentes. Eles verificaram que quando se tem uma MCI com mais células as chances de sucesso em obter-se uma linhagem de CTEh são maiores. Porém, Ström et al. (2010) realizaram um estudo em que não observaram relação entre qualidade embrionária e estabelecimento de novas linhagens de células-tronco. Isso pode ser explicado pela experiência dos autores e não só a qualidade dos embriões e técnicas de derivação (PERA et al., 2000; MITALIPOVA et al., 2003).

Uma alternativa para embriões de má qualidade seria o cultivo prolongado, isto é, 1 ou 2 dias a mais de cultivo, poderia promover um crescimento da MCI e permitir derivação de novas linhagens de CTEh (CHEN

et al., 2009; LIU et al., 2009). Tentando melhorar a qualidade embrionária para obtenção de novas linhagens de CTEh, Fan et al. (2010) desenvolveram um meio contendo LIF e FGF para o cultivo dos embriões de má qualidade. Eles obtiveram, de fato, uma melhora de duas vezes na taxa de formação e de qualidade dos blastocistos, uma melhora de 7 vezes na eficiência da derivação.

O meio de cultivo que proporcionou o primeiro isolamento e posterior sucesso no cultivo de CTEh, foi Eagle's MEM suplementado com soro fetal bovino, β mercaptoetanol, antibióticos e aminoácidos não essenciais (THOMSON et al., 1998). Desde então, vários fatores de crescimento já foram adicionados ao meio de cultivo para tentar aprimorar o isolamento, crescimento e derivação de CTEh: Noggin, bFGF, ácido hialurônico, TGF- β , LIF, bFGF mais GSK3 (SATO et al., 2004), ativina A, ativina A mais bFGF, TGF- β mais IGF-II (HEINS et al., 2004; AMIT et al., 2004; BEATTIE et al., 2005; XIAO et al., 2006; MONTES et al., 2009; BAXTER et al., 2009). No entanto, a utilização do meio comercial tem sido difundida, já que apresenta maior controle de qualidade e menor variação lote a lote (HEINS et al., 2004; LI et al., 2005; GENBACEV et al., 2005, LUDWING et al., 2006). Por esses motivos foi escolhido, para a realização desse estudo, o mTeSR, meio comercial já utilizado com sucesso em vários estudos (LUDWING et al., 2006; LI et al., 2009; STRÖM et al., 2010; HANNOUN et al., 2010; DERDA et al., 2010). O mTeSR é um meio que contém somente componentes recombinantes ou purificados humanos como o FGF, TGF β , ácido aminobutírico (GABA), ácido pipercolico, cloreto de lítio, além de anti-oxidantes, vitaminas, lipídeos e minerais (LUDWING et al., 2006; CHASE & FIRPO, 2007).

O Matrigel é uma matriz extracelular originada de sarcoma de camundongo que contém um conjunto de fatores de crescimento, cuja eficiência já foi demonstrada em vários trabalhos (DRAPER et al., 2004; SATO et al., 2004; XU et al., 2005; PEBAY et al., 2005; YAO et al., 2006; FU et al., 2011). O Matrigel foi a matriz escolhida no presente estudo, pois a utilização do mTeSR está associada a sua utilização para adesão e manutenção da pluripotência de CTEh. Idealmente o cultivo de CTEh deve ser feito em matrizes recombinantes. Vários trabalhos já demonstraram que é possível cultivar CTEh em matrizes recombinantes ou purificadas. Draper et al. (2004) compararam a eficiência de diversas matrizes extracelulares no cultivo de células-tronco embrionárias, sendo que a associação de fibronectina e laminina mostrou melhores resultados. Alguns autores utilizaram associações entre Matrigel e laminina (CARPENTER et al., 2004; LI et al., 2005), fibronectina (AMIT et al., 2004; NOAKSSON et al., 2005), colágeno IV, fibronectina, laminina e vitronectina (LUDWING et al., 2006), e obtiveram sucesso na manutenção da pluripotência das CTEh. Braam et al., (2008) verificaram que a vitronectina recombinante é a única que pode substituir inteiramente o uso do Matrigel.

Tentando otimizar a obtenção e o cultivo de CTEh, Aflatoonian et al. (2010) desenvolveram uma técnica de cultivo de células-tronco embrionárias baseada na do cultivo dos embriões em microgotas, utilizando como *feeders cells* fibroblastos embrionários de camundongo ou fibroblastos humanos de gônadas fetais. Utilizando este sistema os autores caracterizaram seis novas linhagens de células pluripotentes.

O presente estudo comparou as formas de isolamento da massa celular interna e posterior adesão à placa de cultivo. O plaqueamento após isolamento mecânico foi realizado em apenas um embrião, que aderiu à placa de cultivo. O plaqueamento após laser não obteve sucesso na adesão, mas foi realizado em apenas dois embriões. Já a imunocirurgia foi realizada em 3 embriões e a taxa de adesão foi de 33,3%. O plaqueamento total da MCI foi realizado em 17 embriões e a taxa de adesão foi de 81%. Não foi possível a comparação entre os métodos devido ao pequeno número em cada grupo. Inicialmente os grupos seriam divididos de maneira similar, porém devido à disponibilidade, qualidade dos blastocistos e da técnica do plaqueamento total ter mostrado uma alta eficiência e praticidade ela foi a primeira escolha. Os melhores resultados podem ter sido influenciados pela curva de aprendizado.

O isolamento mecânico pode ser realizado utilizando-se vários artefatos como agulhas de seringas, lâminas afiadas, pipetas Pateur afiladas e enzimas. Em uma tentativa de se utilizar enzimas já utilizadas em procedimentos de reprodução assistida, Ellerström et al. (2006) utilizaram o ácido Tyrodes tanto para retirar a zona pelúcida quanto para lisar as células do trofocitotoma. Ström et al. (2007) desenvolveram uma agulha de tungstênio com pontas afiadas de 0,125 mm de diâmetro para abertura da zona pelúcida e dissecação das células. Eles obtiveram mais linhagens do que quando utilizavam a imunocirurgia, 5 linhagens de 19 blastocistos com taxa de sucesso 26% contra 16 linhagens de 100 blastocistos com taxa de sucesso de 16%.

Peura et al. (2007) realizaram uma bissecção no blastocisto, utilizando uma lâmina ultra-afiada, criando dois fragmentos: um contendo trofocitotoma

polar e a MCI, outro contendo somente células do trofocodermia mural. O plaqueamento total também foi utilizado para comparação. Três blastocistos de boa qualidade foram plaqueados total e deram origem a uma linhagem de CTEh e 10 foram bisseccionados dando origem 4 linhagens de CTEh. Em nosso estudo quando os blastocistos de boa qualidade foram submetidos ao plaqueamento total, 14 aderiram e somente um de boa qualidade não aderiu, comprovando a eficácia da técnica. Quando os blastocistos eram de má qualidade Peura et al. (2007) bisseccionaram 3 e plaquearam 3, obtendo 4 linhagens de CTEh, sendo 2 de cada método. A taxa de adesão inicial observada por eles foi de 85% não variando entre os dois métodos e um total de 9 linhagens foram obtidas. No presente estudo quando os blastocistos não possuíam MCI coesa e distinta, o melhor método para adesão ao cultivo foi o plaqueamento total, no qual 3 aderiram ao cultivo e 7 não. Quando se utilizou para isolamento da MCI, desses embriões de qualidade ruim, a imunocirurgia e o laser, a taxa de sucesso foi baixa ou nula. Acreditamos que as células do trofocodermia podem levar a uma inibição ou mesmo competir pela adesão às placas de cultivo. Como demonstrado por Peura et al. (2007) a bissecção pode ser utilizada com sucesso para reduzir as células do trofocodermia.

Skottman (2010) também utilizou esta agulha especialmente desenvolvida para o isolamento da MCI e comprovou sua eficiência obtendo mais três linhagens de CTEh. Ainda em 2010, Brook et al. utilizaram pipetas especialmente feitas para o isolamento, porém feitas de vidro. Eles obtiveram e caracterizaram uma nova linhagem de CTEh. Camarasa et al. (2010) obtiveram

duas linhagens de CTEh utilizando o isolamento mecânico. Eles utilizaram pipetas Pasteur afiladas para seccionar parte do trofotoderma.

No presente estudo uma nova abordagem de isolamento mecânico foi realizada utilizando-se micropipetas conectadas ao micromanipulador e ao microscópio invertido. Apesar de ter sido utilizado apenas um blastocisto de boa qualidade para esta técnica ela mostrou-se eficaz, ao proporcionar a adesão à placa de cultivo. Meng et al. (2010) descreveram a técnica de isolamento mecânico utilizando-se agulhas hipodérmicas o que torna a técnica mais acessível pois não requer equipamentos de alto custo. Eles obtiveram duas novas linhagens de CTEh. Li et al. (2010) também utilizaram agulhas de seringas para seccionar o blastocisto. Eles dividiram os blastocistos em duas partes: uma contendo somente trofotoderma e uma contendo trofotoderma e MCI. Eles utilizaram dois blastocistos que aderiram as placas de cultivo e um deu origem a uma nova linhagem de CTEh.

O isolamento com laser possui duas desvantagens: equipamento de alto custo e é necessário habilidade para manipulação. No presente estudo não tivemos sucesso no isolamento da MCI utilizando o laser. Isso pode ser explicado pelo número limitado de embriões utilizado, pela dificuldade de manipulação e pela qualidade dos embriões envolvidos. Turetsky et al. (2008) foram os primeiros a realizar o isolamento da MCI, em blastocistos humanos, utilizando o laser. Eles isolaram de 9 blastocistos pós PGD, 8 MCI e obtiveram 3 linhagens de células-tronco. Mais uma linhagem foi obtida após o plaqueamento total. Durante a manipulação o embrião entrou em colapso e teve que ser colocado em cultivo, o que é um problema comum quando se

manipula blastocistos. Chen et al. (2009) também utilizaram o laser para isolamento da MCI. Eles obtiveram uma taxa de adesão de até 91% e uma taxa de derivação de novas linhagens de 32%. No presente estudo apenas dois embriões foram isolados utilizando-se o laser e a qualidade dos mesmos não era boa.

A imunocirurgia foi a técnica utilizada para derivar as primeiras linhagens de células-tronco embrionárias e desde então vem sendo utilizada com sucesso (THOMSON et al., 1998; REUBINOFF et al., 2000; LANZENDORF et al., 2001; AMIT&ITSKOVITZ-ELDOR 2002; MITALIPOVA et al., 2003; PARK et al., 2004; COWAN et al., 2004; STOJKOVIC et al., 2004; CHEN et al., 2005; STEPHENSON&BRAUDE, 2010; AFLATOONIAN et al., 2010; NARWANI et al., 2010). Em nosso trabalho ela se mostrou eficiente quando a qualidade do blastocisto era boa, apesar do número de embriões utilizados para essa técnica serem limitados.

Kim et al. (2006) realizaram a imunocirurgia quando os blastocistos possuíam MCI distinta e obtiveram uma taxa de sucesso de 57,1%. Porém, quando a MCI encontrava-se indistinta e pequena, apenas 16,7% formaram linhagens. Quando a MCI não era visível nenhuma linhagem foi obtida com este método. Os autores demonstraram ainda, que a imunocirurgia era mais vantajosa do que a bissecção dos blastocistos de boa qualidade, com uma taxa de sucesso de 40%. A bissecção mostrou-se vantajosa no caso da MCI ser indistinta e pequena, onde 50% formaram linhagens de CTEh. Para os embriões que possuíam MCI não visível a melhor opção para obtenção de novas CTEh foi o plaqueamento total, com um sucesso de 11,1%. Da mesma

forma, em nosso estudo observamos que, quando a qualidade do blastocisto era ruim, nenhuma MCI isolada por imunocirurgia aderiu às placas de cultivo. Devido ao número limitado de embriões utilizados, não foi possível uma comparação entre os métodos para obter células pluripotentes no caso de embriões com qualidade ruim. Observamos que após isolamento da MCI utilizando-se laser, em blastocistos de má qualidade, a adesão ao cultivo não se concretizou e que após o plaqueamento total, 30% desses blastocistos ruins, aderiram ao cultivo.

STEPHENSON& BRAUDE (2010) somente realizaram imunocirurgia quando o blastocisto era de boa qualidade, pois MCI pequena tem a tendência de ser lesada ou destruída durante o processo. Provavelmente por isso os dois embriões de má qualidade utilizados para imunocirurgia em nosso estudo, não aderiram ao cultivo.

A técnica do plaqueamento total foi a mais utilizada no estudo, pois foi a técnica que demonstrou maior sucesso de adesão, o que está de acordo com a literatura (FINDIKLI et al., 2005; CHEN et al., 2009; SIDHU et al., 2010). O plaqueamento total se mostrou mais eficiente que as demais técnicas de isolamento, pois proporcionou uma maior taxa de adesão e uma maior média de dias de cultivo.

Genbacev et al. (2005) utilizaram 56 blastocistos doados a fresco e retiraram a zona pelúcida utilizando ácido Tyrodes. Desses, 10 (33%) aderiram às placas e uma linhagem de CTEh foi obtida. O presente estudo apresentou uma taxa de adesão muito superior após plaqueamento total (81%) talvez por termos utilizado a pronase ou laser para retirada da zona pelúcida, que são

métodos menos agressivos que o ácido Tyrodes. Outra hipótese é que o tipo celular utilizado como *feeder cells* por Genbacev et al. (2005) e o meio de cultivo não tenha sido favorável a adesão inicial. Simón et al. (2005), após retirar a zona pelúcida com ácido Tyrodes, plaqueou os embriões em fibroblastos humanos de placenta e obtiveram uma taxa de adesão de 87,5% (14 MCI aderidas de 16 blastocistos) e duas linhagens de CTEh.

Chen et al. (2009) observaram um sucesso enorme quando os blastocistos foram submetidos a plaqueamento total, 100% deles aderiam a placa de cultivo, enquanto para os blastocistos onde realizou-se isolamento por laser, a adesão foi de no máximo 91%. Contudo, a taxa de derivação de linhagens pós plaqueamento total era baixa, 10%, quando comparadas ao método de isolamento com laser, que teve taxas de derivação de 52%. Já para Findikli et al. (2005) o plaqueamento total foi mais eficiente em obter linhagens de CTEh do que imunocirurgia (45,5% x 26,6%). É necessário dar continuidade ao nosso estudo para verificarmos se a melhor taxa de adesão proporcionada pelo plaqueamento total será também a melhor técnica para obtenção de novas linhagens de CTEh, ou se o isolamento mecânico, com laser ou imunocirurgia proporcionarão uma melhor taxa de derivação.

O teste da fosfatase alcalina é amplamente utilizado nos estudos de células-tronco embrionárias para verificar-se a pluripotência (THOMSON et al., 1998; KLIMANSKAYA et al., 2005; GENBACEV et al., 2005; ELLERSTRÖM et al., 2006; NARWANI et al., 2010; SIDHU et al., 2010). O teste de fosfatase alcalina foi realizado 26 dias após o plaqueamento e mostrou-se positivo, indicando uma possível linhagem de CTEh. Ele foi utilizado como primeiro

método para comprovação do isolamento, pois a imunohistoquímica, método consagrado para confirmação de linhagens de CTEh, está sendo padronizada para realização futura.

A imunohistoquímica é utilizada para demonstrar que as células obtidas de fato são pluripotentes. Para padronizar as técnicas que serão utilizadas para testar as futuras linhagens de células-tronco embrionárias, foram feitos testes com os anticorpos anti OCT4, SSEA4 e CDX2, em blastocistos fixados em lâminas. Os anticorpos anti OCT4 e SSEA4 são marcadores de pluripotência, sendo intracelular e de superfície, respectivamente. (THOMSON et al., 1998; GENBACEV et al., 2005; CHEN et al., 2009; SIDHU et al., 2010). O anti CDX2 é um anticorpo que marca células do trofotoderma (ADJAYE et al., 2005; NIWA et al., 2005; CHEN et al., 2009). Apenas o anticorpo anti SSEA-4 mostrou-se positivo após o teste de imunohistoquímica em um blastocisto fixado.

O estudo realizado por Chen et al. (2009) mostrou que a expressão de OCT4 e CDX2 varia de acordo com o dia em que os blastocistos são analisados. Embriões no dia 5, que possuem de 40-75 células, têm OCT4 expresso tanto na MCI quanto no trofotoderma, e alguns desses embriões já começaram a expressar CDX2. No dia 6, quando o embrião possuía de 75-145 células, a expressão de OCT4 mostrava-se claramente concentrada na MCI enquanto a expressão de CDX2 estava presente no trofotoderma. Em alguns dos blastocistos analisados no dia 8, a expressão de OCT4 era confinada a um pequeno número de células, mas maioria dos embriões não expressava OCT4 e CDX2.

Os estudos com CTEh são importantes, pois permitem a criação de células e tecidos *in vitro* proporcionando um novo tipo de terapia e, até mesmo cura de algumas doenças que acometem o ser humano. Problemas como doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, diabetes, Alzheimer, Parkinson, lesões medulares, poderão ser amenizados ou até mesmo sanados com a utilização de CTEh. Ensaio de fármacos e testes de toxicidade podem ser desenvolvidos *in vitro* com linhagens de CTEh obtidas de doenças específicas, sendo um excelente modelo da mesma, possibilitando a descoberta de tratamento ou até mesmo cura. As linhagens de CTEh com doenças como, fibrose cística, distrofias musculares, Huntington, hemofilias, síndrome do X frágil, podem ainda ser utilizadas para acompanhar as modificações celulares e bioquímicas que ocorrem durante a evolução da enfermidade. O potencial das CTEh é enorme, quando comparado a células-tronco adultas, pois elas podem originar células e tecidos dos três folhetos embrionários: endoderme, ectoderme e mesoderme (MIKKOLA et al., 2006). Outro fator que deve ser levado em consideração são os telômeros, que estão reduzidos em células-tronco adultas quando comparado as CTEh, levando as células a senescência mais precocemente (KSIAZEK, 2009).

As células-tronco adultas podem ser utilizadas para tratamento de várias doenças e podem ser obtidas de diversas fontes como gordura (ZUK et al., 2001; KERN et al., 2006; CASTANHEIRA et al., 2009; GIUSTA et al., 2010), polpa dentária (PETROVIC&STEFANOVIC, 2009), cordão umbilical (BROXMEYER et al., 1990; ERICES et al., 2000; KERN et al., 2006), líquido amniótico (DE COPPI et al., 2007), medula óssea (PERIN et al., 2003;

CASTANHEIRA et al., 2009; KERN et al., 2006; ASSIS et al., 2010), sangue periférico (RUHNKE et al., 2005; DAMON 2009). Porém, algumas fontes são de difícil acesso envolvendo procedimentos cirúrgicos para obtenção das células, outras vezes as células obtidas não são suficientes para um transplante (CASTRO-MALASPINA et al., 1980; BRUDER et al., 1997). A purificação e a expansão do tipo celular desejado pode ser um fator complicador no uso de células-tronco adultas (SOTIROPOULOU et al., 2006). Outro fator que deve ser considerado é o mecanismo pelo qual as células-tronco adultas propiciam uma possível regeneração tecidual. Com isso, é importante saber se ocorre de fato o evento conhecido como plasticidade ou se as células-tronco adultas funcionam como células com efeito parácrino que vão somente produzir fatores solúveis para reparo, e não regeneração tecidual (KUCIA et al., 2005; KLIMANSKAYA et al., 2008)

Diversos autores desenvolveram estudos com CTEh demonstrando maneiras mais eficientes de isolamento da massa celular interna, cultivo, manutenção da pluripotência, propagação, congelamento, possibilitando a produção em massa de células para transplantes (TURETSKY et al., 2008; CORTES et al., 2009; KRAWETZ et al., 2010; AFLATOONIAN et al., 2010; MENG et al., 2010; STRÖM et al., 2010; HOLM et al., 2010; T'JOEN et al., 2011). Bancos de CTEH foram criados no mundo com intuito de manter variabilidade genética e aumentar as chances de compatibilidade para transplantes. Guhr et al. (2006) estimaram que havia aproximadamente 414 linhagens de CTEh obtidas em todo o mundo, das quais 78 eram registradas no *National Institutes of Health (NIH)*. Loser et al. (2009) verificaram que

existiam aproximadamente 1071 linhagens de CTEh sendo, 179 caracterizadas e disponíveis para pesquisas. Estudos futuros podem até mesmo desenvolver linhagens de células-tronco embrionárias compatíveis com doador através de clonagem terapêutica (KASTENBERG& ODORICO, 2008; VERFAILLIE 2009).

Nos Estados Unidos as pesquisas com células-tronco embrionárias já se encontram em um nível avançado. O primeiro teste em pacientes humanos está sendo conduzido desde 2009 para tratar lesões medulares, injetando-se na coluna lombar os oligodendrócitos, células menos indiferenciadas obtidas através do cultivo de CTEh. (ALPER, 2009, TROUNSON 2009). Ainda em 2009, um outro grupo americano conseguiu autorização do *Food and Drug Administration(FDA)* para realizar transplantes de CTEh para regeneração de retina (LU et al., 2009). Segundo Trounson (2009), a Novocell, uma companhia californiana de biotecnologia, está aguardando autorização do FDA para começar a fazer testes envolvendo células β para tratamento da diabetes. Estudos pré-clínicos com CTEh estão sendo realizados, em modelos animais, para corrigir doenças humanas como: infarto do miocárdio, Parkinson e doenças do fígado (TROUNSON, 2009).

Fraga et al. (2011) descreveram uma linhagem de CTEh desenvolvida no Brasil. Mais estudos são necessários para que novas linhagens sejam obtidas, principalmente sem contaminantes animais, para que ensaios pré-clínicos e futuramente ensaios clínicos, possam auxiliar no tratamento e cura de doenças.

As técnicas de isolamento são de extrema importância para derivação de novas linhagens de CTEh, assim como as técnicas de cultivo. O excesso de

células do trofotoderma pode levar a uma diferenciação das células pluripotentes, devendo, portanto ser retirado utilizando-se técnicas eficazes. Assim, a padronização das técnicas de isolamento, levando-se em conta a qualidade embrionária, leva a um incremento nas taxas de adesão às placas e a obtenção de novas linhagens. Em continuidade a esse estudo, serão testados novos meios de cultivo, novas *feeders cells* e será realizada a caracterização completa da linhagem obtida. A técnica de congelamento também será padronizada para armazenar as células-tronco pluripotentes. As linhagens obtidas futuramente poderão auxiliar em novas descobertas para tratamento de doenças e fármacos. O potencial de diferenciação das CTEh é grande e ainda deve ser amplamente estudado para que se obtenha o tipo celular ou o tecido desejado, *in vitro*, para utilização em terapias celulares.

6 CONCLUSÃO

Dentre as técnicas utilizadas, podemos concluir que, a de plaqueamento total é de fácil aplicação e possui uma elevada eficácia para isolamento de células-tronco embrionárias.

REFERÊNCIAS

ABDELHAFEZ F.F., et al. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 20, n. 2, p. 209-22, 2010.

ADJAYE J., et al. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1514-25, 2005.

AFLATOONIAN B., et al. Generation of Sheffield (Shef) human embryonic stem cell lines using a microdrop culture system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 236-41, 2010.

AHUMADA, A., et al. **Manual de Procedimentos Laboratório de Reprodução Assistida**. Brasil: Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, 2006. 133p.

ALIKANI M., et al. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. **Fertility Sterility**, v. 71, n.5, p. 836-42, 1999.

ALLEGRUCCI C., YOUNG L.E. Differences between human embryonic stem cell lines. **Human Reproduction Update**, v.13, n.2, p. 103-20, 2007.

ALPER J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 213-214, 2009.

AMIT M, ITSKOVITZ-ELDOR J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. **Journal of Anatomy**, v. 200, n. 3, p. 225-32, 2002.

AMIT M., et al. Feeder layer– and serum-free culture of human embryonic stem cells. **Biology Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 837–845, 2004.

ASSIS A.C., et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. **Cell Transplantation**, v.19, n. 2, p. 219-230, 2010.

BAKSH D., SONG L., TUAN R.S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal Cell Molecular Medicine**, v. 8, n.3, p. 301-16, 2004.

BALABAN B., et al. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 8, n. 6, p. 695-700, 2004.

BANGSBOLL S., et al. Patients' attitudes towards donation of surplus cryopreserved embryos for treatment or research. **Human Reproduction**, v.19, n. 10, p. 2415-2419, 2004.

BAXTER, M.A., et al. Analysis of the distinct functions of growth factors and tissue culture substrates necessary for the long-term self-renewal of human embryonic stem cell lines. **Stem Cell Research**, v. 5, 2009.

- BEATTIE G.M., et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. **Stem Cells**, v. 23, n. 4, p. 489-95, 2005.
- BIGGERS J.D., SUMMERS M.C. Choosing a culture medium: making informed choices. **Fertility Sterility**, v. 90, n. 3, p. 473-83, 2008.
- BOLTON V.N., WREN M.E., PARSONS J.H. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. **Fertility Sterility**, v. 55, n. 4, p. 830-2, 1991.
- BONGSO A, et al. Fertilization and early embryology: isolation and culture from inner cell mass cells from human blastocysts. **Human Reproduction**, v. 9, n. 11, p. 2110-7, 1994.
- BRAAM S.R., et al. Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2257-65, 2008.
- BROXMEYER H.E., et al. Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **International Journal of Cell Cloning**, v. 8, Suppl 1, p. 76-89, 1990.
- BRUDER S.P., JAISWAL N., HAYNESWORTH S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.64, n. 2, p. 278-94, 1997.
- CAMARASA M., et al. Naturally immortalised mouse embryonic fibroblast lines support human embryonic stem cell growth. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 3, p. 453-62, 2009.
- CARPENTER M.K., et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 2, p. 243–258, 2004.
- CASTANHEIRA P., et al. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. **Cell Transplant**, v.18, n. 4, p. 423-431, 2009.
- CASTRO-MALASPINA H., et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v. 56, n. 2, p. 289-301, 1980.
- CHASE L.G., FIRPO M.T. Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 367-72, 2007.
- CHEN H., et al. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. **Human Reproduction**, v.20, n. 8, p. 2201-6, 2005.

CHEN H.F., et al. Derivation, characterization and differentiation of human embryonic stem cells: comparing serum-containing versus serum-free media and evidence of germ cell differentiation. **Human Reproduction**, online access Oct 27, 2006.

CHEN H.F., et al. Novel autogenic feeders derived from human embryonic stem cells (hESCs) support an undifferentiated status of hESCs in xeno-free culture conditions. **Human Reproduction**, v. 24, n. 5, p. 1114-25, 2009.

CHENG E.H. et al. Blastocoel volume is related to successful establishment of human embryonic stem cell lines. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 17, n.3, p. 436-44, 2008.

CHOO A., et al. Autogenic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. **Methods in Cell Biology**, v. 86, p. 15-28, 2008.

CHOO A., et al. Expansion of pluripotent human embryonic stem cells on human feeders. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 3, 321-31, 2004.

CHOUDHARY M., et al. Demographic, medical and treatment characteristics associated with couples' decisions to donate fresh spare embryos for research. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2091-2096, 2004.

CORTES J. L., et al. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. **Human Reproduction**, v. 24, n. 8, p. 1844-51, 2009.

CORTÉS J.L. et al. Evaluation of the laser technique method to isolate the inner cell mass of murine blastocysts. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 46, n. 4, 2006.

CORTES J.L., et al. Spanish stem cell bank interviews examine the interest of couples in donating surplus human IVF embryos for stem cell research. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 2007.

CORTÉS J.L., et al. Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. **Stem Cells Development**, v. 17, n. 2, p. 255-67, 2008.

COWAN C.A., et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 13, p. 1353-6, 2004.

DAMON L.E. Mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood. **Expert Review of Hematology**, v. 2, n. 6, p. 717-733, 2009.

DAWSON K.J., et al. Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 177-82, 1995.

DE COPPI P., et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v.25, n. 1, p. 100-106, 2007.

DERDA R., et al. High-throughput discovery of synthetic surfaces that support proliferation of pluripotent cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 4, p.1289-95, 2010.

DOZORTSEV D., MCGINNIS K. An improved fixation technique for fluorescence in situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. **Fertility Sterility**, v. 76, n. 1, p. 186-188, 2001.

EBNER T., MOSER M., TEWS G. Possible applications of a non-contact 1.48 microm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. **Human Reproduction Update**, v.11, n. 4, p. 425-35, 2005.

ELLERSTRÖM C., et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. **Stem Cells**, v. 24, n. 10, p. 2170-6, 2006.

ERICES A., CONGET P., MINGUELL J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000.

EVANS M.J., KAUFMAN M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, 1981.

FAN Y., et al. A modified culture medium increases blastocyst formation and the efficiency of human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 5, p. 533-9, 2010.

FEKI A., et al. Derivation of the first Swiss human embryonic stem cell line from a single blastomere of an arrested four-cell stage embryo. **Swiss Medical Weekly**. v. 138, n. 37-38, p. 540-50, 2008.

FINDIKLI N., et al. Establishment and characterization of new human embryonic stem cell lines. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 5, p. 617-27, 2005.

FONG C.Y., BONGSO A. Derivation of human feeders for prolonged support of human embryonic stem cells. **Methods Molecular Biology**, v. 331, p. 129-35, 2006.

FRAGA A. M., et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 431-40, 2011.

FU X., et al. Establishment of clinically compliant human embryonic stem cells in an autologous feeder-free system. **Tissue Engineering, Part C: Methods**, v. 17, n. 9, p. 927-37, 2011.

GARDNER DK, LANE M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. **Human Reproduction**, v. 13, Suppl 3, p. 148-59, 1998.

GEBER S, SAMPAIO M, SILVA AL. Desenvolvimento embrionário humano no período pré-implantação. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, 1998.

GEBER S., et al. Laser confers less embryo exposure than acid tyrode for embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis cycles: a randomized study. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 28, n. 9, p.58, 2011.

GEBER S., et al. Comparison between two forms of vaginally administered progesterone for luteal phase support in assisted reproduction cycles. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14, n. 2, p.155-8, 2007.

GEBER S., WINSTON R.M., HANDYSIDE A.H. Proliferation of blastomeres from biopsied cleavage stage human embryos in vitro: an alternative to blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis. **Human Reproduction**, v. 10, n. 6, p. 1492-6, 1995.

GEBER S.; SALES L.; SAMPAIO M. Laboratory techniques for human embryos. **Reproductive BioMedicine Online**, v.5, 211-218, 2002.

GEBER, S. ; et al. Ovarian Pregnancy after IVF-ET in a patient with absent tube. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 12, p. 643-645, 2001.

GEBER, S., et al. Transferência de embriões cultivados independentemente em meios de cultura essencial e sequencial melhora as taxas de gravidez em tratamentos com técnicas de reprodução assistida. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 13, p. 24-27, 2009.

GEENS M., et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. **Human Reproduction**. v. 24, n.11, p. 2709-17, 2009.

GENBACEV O., et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. **Reproductive Biology**, v. 83, n. 5, p. 1517-1529, 2005.

GERAEDTS J., et al. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) Consortium: preliminary assessment of data from January 1997 to September 1998. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. **Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 3138-48, 1999.

GIORGETTI C., et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. **Human Reproduction**, v. 10, n.9, p. 2427-31, 1995.

GIUSTA M.S., et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue undergoing osteoblast differentiation. **Cytotherapy**, v.12, n. 4, p. 478-490, 2010.

GRAVES K.H., MOREADITH R.W. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos.

Molecular Reproduction and Development, v. 36, n. 4, p. 424, 1993.

GRIFFIN, D., et al. Experience with clinical preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in-situ hybridization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.11, n. 3, p. 132-143, 1994.

GUHR A., et al. Current state of human embryonic stem Cell Research: an overview of cell lines and their use in experimental work. **Stem Cells**, v. 24, n. 10, p. 2187-91, 2006.

HAMMARBERG K., TINNEY L. Deciding the fate of supernumerary frozen embryos: a survey of couples' decisions and the factors influencing their choice. **Fertility Sterility**, v. 86, n. 1, p. 86-91, 2006.

HANDYSIDE A.H., et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. **Nature**, v. 19, n. 6268, p. 768-70, 1990.

HANNOUN Z., et al. The comparison between conditioned media and serum-free media in human embryonic stem cell culture and differentiation. **Cellular Reprogramming**, v.12, n. 2, p.133-40, 2010.

HARDY K., HANDYSIDE A.H., WINSTON R.M. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. **Development**, v. 107, n. 3, p. 597-604, 1989.

HARPER J., et al. What next for preimplantation genetic screening? **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 478-80, 2008.

HARPER J.C., et al. ESHRE PGD consortium data collection VII: cycles from January to December 2004 with pregnancy follow-up to October 2005. **Human Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 741-55, 2008.

HAYES B., et al. Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 465-73, 2008.

HEINS N., et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 367-376, 2004.

HOFFMAN L.M, CARPENTER M.K .Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 699-708, 2005.

HOLM F., et al. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Human Reproduction**, v. 25, n. 5, p.1271-9, 2010.

HOVATTA O. Derivation of human embryonic stem cell lines, towards clinical quality. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 8, p. 823-8, 2006.

- HOVATTA O., et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. **Human Reproduction**, v.18, n. 7, p. 1404–1409, 2003.
- HUG K. Motivation to donate or not donate surplus embryos for stem-cell research: literature review. **Fertility Sterility**, v. 89, n. 2, p. 263-277, 2008.
- INAMDAR M.S., et al. Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded grade III embryos. **Stem Cells Development**, v. 18, n. 3, p. 423-33, 2009.
- INZUNZA J., et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum-free medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 4, p. 544–549, 2005.
- KARLSTRÖM P.O., et al. Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. **Human Reproduction**, v.12, n. 6, p. 1263-6, 1997.
- KASTENBERG Z.J., ODORICO J.S. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. **Transplantation Reviews**, v. 22, n. 3, p. 215-22, 2008.
- KERN S., et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, n. 5, p. 1294-1301, 2006.
- KIM C., ET AL. IMPROVEMENT OF EMBRYONIC STEM CELL LINE DERIVATION EFFICIENCY WITH NOVEL medium, glucose concentration, and epigenetic modifications. **Cloning Stem Cells**, v. 11, n. 1, p. 89-100, 2009.
- KIM, H.; et al. Methods for Derivation of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1228-1233, 2006.
- Kit de Sondas de ADN Multicolor AneuVysion**. Alemanha: Abott, 2006. Bula da sonda.
- KLIMANSKAYA I., et al. Human embryonic stem cells derived without feeder cells, **Lancet**, v.365, n. 9471, p.1636–1641, 2005.
- KLIMANSKAYA I., et al. Human embryonic stem cells lines derived from single blastomeres. **Nature**, v. 444, n. 7118, p.1-5, 2006.
- KLIMANSKAYA I., ROSENTHAL N., LANZA R. Derive and conquer: sourcing and differentiating stem cells for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n.2, p. 131-42, 2008.
- KOIVISTO H., et al. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 9, n. 3, p. 330-7, 2004.

KRAWETZ R., et al. Large-scale expansion of pluripotent human embryonic stem cells in stirred-suspension bioreactors. **Tissue Engineering, Part C: Methods**, v.16, n. 4, p.573-82, 2010.

KRONES T., et al. Attitudes of patients, healthcare professionals and ethicists towards embryonic stem Cell Research and donation of gametes and embryos in Germany. **Reproductive Biomedicine Online**, v.13, n. 5, p.607-617, 2006.

KSIAZEK K.A comprehensive review on mesenchymal stem cell growth and senescence. **Rejuvenation Research**, v. 12, n.2, p. 105-16, 2009.

KUCIA M., RATAJCZAK J., RATAJCZAK M.Z. Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous--that is the question. **Expert Review of Hematology**, v. 33, n.6, p. 613-23, 2005.

KUWAYAMA M., et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 5, p. 608-614, 2005.

LANZENDORF S.E., et al. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. **Fertility Sterility**, v. 76, n. 1, p. 132-7, 2001.

LEE J.B., et al. Available human feeder cells for the maintenance of human embryonic stem cells. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 727-35, 2004.

LEE J.B., et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 1, p. 42–49, 2005.

LEI T., et al. Xeno-free derivation and culture of human embryonic stem cells: current status, problems and challenges. **Cell Research**, v. 17, n. 8, p. 682-8, 2007.

LEROU P.H., et al. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. **Nature Biotechnology**, v. 26, n.2, p. 212-4, 2008.

LI B., et al. A whole-mechanical method to establish human embryonic stem cell line HN4 from discarded embryos. **Cytotechnology**, v. 62, n. 6, p.509-18, 2010.

LI M., et al. Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 65, n. 4, p. 429, 2003.

LI T., et al. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. **Chinese Medical Journal**, v. 118, n. 2, p. 116–122, 2005.

LI X., et al. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder – free single human embryonic stem cells. **Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 580-590, 2009.

LIN G., et al. A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. **Cell Research**, v. 17, n.12, p. 999-1007, 2007.

LIN G., et al. A highly homozygous and parthenogenetic human embryonic stem cell line derived from a one-pronuclear oocyte following in vitro fertilization procedure. **Cell Research**, v. 17, n. 12, p. 999-1007, 2007.

LIN H., et al. Multilineage potential of homozygous stem cells derived from metaphase II oocytes. **Stem Cells**, v. 21, n. 2, p. 152-61, 2003.

LIU W., et al. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from poor quality embryos. **Journal Genetics Genomics**, v. 36, n. 4, p. 229-39, 2009.

LÖSER P., et al. Human embryonic stem cell lines and their use in international research. **Stem Cells**, v. 28, n. 2, p. 240-6, 2010.

LU B., et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. **Stem Cells**, v.27, p. 2126-2135, 2009.

LU J., et al. Defined culture conditions of human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.103, n. 15, p. 5688-93, 2006.

LUDWIG T.E., et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 185-7, 2006.

LUNA M., et al. Couples' opinions regarding the fate of surplus frozen embryos. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 19, Suppl 2, p. 11-15, 2009.

MARTIN G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634-8, 1981.

MARTIN M.J., et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 228-32, 2005.

MATEIZEL I., et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. **Human Reproduction**, v. 21, n. 2, p. 503-511, 2006.

MATEIZEL I., et al. Derivation, culture and characterization of VUB hESC lines. **In vitro Cell Development Biology – Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 300-308, 2010.

MEISSNER A., JAENISCH R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. **Nature**, v. 439, n. 7073, p. 212-5, 2006.

MEISSNER A., JAENISCH R. Generation of nuclear transfer-derived pluripotent ES cells from cloned Cdx2-deficient blastocysts. **Nature**, v. 12, n. 439, p. 212-5, 2006.

MENG G., et al. Derivation of human embryonic stem cell lines after blastocyst microsurgery. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 88, n. 3, p. 479-90, 2010.

MIKKOLA M., et al. Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. **BMC Developmental Biology**, v. 6, n. 40, 2006.

MITALIPOVA M., et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. **Stem Cells**, v. 21, n. 5, p. 521-6, 2003.

MIYAMOTO K., et al. Human placenta feeder layers support undifferentiated growth of primate embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 433-40, 2004.

MONTES R., et al. Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. **Cell Research**, v. 19, n. 6, p. 698-709, 2009.

NARWANI K., et al. Human embryonic stem cells from aneuploid blastocysts identified by pre-implantation genetic screening. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.46, n. 3-4, p. 309-16, 2010.

NAVARRO-ALVAREZ N., et al. Long-term culture of Japanese human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Cell Transplantation**, v. 17, n. 1-2, p. 27-33, 2008.

NIWA H., et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. **Cell**, v. 123, n. 5, 917-29, 2005.

NOAKSSON K., et al. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. **Stem Cells**, v. 23, p. 1460–1467, 2005.

NOYES N., et al. Embryo biopsy: the fate of abnormal pronuclear embryos. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 17, n. 6, p. 782-8, 2008.

ODORICO J.S., KAUFMAN D.S., THOMSON J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v.19, n. 3, p.193-204, 2001.

O'LEARY T., et al. The influence of early embryo traits on human embryonic stem cell derivation efficiency. **Stem Cells Development**, v. 20, n.5, p. 785-93, 2011.

PALERMO G., et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v. 340, n. 8810, p.17-8, 1992.

PARK I. H., et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**, v. 451, n.7175, p.141-6, 2008.

PARK J.H., et al. Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 6, p. 2007–2014, 2003.

PARK S.P., et al. Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. **Human Reproduction**, v.19, n. 3, p. 676-84, 2004.

PASQUALOTTO, F. F. **Células -Tronco - Visão do Especialista**. Caxias do Sul, RS: Educus, 2007. 316 p.

PEBAY A., et al. Essential Roles of Sphingosine-1-Phosphate and Platelet-Derived Growth Factor in the Maintenance of Human Embryonic **Stem Cells**, v. 23 , n. 10, p. 1541-1548, 2005.

PERA M.F., REUBINOFF B., TROUNSON A. Human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 5-10, 2000.

PERIN E.C., et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation** ,v. 107, p. 2294-2302, 2003.

PETROVIC V, STEFANOVIC V. Dental tissue--new source for stem cells. **Scientific World Journal**, v. 9, p. 1167-1177, 2009.

PEURA T., et al. Karyotypically normal and abnormal human embryonic stem cell lines derived from PGD-analyzed embryos. **Cloning Stem Cells**, v.10, n. 2, p. 203-16, 2008.

PEURA T.T., BOSMAN A., STOJANOV T. Derivation of human embryonic stem cell lines. **Theriogenology**, v. 67, n.1, p. 32-42, 2007.

PEURA T.T., SCHAFT J., STOJANOV T. Derivation of human embryonic stem cell lines from vitrified human embryos. **Methods Molecular Biology**, v. 584, p.21-54, 2010.

PICKERING S.J., et al. Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 390-7, 2005.

RAJALA K., et al. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1231-8, 2007. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, n. 8, p. 823-8, 2006.

REUBINOFF, B.E., et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 399-404, 2000.

REVAZOVA E. S., et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. **Cloning Stem Cells**, v.9, n. 3, p. 432-49, 2007.

RICHARDS M., et al. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 20, n. 9, p. 933-6, 2002.

RIPPON H.J., BISHOP A.E. Embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 37, n. 1, p. 23-34, 2004.

RUHNKE M., et al. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1774-1786, 2005.

SAMPAIO M.A.C., GEBER S. Births after transfer of zona-free blastocysts in oocyte donation cycles. **Journal Assisted Reproduction Genetics**, v. 18, n. 3, p. 156-9, 2001.

SANDALINAS M., et al. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1954-8, 2001.

SATO N., et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **Nature Medicine**, v. 10, n. 1, p. 55-63, 2004.

SATO N., et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Developmental Biology**, v. 260, n. 2, p. 404-13, 2003.

SERMON K., et al. ESHRE PGD Consortium data collection IV: May-December 2001. **Human Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 19-34, 2005.

SIDHU K.S., et al. Derivation of a new human embryonic stem cell line, Endeavour-2, and its characterization. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 269-75, 2010.

SIMON C., et al. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. **Fertility Sterility**, v. 83, n. 1, p. 246-249, 2005.

SIMÓN C., et al. First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. **Fertility Sterility**, v. 83, n. 1, p. 246-9, 2005.

SJÖGREN A., et al. Human blastocysts for the development of embryonic stem cells. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 9, n. 3, p. 326-9, 2004.

SKOTTMAN H, HOVATTA O. Culture conditions for human embryonic stem cells. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 691-8, 2006.

SKOTTMAN H. Derivation and characterization of three new human embryonic stem cell lines in Finland. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 206-9, 2010.

SKOTTMAN H., et al. Unique gene expression signature by human embryonic stem cells cultured under serum-free conditions correlates with their enhanced and prolonged growth in an undifferentiated stage. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 151–167, 2006.

SMITH A.G., et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 688–690, 1988.

SOLTER D. E KNOELES B.B. Immunosurgery of mouse blastocyst., **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 72, v. 12, p. 5099–5102, 1975.

SOTIROPOULOU P. A., et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, n. 2, p. 462-71, 2006.

STEPHENSON E.L., BRAUDE P.R .Derivation of the King's College London human embryonic stem cell lines.**In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 46, n. 3-4, p.178-85, 2010.

STEPTOE P., EDWARDS R.G.Birth after the reimplantation of a human embryo.**Lancet**, v. 2, n. 8085, p. 366, 1978.

STOJKOVIC M., et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after threestep in vitro culture. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 790–797, 2004.

STOJKOVIC P., et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells.**Stem Cells**, v. 23, n. 3, p. 306-14, 2005.

STRELCHENKO N., et al. Morula-derived human embryonic stem cells. **Reproductive Biomedicine Online**, v.9, n. 6, p. 623-9, 2004.

STRÖM S., et al. Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. **Human Reproduction**, v. 22, n. 12, p. 3051-8, 2007.

STRÖM S., et al. No relationship between embryo morphology and successful derivation of human embryonic stem cell lines. **PLoS One**, v. 5, n.12, p.15329, 2010.

SUSS-TOBY E., et al. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. **Human Reproduction**, v. 19, p. 670–675, 2004.

TAKAHASHI K., et al. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. **Nature Protocols**, v. 2, n.12, p. 3081-9, 2007.

TANAKA, N., et al. Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model. **Journal of Translational Medicine**, online access, 2006.

- THOMSON J.A., et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.
- THOMSON J.A., et al. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocyst. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 254, 1996.
- TROPEL P., et al. High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. **In Vitro Cell Development Biology Animal**, v. 46, n. 3-4, p. 376-85, 2010.
- TROUNSON A, MOHR L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. **Nature**, v. 305, n. 5936, p. 707-9, 1983.
- TROUNSON A. New perspectives in human stem cell therapeutic research. **BMC Medicine**, v. 7, n. 29, 2009.
- TURETSKY T., et al. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. **Human Reproduction**, v. 23, n. 1, p. 46-53, 2008.
- VALLIER L., et al. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v.1, p. 4495-509, 2005.
- VERFAILLIE C. Pluripotent stem cells. **Transfusion Clinique et Biologique**, v.16, p. 65-69, 2009.
- VERLINSKY Y., et al. Human Embryonic Stem Cells lines with Genetic Disorders. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, p. 105-110, 2005.
- VERLINSKY Y., et al. Correlation between PGD for chromosomal aneuploidies and efficiency of establishing human embryonic stem cell lines. **Stem Cell Research**, v. 2, p. 78-82, 2009.
- VILLA-DIAZ L.G., et al. Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells. **Stem Cells Development**, v.18, n. 4, p. 641-51, 2009.
- WANG G., et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, n. 3, p. 934-42, 2005.
- WANG Q., et al. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p.1221-7, 2005.
- WIRLEITNER B., et al. Individual demands of human embryos on IVF culture medium: influence on blastocyst development and pregnancy outcome. **Reproductive Biomedicine Online**, v.21, n.6 , p. 776-82, 2010.
- XIAO L., YUAN X., SHARKIS S.J. Activin A maintains self-renewal and regulates FGF, Wnt and BMP pathways in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 1476–1486, 2006.

XU C., et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 971–974, 2001.

XU C., et al. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. **Stem Cells**, v. 22, n. 6, p. 972-80, 2004.

XU R.H., et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. **Nature Methods**, v. 2, p. 185–190, 2005.

YAO S., et al. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n. 18, p. 6907-12, 2006.

YOO S.J., et al. Efficient culture system for human embryonic stem cells using autologous human embryonic stem cell-derived feeder cells. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 37, n. 5, p. 399-407, 2005.

YU J., et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917-20, 2007.

ZUK P.A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, p. 211-228, 2001.

APÊNDICE

Apêndice

Regulamentação

As CTEh são derivadas de massa celular interna de embriões em estágio de blastocisto sendo de fundamental importância ter a fonte adequada de embriões em laboratório para as fases iniciais da pesquisa. Os centros que realizam procedimento de Reprodução Humana Assistida são a única fonte desses embriões, uma vez que realizam rotineiramente cultivo embrionário antes de sua transferência para útero, de forma terapêutica. Embriões excedentes criopreservados há mais de três anos e inviáveis geneticamente ou fertilizados anormalmente poderiam ser doados para estas pesquisas, como o estabelecido pelo artigo quinto da Lei de Biossegurança 11.105, de 24 de março de 2005

Artigo 5o – É permitida, para fins de pesquisa e terapia, a utilização de células-tronco embrionárias obtidas de embriões humanos produzidos por fertilização in vitro e não utilizados no respectivo procedimento atendidas as seguintes condições:

I- sejam embriões inviáveis; ou

II- sejam embriões congelados a três anos ou mais, na data da publicação desta lei, ou que, já congelados na data da publicação desta Lei, depois de completarem três anos, contados a partir da data de congelamento.

§ 1o Em qualquer caso, necessário o consentimento dos genitores.

§ 2o Instituições de pesquisa e serviços de saúde que realizem pesquisa ou terapia em células tronco embrionárias humanas deverão submeter seus projetos a apreciação e a aprovação dos respectivos comitês de ética em pesquisa.

§ 3o É vedada a comercialização de material biológico a que se refere esse artigo e sua prática implica o crime tipificado no art. 15 da Lei n 9434, de 4 de fevereiro de 1997.

Termo de consentimento livre e esclarecido de permissão para utilização dos embriões criopreservados há três anos ou mais e/ou inviáveis para pesquisa de células-tronco embrionárias.

ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS DE BLASTOCISTOS HUMANOS, PROVENIENTES DE TÉCNICA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Vocês, os genitores, foram convidados a doarem os embriões criopreservados há três anos ou mais e/ou inviáveis para pesquisas de células tronco-embrionárias. O estudo será realizado pelo Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais com colaboração da clínica Origen sob o comando do Prof. Dr. Alfredo Góes, do Prof Dr. Selmo Geber e do Prof. Dr. Marcos Sampaio.

Nos últimos anos vêm sendo desenvolvidos vários estudos que utilizam as células-tronco, que tem o poder de criar células e tecidos do corpo humano no laboratório. Esta tecnologia é uma possível alternativa para o tratamento, criação de medicamentos ou até mesmo cura, de doenças como diabetes tipo I, Alzheimer, Parkinson, doenças cardíacas, esclerose múltipla, distrofia muscular e diversas outras doenças que acometem o ser humano.

Esperamos que as células-tronco de embriões tenham um potencial maior para oferecer esse tipo de tratamento, no futuro. Por isso, são necessários estudos para se avaliar se isso é ou não possível.

A participação no projeto então consiste na doação dos embriões congelados há três anos ou mais e/ou inviáveis, para a retirada das células-tronco. Para a obtenção das células-tronco embrionárias, no entanto, a estrutura do embrião será **desfeita**, o que significa que suas células serão separadas de modo que o processo é irreversível, ou seja, não será mais capaz de ser implantado no útero e formar uma gravidez. Por este motivo os embriões que podem ser doados para a pesquisa (Lei de Biossegurança Nº 11.105, de 24 de março de 2005) são aqueles que possuem seu desenvolvimento e potencial de implantação comprometido por:

- 1- Fertilização anormal;
- 2- Dignóstico genético alterado (doente) após PGD (Diagnóstico Genético Pré-Implantação);
- 3- Congelamento há três anos ou mais.

Caso vocês não queiram doar estes embriões para pesquisa pode-se:

- 1- Congelar os embriões doentes após PGD ou aqueles anormalmente

fertilizados;

- 2- Manter os embriões congelados ou transferir para o útero da própria paciente ou de outra paciente, os embriões congelados há três anos ou mais

Ressaltamos que o estado de inviabilidade não se altera com congelamento destes embriões, ou seja, eles continuarão doentes ou alterados. Além disso, as chances de sucesso do congelamento e descongelamento diminuem consideravelmente.

Informamos que o casal pode desistir da participação na pesquisa em qualquer fase do projeto não sendo possível, entretanto, recuperar os embriões já utilizados, pois para a obtenção das células-tronco a estrutura do embrião é desfeita como esclarecido acima.

A pesquisa proposta pela nossa equipe tem como objetivo tentar retirar estas células dos embriões, o que envolve um processo bastante delicado e difícil, para o cultivo das mesmas no laboratório. No laboratório serão estudadas as características das células-tronco, e ao final das pesquisas estas células serão congeladas de forma confidencial (utilizando-se codificações), na clínica Origen, por um período de 5 anos, de acordo com a resolução nº 347 do Conselho Nacional de Saúde. Após este período, haverá descongelamento do material, apenas para avaliar a viabilidade destas após tal período de congelamento. Esta pesquisa não tem a intenção de transplantar as células-tronco obtidas em pessoas doentes. Será uma pesquisa apenas para avaliar o desenvolvimento das técnicas de cultivo, manipulação e caracterização destas células, para que em estudos futuros já se tenha um protocolo padrão a ser seguido.

É importante lembrar que os nomes serão mantidos em sigilo e que a participação de vocês é voluntária.

Vocês serão mantidos a par dos progressos das pesquisas através de cartas informativas. Os resultados serão publicados em revistas científicas e de divulgação científica, desta forma serão apresentados para vocês, para comunidade científica e sociedade em geral.

Esclarecemos ainda que antes, durante e depois da pesquisa vocês não terão despesas financeiras e estarão isentos de qualquer desconforto e risco físico, já que o estudo não implica em nenhuma intervenção cirúrgica envolvendo os genitores. Também não haverá nenhum tipo de benefício financeiro para quem doar os embriões para pesquisa. **O não cumprimento de qualquer diretriz descrita neste termo, poderá acarretar em direito a indenização aos genitores.** A clínica Origen conta com um serviço de acolhimento psicológico gratuito, caso seja do interesse de vocês participarem. Colocamo-nos à disposição para quaisquer esclarecimentos e acompanhamentos que se façam necessários.

Se vocês optarem por participar do projeto, por favor, assinem e preencham a seção que segue. Ao assinar este documento você tem o direito de dar sua opinião, de fazer perguntas, além dos demais direitos mencionados acima. Se vocês tiverem dúvidas entrem em contato pessoalmente ou por telefone:

Dr. Selmo Geber Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Faculdade de Medicina da UFMG Tel: 3409-9300;

Dr. Alfredo Goes Av. Antonio Carlos 6627, ICB Q4 Sl.167 Tel: 3409-2632;

Dr. Marcos Sampaio: Av. do Contorno, 7747 - Lourdes Tel: 2102-6363/

Vocês receberam uma cópia deste documento de consentimento que ficará em seu poder. Nós agradecemos por sua colaboração e interesse em nosso projeto.

Atenciosamente,

Dr. Alfredo Goes, Dr. Selmo Geber e Dr. Marcos Sampaio

18/03/2009

Nós,

_____ e

documento (tipo e número) _____
 / _____

Concordamos em participar da pesquisa descrita de células-tronco embrionárias obtidas de embriões gerados *in vitro*, por ocasião de tratamento de fertilização *in vitro* realizado em __/__/__, os quais se encontram em condições de inviabilidade por fertilização anormal (____ número de embriões neste estado - a ser preenchido pelo Laboratório de FIV) e/ou em condições de inviabilidade por diagnóstico genético anormal (____ número de embriões neste estado - a ser preenchido pelo Laboratório de FIV) e/ou criopreservados por tempo igual ou superior a 3(três) anos (____ número de embriões neste estado - a ser preenchido pelo Laboratório de FIV).

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Assinatura dos participantes

Assinatura dos participantes

Clínica ORIGEN – Centro de Medicina Reprodutiva

ANEXO



SIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 436/08

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda Góes

**Departamento de Bioquímica e
Imunologia Instituto de Ciências
Biológicas- UFMG**

DECISÃO

O Corwtê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP aprovou, no dia 04 de novembro de 2008, após .atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estabelecimento e caracterização fenotípica de linhagens de células-tronco embrionárias de blastocistos humanos, provenientes de técnica de reprodução assistida**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O projeto será encaminhado, com o devido parecer, à CONEP, para avaliação final. O pesquisador deverá aguardar esta aprovação final para iniciar a pesquisa.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**



Conselho Nacional de Saúde

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER N° 452/2009

CAAE - 0463.0.203.000-08 Processo n° 25000.200118/2008-22

Projeto de Pesquisa: "*Estabelecimento e caracterização fenotípica de linhagens de células-tronco embrionárias de blastocistos humanos, provenientes de técnica de reprodução assistida*"

Pesquisador Responsável: Dr. Alfredo Miranda de Góes

Instituição: Instituto de Ciências Biológicas - ÍCB/ Universidade Federal de Minas Gerais

-UFMG

CEP de origem: UFMG

Área Temática Especial: Reprodução humana; novos procedimentos

Sumário geral do protocolo

Células tronco embrionárias humanas (CTEh) tem grande potencial em inúmeras áreas de pesquisas biomédicas básicas bem como em pesquisas clínicas aplicadas. As CTEh podem ser usadas como ferramentas para pesquisas *in vitro* envolvendo o estudo do processo de desenvolvimento humano, estudos toxicológicos e farmacológicos, também para terapia celular envolvendo a geração e a regeneração de tecidos.

Estudos realizados a respeito de transplantes de CTEh alertam para o fato de que transplantar células que possuem capacidade de diferenciação e crescimento ilimitado aumenta o risco de um desenvolvimento impróprio *in situ* podendo levar à formação de uma deformação ou até um íeratoma. Com isso, um dos principais desafios para pesquisas com CTEh é o melhor entendimento das vias do desenvolvimento que direciona a formação de tecidos específicos no embrião para que estas vias possam ser recapituladas *in vitro*.

Disnte disso existe a necessidade do desenvolvimento de estratégias apropriadas de cultivo para que exista um melhor controle tanto para o direcionamento da diferenciação celular, quanto para mante-las em seu estado indiferenciado de pluripotência.

A derivação de CTEh a partir da massa celular interna de blastocistos vindos de tratamentos de fertilização *in vitro* já foi demonstrada em estudos anteriores.

O presente projeto apresenta, portanto, urna proposta de estudo baseada em autorização legal (Lei 11.105 de 24 de março de 2005) para que sejam realizadas pesquisas com células-tronco a partir de embriões humanos. Tem como objeívo gera! estabelecer e caracterizar linhagens de células-tronco embrionárias humanas *in Vftro*, por rneio do desenvolvimento de sistemas adequados de cultivos, fenotípagem e armazenamento, a partir de embriões humanos inviáveis (fertilizados anormalmente e/ou geneticamente anormais) e /ou criopreservados há mais de três anos provenientes de técnicas de tratamento de fertilização *in vitro*.

Os objetivos específicos incluem: (1) padronizar o método mais adequado de isolamento de massa celular interna, utilizando-se laser diíodo associado com isolamento mecânico, ou somente isolamento mecânico; (2) avaliar as condições de cultivo para manutenção de células tronco embrionárias humanas (CTEh) a partir da massa céular interna de biasíocistos humanos em diferentes meios de cultivo, matrizes celulares e

Cont. Parecer CONEP N° 452/2009.

extra-celulares, visando o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficaz, com boa reprodutividade, onde as células teriam seu crescimento e estágio de indiferenciação controlados; (3) estabelecer linhagens de CTEh caracterizando-as fenotipicamente através de marcadores moleculares de superfície e internos específicos; (4) avaliar a capacidade de auto-renovação das CTEh em cultivo; (5) identificar, analisar marcadores específicos e outros fatores que determinam a manutenção do estado de pluripotência *in vivo*, através da formação de teratomas em camundongos imunossuprimidos e *in vitro*, através da formação de corpos embrionários; (6) criopreservar as linhagens de CTEh obtidas.

Trata-se, portanto, de projeto de pesquisa para a caracterização *in vitro* de células embrionárias obtidas a partir de blastocistos humanos, provenientes de técnica de reprodução assistida. Os métodos utilizados para os objetivos do estudo estão claramente descritos. Os embriões utilizados serão aqueles anormalmente fertilizados e/ou criopreservados há mais de três anos e/ou geneticamente anormais, doados para as pesquisas de células tronco. Os genitores serão contatados na Clínica Privada - Origen (Centro de Medicina Reprodutiva), e provém de grupos de casais inférteis que buscam uma solução do problema na fertilização assistida.

O material será transferido para o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG. Todos os procedimentos experimentais serão realizados nesse local. Os embriões se tornarão inviáveis para posterior aplicação clínica ou outros estudos a partir do momento que a massa celular interna for retirada. Não haverá terapia celular na presente pesquisa.

A população envolvida no estudo é composta por casais inférteis, sem distinção de faixa etária, cor, classe e grupos sociais, não sendo realizada em grupos vulneráveis.

Para a obtenção de linhagens de CTEh, a pesquisa pretende utilizar 50 embriões, provenientes de aproximadamente 25 genitores. Informa-se que este n° está de acordo com a literatura científica internacional especializada (citam as referências), que utiliza 60 zigotos visando a obtenção de resultados confiáveis e precisos.

Serão utilizados na pesquisa, preferencialmente, os embriões geneticamente inviáveis, por envolver um menor risco psicológico para os genitores, visto que tais embriões possuem uma chance quase nula de implantação e desenvolvimento. Por estarem *in vitro* a fresco, representam ainda uma vantagem para o procedimento, pois não envolverá o processo de descongelamento rápido que pode minimizar as chances de sobrevivência embrionária ao processo e do estabelecimento das linhagens de células tronco embrionárias.

Caso o n° de embriões necessários não seja alcançado, serão então utilizados os criopreservados há 3 anos ou mais, que possuem uma chance mínima de implantação devido ao tempo de estocagem e processo de descongelamento. No entanto, por não terem uma anormalidade genética diagnosticada, pode representar um dilema psicológico para os genitores e, por isso, será realizado um acompanhamento mais intenso desses casais. A doação não será requisitada, e princípio. A proposta somente será apresentada no caso de os genitores procurarem a clínica buscando uma alternativa à estocagem dos embriões. Será esclarecido aos genitores que, além da opção dos embriões servirem à pesquisa, poderão ser mantidos em criopreservação ou transferidos ao útero, sendo-lhes explicado sobre os riscos de se implantar embriões alterados ou criopreservados há mais de três anos.

A pesquisa está prevista para ocorrer em um período de 24 meses.

ComentáriosO projeto em questão foi apresentado anteriormente a CONEP, tendo recebido Parecer nº 906/2007 com pendências a serem atendidas, mas que, por decurso de prazo

Corit Parecer CON6P N^o 452/2009.

a tal atendimento, foi arquivado. Os pesquisadores o reapresentam agora, procurando atender, em grande parte, as pendências do protocolo anterior.

A metodologia está adequada aos seus objetivos; o currículo do pesquisador o habilita para o estudo; o cronograma é adequado e o orçamento é apresentado de forma detalhada. Os ensaios anteriores, com a caracterização de células-tronco, foram apresentados e corroboram com a continuidade dos estudos de seleção e caracterização destas células bem como de sua viabilidade ao congelamento e descongelamento.

O estudo será realizado com base no artigo 5º da Lei de Biossegurança, N° 11.105 de 24 de março de 2005.

É informado que toda matéria obtida na pesquisa será utilizada unicamente na pesquisa em questão, não sendo posteriormente destinado para outros fins e garante-se que a identidade dos doadores será mantida em sigilo.

Com base no item II.8 da Resolução CNS 196/96, infirma que os riscos existentes na pesquisa caracterizam-se como de caráter espiritual, que poderá afetar os genitores, uma vez que os embriões, quando utilizados para pesquisa, não mais têm a chance de implantação e desenvolvimento. Levanta-se, também, a existência de risco psíquico e risco moral, em menor grau. O que será feito para minimizar tais riscos será a explicação, para os genitores, de todo processo a que será submetido o embrião, com informações essenciais para elucidar dúvidas e incertezas sobre a utilização dos embriões na pesquisa. Caso algum caso enfrente dificuldades em lidar com os fatos após a utilização de seus embriões, eles poderão contar, caso desejem, com apoio psicológico oferecido pela própria Clínica Origen. Informa-se, ainda, que as reuniões em que forem apresentadas a proposta de doação dos embriões e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, serão obrigatoriamente acompanhadas pela psicóloga da clínica.

Consta declaração de apoio institucional e do cumprimento das normas do Conselho Nacional de Saúde, assinada pelo Diretor Clínico da Clínica Origen e pelo Vice-Diretor do ICB/UFMG,

informa-se que será solicitada uma bolsa à Fapemig e ao CNPq para financiamento do projeto e que todos os materiais permanentes já existem -na Clínica Origen e/ou no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular da UFMG. Informa-se, ainda, que os materiais de consumo para o cultivo dos embriões e descongelamento serão fornecidos pela referida clínica, assim como para o isolamento e criopreservação das linhagens obtidas. Os demais materiais de consumo serão adquiridos, via laboratório da UFMG, com recursos do financiamento a ser obtido.

É informado no TCLE que os genitores serão mantidos a par dos progressos das pesquisas através de cartas informativas.

Considerações sobre a análise das respostas ao Parecer CONEP 042/2009, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Foi apresentada versão final do TCLE, com denominação correta, com data atualizada, atendendo os quesitos apresentados no Parecer CONEP 042/09 (Pendência 2).

2. E esclarecido, no TCLE, que o serviço de acolhimento psicológico oferecido pela Clínica Origen será gratuito, em consonância com o que prevê o item V.5 da Resolução CNS 196/96 (Pendência 3).
3. É informado, no TCLE, o direito dos sujeitos de pesquisa à indenização em caso de danos associados ao estudo, de acordo com o que prevêem os itens II.9, V.6 e V.7 da Resolução CNS 196/96 (Pendência 4).
4. No TCLE consta a informação de que as células-tronco da pesquisa serão congeladas, mantendo-se a confidencialidade, na Clínica Origen, por um período de 5 anos (Pendência 5).

Cont. Parecer CONEP Nº 452/2009.

5. É apresentada uma Declaração da Clínica Origen informando que todos os embriões criopreservados oriundos de tratamento de fertilização *in vitro* encontram-se cadastrados no Sistema Nacional de Produção de Embriões, inclusive aqueles destinados à pesquisa em tela (Pendência 6).

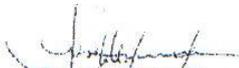
Os itens acima (1 a 5) foram atendidos. No entanto, observa-se que:

6. A cópia digital do protocolo da pesquisa não corresponde na íntegra, à cópia impressa. Solicita-se adequação (Pendência 1).

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima, antes do início do estudo.

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 16 de julho de 2009.


Gyselle Sadi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

