

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

**CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DO
LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E SUBMETIDAS AO
PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO**

PATRICIA CAROLINE ANGELO

Belo Horizonte

2010

PATRICIA CAROLINE ANGELO

**CARACTERIZAÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DO
LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO E SUBMETIDAS AO
PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Saúde da Mulher.

Área de Concentração: Perinatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alamanda Kfoury Pereira.

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina-UFMG**

2010

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, José João e Geralda,
pelo carinho, amor e apoio irrestrito
em todos os momentos de minha vida.

Ao meu noivo, Marcos,
por ter tomado os meus sonhos para si.

Aos meus irmãos, Camila e Henrique,
por estarem sempre ao meu lado.

À minha afilhada, Maria Júlia,
que na sua doçura infantil nos mostra
as coisas verdadeiramente importantes na vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente:

À Prof^a. Dr^a. Alamanda Kfoury, por ter acreditado neste trabalho e pela orientação precisa. Exemplo de retidão de caráter, ética, profissionalismo e profundo conhecimento científico.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral, pesquisador admirável, por ter me recebido no Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas (CEMEFE-HC), sempre pronto a incentivar.

À Dr^a. Ana Paula Brum, pela competência e sabedoria, sempre disposta a ajudar, minha grande admiração.

Ao Alessandro, pela eterna paciência em acompanhar todos os ritmos deste trabalho e pelo ensinamento constante e apoio em todos os momentos. Muito mais que um colaborador, um grande amigo.

Ao Frederico, meu grande parceiro e amigo, pela dedicação e comprometimento, sugerindo, incentivando e apoiando em todas as fases do projeto.

À Cristiane Saraiva, pela compreensão, estímulo e exemplo. Obrigada pela amizade, pelas conversas e dicas que por muitas vezes me trouxeram força e perseverança.

À Viviani, exemplo de generosidade e amizade verdadeira, pelo comprometimento e dedicação constante.

À Soraia, pelo apoio e dedicação em todas as fases desta pesquisa, pela amizade e companheirismo.

À Cristiane Maria, pela dedicação e amizade, sempre disposta a ajudar.

À amiga Dulce, pelos ensinamentos primordiais sobre cultivo celular.

Ao Prof. Eduardo Bampirra, pela colaboração nos ensaios de diferenciação celular, pelas sugestões e apoio essenciais.

À Daniele, do Setor de Anatomia Patológica do Instituto Hermes Pardini, pela colaboração essencial nos ensaios de diferenciação celular.

À Karina Braga, pela dedicação, sugestões e apoio incondicional em todas as fases desta pesquisa.

A toda a equipe do Setor de Citogenética do Instituto Hermes Pardini, pela amizade, apoio, paciência e incentivo. Cada um de vocês foi essencial para a elaboração desta dissertação.

A toda a equipe do Setor de Genética Humana do Instituto Hermes Pardini, pela colaboração nos ensaios de expressão gênica.

À equipe do Banco de Sangue de Cordão Criovida, pela colaboração nos procedimentos de criopreservação, sempre disponíveis e dispostos a ajudar.

À equipe de profissionais do Centro de Medicina Fetal do HC-UFMG, pelos ensinamentos e colaboração nas amniocenteses realizadas.

À equipe do Setor de Hematologia do Instituto Hermes Pardini, pela colaboração na imunofenotipagem.

Às gestantes envolvidas neste trabalho, que entenderam o nosso propósito e gentilmente cederam o material necessário.

Ao Dr. Victor Pardini, por ter acreditado nesta pesquisa.

Ao Instituto Hermes Pardini, pela colaboração e apoio financeiro.

A todos os meus familiares e amigos, que souberam estar presentes nesta fase, mesmo que por muitas vezes eu estivesse ausente.

E, finalmente, a todos que não tiveram seus nomes citados aqui, mas que estiveram presentes durante esta fase.

Muito Obrigada!

“... E quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas ...”

Luis Fernando Veríssimo.

RESUMO

Introdução: no contexto da terapia celular, a criopreservação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico humano é de acentuada importância clínica, uma vez que essas células podem ser colhidas ainda no período pré-natal e podem ser armazenadas para serem usadas em tratamentos posteriores. **Objetivos:** este estudo teve como objetivo caracterizar as células-tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico humano antes e após o processo de criopreservação, quanto à manutenção da sua capacidade de diferenciação multipotente, viabilidade e estabilidade cromossômica. **Metodologia:** foram incluídas nesta pesquisa amostras de 10 gestantes, as quais foram cultivadas, caracterizadas e submetidas à criopreservação por 150 dias. Para a caracterização celular, foram realizados ensaios de citometria de fluxo para determinar o perfil imunofenotípico das células cultivadas; diferenciação celular; determinação do cariótipo e viabilidade celular. Para verificação da manutenção das características celulares após criopreservação, as células foram descongeladas e, então, foram feitos novamente os ensaios de viabilidade celular, cultura, diferenciação celular e cariótipo. Com o intuito de verificar interferências da criopreservação sobre a expressão do gene associado à pluripotência, *octamer 4* (OCT-4), foi quantificada a expressão desse gene antes e após criopreservação. **Resultados:** a caracterização dessas células demonstrou que aquelas cultivadas do líquido amniótico humano apresentam morfologia e perfil imunofenotípico característico das células-tronco mesenquimais e, além disso, têm a capacidade de diferenciação em células da linhagem mesodermal. Ainda, o estudo demonstrou que, a partir de técnicas de criobiologia, essas células podem ser criopreservadas durante pelo menos cinco meses e serem recuperadas após esse período, mantendo sua capacidade de crescimento *in vitro* e de diferenciação e mantendo, ainda, a expressão do gene OCT-4, indicando, assim, a manutenção de sua característica de célula-tronco. Além disto, a análise cariotípica dessas células indicou que tanto a cultura quanto a criopreservação não induziram surgimento de aberrações cromossômicas, fato importante para uma possível utilização terapêutica. **Conclusão:** este trabalho concluiu que a técnica de criopreservação de células do líquido amniótico pode ser ferramenta extremamente útil na manutenção da capacidade das células-tronco multipotentes recolhidas durante a gravidez.

Palavras-chave: Criopreservação. Células-tronco mesenquimais. Células tronco multipotentes. Líquido amniótico.

ABSTRACT

Introduction: in the cell therapy context, cryopreservation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid has a great clinical importance since these cells can be harvested even in the prenatal period and can be stored for use in future treatments. **Objectives:** This study aimed to characterize the mesenchymal stem cells cultured from human amniotic fluid before and after the cryopreservation process, as to maintain their multipotent differentiation capacity, viability and chromosomal stability. **Methodology:** The study included samples from 10 pregnant women, which were grown, characterized and subjected to cryopreservation for 150 days. For the cellular characterization, flow cytometry tests were performed to determine the immunophenotypic profile of cultured cells, cell differentiation, karyotype determination and cell viability. To check the maintenance of cell characteristics after cryopreservation, the cells were thawed and then tests of cell viability, culture, cell differentiation and karyotype were performed again. In order to verify the interference of cryopreservation on the gene expression associated with pluripotency, octamer 4 (OCT-4) this gene expression was quantified before and after cryopreservation. **Results:** These cells characterization showed that those cells grown from human amniotic fluid present morphology and immunophenotypic profile characteristic of mesenchymal stem cells and also have the ability to differentiate into cells of mesodermal lineage. The study also showed that from criobiology techniques, these cells can be cryopreserved for at least five months and be recovered after this period, maintaining its ability to in vitro growth and differentiation and still maintaining OCT-4 gene expression, thereby indicating the maintenance of its characteristic of stem cell. Moreover, these cells karyotype analysis indicated that both culture and cryopreservation did not induce the appearance of chromosomal aberrations, which is important for a possible therapeutic use. **Conclusion:** This study concluded that the cryopreservation technique of cells from amniotic fluid can be an extremely useful tool in maintaining the capacity of multipotent stem cells collected during pregnancy.

Keywords: Cryopreservation. Mesenchymal Stem Cells. Multipotent Stem Cells. Amniotic Fluid

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| 7 AAD | <i>7-Amino-actinomycin D</i> |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromol |
| CD | <i>Cluster differentiation</i> |
| cDNA | <i>Complementary desoxiribonucleic acid</i> |
| CEMEFE | Centro de Medicina Fetal |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CTA | Células-tronco adultas |
| CTE | Células-tronco embrionárias |
| CTH | Células-tronco hematopoiéticas |
| CTM | Células-tronco mesenquimais |
| DMEM | <i>Minimum essential medium eagle - Dulbecco modification</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EDTA | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> |
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| FSC | <i>Forward side scatter</i> |
| g | Gramma |
| GAPDH | <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| HC | Hospital das Clínicas |
| HLA | Antígeno leucocitário humano |
| ISCN | <i>International system for human cytogenetic nomenclature</i> |
| MCI | Massa celular interna |
| mg | Miligrama |
| MHC | <i>Histocompatibility complex</i> |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimol |
| NANOG | <i>Nanog homeobox</i> |
| ng | Nanograma |
| nM | Nanomol |

| | |
|------------------|--|
| OCT-4 | <i>Octamer 4</i> |
| PAS-AB | <i>Periodic Acid Schiff -Alcian Blue</i> |
| RT-PCR | <i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i> |
| PE | <i>Phicoeritin</i> |
| PECy5 | <i>Phicoeritin ligada ao Cy5</i> |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| rpm | Rotação por minuto |
| SOX-2 | <i>Sex determining region Y-2</i> |
| SSC | <i>Side scatter</i> |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| USA | <i>United States of America</i> |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 Origem e classificação das células-tronco ao longo do desenvolvimento embrionário..... | 21 |
| FIGURA 2 Possíveis explicações para a plasticidade celular das células-tronco adultas..... | 26 |
| FIGURA 3 Diagrama ilustrando o procedimento de amniocentese..... | 30 |
| FIGURA 4 Cultura de células do paciente 1 após o início da cultura..... | 59 |
| FIGURA 5 Cultura de células do paciente 1 após três passagens celulares e dois dias após o reinício da cultura..... | 61 |
| FIGURA 6 Cultura de células do paciente 1 após 150 dias de criopreservação..... | 63 |
| FIGURA 7 Cariótipos pacientes 1,2 e 5 antes e após a criopreservação..... | 64 |
| FIGURA 8 Cultura de células do paciente 1 após cinco dias de indução adipogênica..... | 66 |
| FIGURA 9 Cultura de células do paciente 1 sem e com indução corada por <i>oil red O</i> | 66 |
| FIGURA 10 Cultura de células do paciente 1 antes e 150 dias após a criopreservação..... | 67 |
| FIGURA 11 Cultura de células do paciente 1, com e sem indução à diferenciação condrogênica..... | 68 |
| FIGURA 12 Cultura de células do paciente 2 antes e 150 dias após a criopreservação..... | 68 |
| FIGURA 13 Cultura de células do paciente 1, negativa e positiva para coloração <i>von kossa</i> | 69 |
| FIGURA 14 Cultura de células do paciente 2 antes e 150 dias após a criopreservação induzida à diferenciação osteogênica..... | 70 |
| FIGURA 15 Gráficos representando a expressão gênica de OCT4 para as nove amostras em que foi obtida a amplificação..... | 71 |
| FIGURA 16 <i>Dot plotting</i> da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando características de expressão dos antígenos de superfície dessas células..... | 73 |
| FIGURA 17 <i>Dot plotting</i> da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando | |

| | |
|---|----|
| características de expressão dos antígenos de superfície dessas células..... | 74 |
| FIGURA 18 <i>Dot plotting</i> da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando características de expressão dos antígenos de superfície dessas células..... | 75 |
| Gráficos | |
| GRÁFICO 1 Número de dias para que as células adquirissem 80% de confluência após as passagens celulares 1, 2 e 3..... | 60 |
| GRÁFICO 2 Distribuição da viabilidade celular pré-criopreservação e após 150 dias de criopreservação..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 Viabilidade celular em porcentagem das culturas dos pacientes 1 a 10 nos diferentes tempos de criopreservação..... | 62 |
|---|----|

SUMÁRIO¹

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 19 |
| 2.1 Células-tronco: definição e classificação..... | 20 |
| 2.2 Células-tronco embrionárias..... | 22 |
| 2.3 Células-tronco adultas..... | 24 |
| 2.3.1 Células-tronco hematopoiéticas..... | 26 |
| 2.3.2 Células-tronco mesenquimais..... | 27 |

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

| | |
|--|----|
| 2.4 O Líquido amniótico..... | 29 |
| 2.5 Criopreservação..... | 34 |
| 3 OBJETIVOS..... | 39 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 40 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 40 |
| 4 METODOLOGIA..... | 41 |
| 4.1 Obtenção das amostras..... | 42 |
| 4.2 Cultura primária..... | 43 |
| 4.3 Passagens celulares..... | 44 |
| 4.4 Criopreservação..... | 45 |
| 4.5 Descongelamento..... | 46 |
| 4.6 Cultura após criopreservação..... | 47 |
| 4.7 Contagem celular em hemocitômetro e análise de viabilidade celular.. | 48 |
| 4.8 Cariótipo..... | 48 |
| 4.9 Diferenciação..... | 49 |
| 4.9.1 Diferenciação adipogênica..... | 50 |
| 4.9.2 Diferenciação condrogênica..... | 50 |
| 4.9.3 Diferenciação osteogênica..... | 50 |
| 4.10 Coloração das lâminas induzidas à diferenciação..... | 51 |
| 4.10.1 Coloração <i>oil red</i> | 51 |
| 4.10.2 Coloração PAS-AB..... | 52 |
| 4.10.3 Coloração <i>von kossa</i> | 52 |
| 4.11 Imunofenotipagem e expressão gênica..... | 53 |
| 4.11.1 Imunofenotipagem..... | 53 |
| 4.11.2 Expressão gênica..... | 54 |
| 4.11.2.1 Extração de RNA..... | 54 |
| 4.11.2.2 Quantificação da expressão de OCT-4..... | 55 |
| 4.12 Preparo de soluções..... | 56 |
| 4.13 Análise estatística..... | 57 |
| 5 RESULTADOS..... | 58 |
| 5.1 Isolamento e cultura das células do líquido amniótico humano..... | 59 |
| 5.2 Passagens celulares..... | 60 |
| 5.3 Viabilidade celular..... | 61 |
| 5.4 Cultura das células do líquido amniótico humano após criopreservação..... | 62 |
| 5.5 Cariótipo..... | 63 |
| 5.6 Capacidade de diferenciação celular..... | 65 |
| 5.6.1 Diferenciação adipogênica..... | 65 |
| 5.6.2 Diferenciação condrogênica..... | 67 |
| 5.6.3 Diferenciação osteogênica..... | 69 |
| 5.7 Expressão gênica OCT-4: quantificação relativa..... | 70 |
| 5.8 Imunofenotipagem..... | 72 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 76 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 86 |

| | |
|------------------|-----|
| REFERÊNCIAS..... | 89 |
| APÊNDICE..... | 103 |
| ANEXOS..... | 108 |

1 INTRODUÇÃO

Até recentemente, a terapia celular era restrita ao tratamento de doenças hematológicas, onco-hematológicas e autoimunes graves sem opções de cura, utilizando-se as células-tronco hematopoiéticas. Com os novos conhecimentos sobre a plasticidade das células-tronco adultas, células-tronco não-hematopoiéticas, como as células-tronco mesenquimais, passaram a ser alvo do emprego na terapia celular.

No contexto da Medicina fetal, pode-se considerar que a contribuição desse setor da obstetrícia é muito mais expressiva na prevenção e no diagnóstico de alterações do desenvolvimento fetal do que em seu tratamento. Métodos inovadores para o tratamento de doenças no ambiente intraútero são perseguidos e um deles é, sem dúvida, a terapia celular. Nessa proposta de tratamento, as células-tronco do líquido amniótico são a principal alternativa da atualidade, entretanto, pesquisas em terapia celular para o feto são escassas no Brasil e no mundo. Tendo em vista essa escassez de métodos terapêuticos de base celular para o feto, surgiu o estímulo para o estudo de uma das opções celulares para este fim.

O Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG conta com condições técnicas favoráveis, desde a disponibilidade de amostras para estudo, obtidas através da amniocentese propedêutica ou terapêutica, até uma equipe de profissionais altamente qualificados, referência no âmbito nacional. Além disso, a disponibilidade do Instituto Hermes Pardini para realização dos ensaios em suas dependências veio acrescentar o estabelecimento e execução das metodologias adequadas aos propósitos do presente estudo.

Alinhado ao empenho atual de se estabelecerem novas fontes celulares para a utilização em terapia celular e do grande interesse dos profissionais da Medicina Fetal nesta área, surgiu a possibilidade de estudar as células-tronco mesenquimais do líquido amniótico humano como alternativa para esses interesses.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-tronco: definição e classificação

Desde a exposição de populações civis a doses letais de irradiação durante a Segunda Guerra Mundial, vários trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de utilizar células-tronco no tratamento de doenças, a chamada terapia celular (KELLY *et al.*, 1997; MORALES, 2007; NATHASON, 1985; TILL; McCULLOCH, 1961; WEISS *et al.*, 2006).

As células-tronco são células não-especializadas, com a capacidade de autorrenovação e manutenção do seu número populacional durante toda a vida de um organismo (DEANS; MOSELEY, 2000; KIM *et al.*, 2007; MINGUELL; ERICS; GONGET, 2001; WAGERS; WEISSMAN, 2004). Sob influência de sinais biológicos específicos, elas podem diferenciar-se em células especializadas as quais são fenotipicamente distintas de suas precursoras (KIM *et al.*, 2007; MINGUELL; ERICS; GONGET, 2001).

Embora as células-tronco sejam capazes de dar origem a células diferenciadas, existem divergências relacionadas à sua plasticidade. Sob este aspecto pode-se classificá-las em totipotente, pluripotente, multipotente e unipotentes (CHAN; O'DONOGHUE; FISK, 2006; MORALES, 2007).

Em vertebrados, o zigoto é a célula-tronco totipotente, capaz de gerar todas as células do organismo, inclusive as da placenta. Após quatro a cinco dias da fecundação, ocorre a formação do blastocisto, composto de uma camada celular delgada externa, denominada trofoblasto, e um grupo de células de localização central, denominado massa celular interna (MCI). No blastocisto, o trofoblasto dá origem à placenta e a MCI ao embrião (ALVES; CRUZ, 2007; CHAN; O'DONOGHUE; FISK, 2006; MOORE; PERSAUD, 2000; MORALES, 2007). A partir da MCI são obtidas as chamadas células-tronco embrionárias (CTE), denominadas pluripotentes, capazes de gerar células dos três folhetos embrionários (FIG. 1): endoderma, mesoderma e ectoderma, porém incapazes de formar células trofoblásticas (CHAN; O'DONOGHUE; FISK, 2006; MORALES, 2007).

Durante o desenvolvimento, as três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma) participam da formação de tecidos e da organogênese (ALVES; CRUZ, 2007; MOORE; PERSAUD, 2000). Acredita-se que essa

formação seja orientada por células específicas de cada tecido (CHAN; O'DONOGHUE; FISK, 2006; MORALES, 2007).

Essas células das três camadas germinativas, denominadas multipotentes, estão presentes durante a vida embrionária e podem gerar vários tipos celulares do tecido no qual residem. Em alguns tecidos essas células permanecem no organismo adulto, onde participam da regeneração e do reparo tecidual (BLANPAIN; FUCHS, 2006; GIANGRECO; REYNOLDS; STRIPP, 2002; HONG *et al.*, 2004; KORBLING; ESTROV, 2003; MORALES, 2007; VELIN *et al.* 2005).

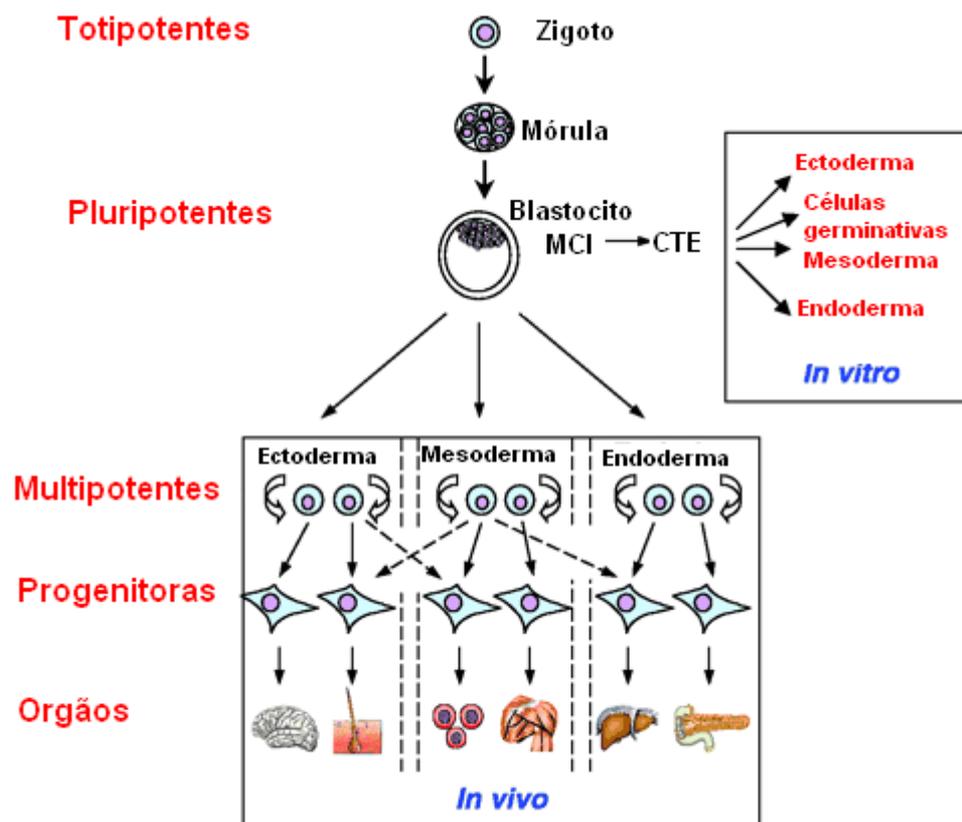


FIGURA 1 - Origem e classificação das células-tronco ao longo do desenvolvimento embrionário.

Fonte: Adaptado de Wobus e Boheler (2005).

Desta forma, as células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE), se isoladas da MCI do blastocisto; e em células-tronco adultas (CTA), se isoladas de outros tecidos (KIM *et al.*, 2007). Baseado no tempo de isolamento durante o desenvolvimento do organismo, podem ser classificadas

em três categorias: embrionárias, fetais e adultas (GUILLOT *et al.*, 2007; MARCUS; WOODBURY, 2008).

Fica evidente que as células-tronco constituem uma importante ferramenta para o estudo da biologia do desenvolvimento (LENSCH *et al.*, 2007), no entanto, por se tratar de estudos recentes, também é notável a falta de conhecimento básico sobre a manipulação e diferenciação dessas células. Assim, é oportuno investir no estudo de todos os tipos de células-tronco, até que seja determinada a capacidade terapêutica e de diferenciação de cada uma delas (CHEN; HILCOVE; DING, 2006; MARCUS; WOODBURY, 2008).

2.2 Células-tronco embrionárias

A primeira linhagem de CTE foi desenvolvida em 1998 pelo pesquisador americano James Thomson. Essas células mantinham-se indiferenciadas em cultura e formavam teratomas com células de todos os folhetos embrionários quando injetadas em camundongos imunodeficientes, o que demonstrava sua pluripotencialidade (THOMSON *et al.*, 1998).

Sob condições ideais de cultivo, as CTEs propagam-se indefinidamente, como enormes colônias indiferenciadas de bordas bem definidas e ainda mantêm sua capacidade de diferenciação em tecidos somáticos (DINGER *et al.*, 2008; NISTOR *et al.*, 2005; REUBINOFF *et al.*, 2000; ROSLER *et al.*, 2004).

A regulação da capacidade de autorrenovação dessas células é feita por genes cujos produtos interferem na própria expressão gênica da célula (ROOBROUCK; ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE, 2008). Esses genes expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, frequentemente descritos como marcadores de células-tronco embrionárias, embora não exclusivos destas, são:

- Os genes da família SOX: mais de 11 já descritos, embora neste contexto o mais importante seja o SOX2, que codifica uma proteína não-histônica capaz de se ligar ao ácido desoxirribonucleico (DNA), influenciando a expressão de determinados genes.

- O gene OCT-4, cujo produto participa da formação da mórula com desenvolvimento da massa interna, que é pluripotente, e da formação do epiblasto pluripotente e do ectoderma primitivo.
- E, finalmente, o gene NANOG, cujo produto atua principalmente mantendo a capacidade de autorrenovação dessas células e seu estado indiferenciado (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006; DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006; PRIOR; WALTER, 1996).

A via de controle transcricional da célula-tronco embrionária está relacionada com a sua capacidade de autorrenovação *versus* diferenciação. Estes dois *status* são considerados opostos, sendo que quando os fatores de transcrição *octamer 4* (OCT-4), *sex determining region Y-2* (SOX2) e *nanog homeobox* (NANOG) estão ativos, os genes de renovação (*self-renew*) estão ligados; e quando esses fatores de transcrição estão reprimidos, os genes responsáveis pela diferenciação é que estão ligados (BOYER *et al.*, 2005; CHEW *et al.*, 2005; CHICKARMANE *et al.*, 2006; GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007; IVANOVA *et al.*, 2006; LOH *et al.*, 2006). Esse controle permite que as células-tronco se multipliquem, podendo ser cultivadas nesse estado, conservando, assim, sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos de tecidos. Os fatores de transcrição OCT-4 e SOX2, na maioria dos casos, funcionam de forma cooperativa, tendo sido encontrados sítios de ligação OCT-SOX em diversos genes relacionados com a renovação celular e diferenciação (CHEW *et al.*, 2005). O fator NANOG também participa dessa via, ativando a transcrição de OCT-4, SOX2 e dele mesmo (CHICKARMANE *et al.*, 2006). Esses fatores de transcrição são considerados os principais responsáveis pela decisão do destino dessas células (BOYER *et al.*, 2005; IVANOVA *et al.*, 2006; LOH *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços das pesquisas com células-tronco embrionárias, questões de segurança relacionadas à possibilidade dessas células formarem tumores *in vivo* e a ocorrência de instabilidades cromossômicas ainda impedem seu uso terapêutico (BLUM; BENVENISTY, 2008; CARPENTER *et al.*, 2004; DRAPER *et al.*, 2004). Além disto, em muitos países existem algumas repressões por considerações éticas e sociais quanto ao uso dessas células para pesquisa ou abordagens terapêuticas (DENKER, 2006).

Entretanto, as CTEs são consideradas fontes promissoras de material para transplante e terapia celular, devido ao seu significativo potencial de diferenciação (KEHAT *et al.*, 2004; KEIRSTEAD *et al.*, 2005; JUN; YOON, 2005; PASSIER *et al.*, 2005). Desta forma, antes de sua aplicação clínica, é necessário que sejam conhecidos seus mecanismos de controle proliferativo e de diferenciação específica (MORALES, 2007).

2.3 Células-tronco adultas

Além das células-tronco embrionárias, tem sido investigado o potencial terapêutico de células-tronco obtidas de tecidos fetais ou perinatais e tecidos adultos (BAKSH; YAO; TUAN, 2007; CAMPAGNOLLI *et al.*, 2001; GUILLOT *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIIRNOV, 2003; TSAI *et al.*, 2004; YOON *et al.*, 2005; WEISS *et al.*, 2006).

O uso dessas células para pesquisa ou terapias é menos controverso. Elas são fonte potencial de obtenção de tecidos autólogos para transplante, embora seu potencial de diferenciação seja limitado quando comparado ao das células-tronco embrionárias (KIM *et al.*, 2007).

As células-tronco adultas (CTA) são responsáveis pela geração de células especializadas durante os processos de crescimento, diferenciação tecidual, renovação celular e reparo tecidual ao longo da vida. Também chamadas de células somáticas, possuem a capacidade de autorrenovação, o que garante um estoque de células indiferenciadas no tecido no qual residem (GAMOUD; BLUNDELL, 2007; THE NATIONAL INSTITUTES HEALTH RESOURCE FOR STEM CELL RESEARCH, 2006).

Por um longo tempo, as CTA foram consideradas capazes de originar linhagens celulares específicas dos tecidos nos quais residiam, entretanto, vários trabalhos têm demonstrado que algumas células-tronco adultas, além de originarem células características do tecido no qual residem, podem também dar origem a um conjunto de progenitores de outros tecidos (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001, MINGUELL; ERICS; GONGEL, 2001; MONTZKA *et al.*, 2009; PETERSEN *et al.*, 1999; YOON *et al.*, 2005; TSAI *et al.*, 2006).

Parece que, além da sua habilidade de se dividir e dar origem a células distintas, as CTA exibem alto grau de plasticidade (BIANCO *et al.*, 2001; MINGUELL; ERICS; GONGEL, 2001; MIKI *et al.*, 2005).

Experimentos *in vivo* demonstram a plasticidade por meio de modelos de lesão induzida e observação da migração e diferenciação das células-tronco adultas para as áreas lesadas, regenerando essas regiões (DAI *et al.*, 2008; HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; LIN *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2005). Quatro hipóteses são propostas para explicar a plasticidade observada em experimentos *in vivo*.

A primeira delas é atribuída às células-tronco específicas de determinado tecido, que poderiam estar presentes em diferentes órgãos, como, por exemplo, a presença de células-tronco hematopoiéticas originadas da medula óssea em tecido muscular ou placentar (BÁRCENA *et al.*, 2009; KAWADA; OGAWA, 2001; McKINNEY-FREEMAN *et al.*, 2002; VERFAILLIE, 2002).

Uma segunda explicação seria a permanência de células-tronco multipotentes ou pluripotentes em tecidos adultos (FIG. 2-A) (JIANG *et al.*, 2002; VERFAILLIE, 2002).

Há, ainda, a possibilidade de uma célula diferenciada sofrer reprogramação genética e submeter-se à “transdiferenciação” indireta (FIG. 2-B), fenômeno no qual ela se “desdiferencia” e, em seguida, “rediferencia-se” em outro tipo celular diverso do inicial ou a “transdiferenciação” direta (FIG. 2-C), no qual a célula diferenciada se diversifica em um outro tipo celular em forma e função (HAKELIEN *et al.*, 2002; HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; SHEN; SLACK; TOSH, 2000; TANG *et al.*, 2001; VERFAILLIE, 2002;).

Um mecanismo alternativo seria a fusão celular de uma célula-tronco adulta com uma célula diferenciada, o que converteria o padrão da célula-tronco no padrão da célula diferenciada (FIG. 2-D). Entretanto, experimentos *in vitro* têm demonstrado que este parece ser um evento bastante raro (HERZOG; CHAI; KRAUSE, 2003; JIANG *et al.*, 2002; TERADA *et al.*, 2002; VERFAILLIE, 2002; YING *et al.*, 2002).

MECANISMOS PROPOSTOS PARA PLASTICIDADE DE CÉLULAS TRONCO ADULTAS

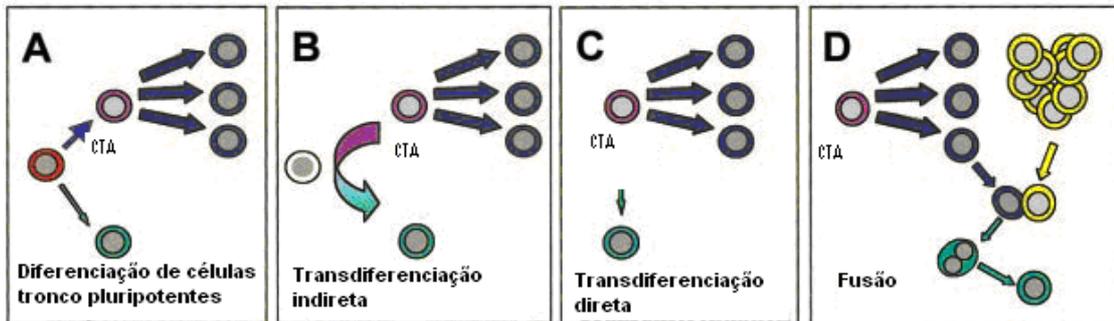


FIGURA 2 - Possíveis explicações para a plasticidade das células-tronco adultas.

A- Permanência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos; B- “Transdiferenciação” indireta; C- “Transdiferenciação” direta; D- Fusão celular.

Fonte: Adaptado de Herzog, Chai e Krause (2003).

A falta de consenso na literatura envolve o fato de que os dados coletados são geralmente baseados em características morfológicas e ensaios imunohistoquímicos, o que pode ser insuficiente para concluir que essas células irão se integrar funcionalmente nos tecidos. Segundo Grove, Bruscia e Krause (2004) e Verfaille (2002), sem a prova funcional *in vivo* não se pode concluir que essas células são efetivamente plásticas (GROVE; BRUSCIA; KRAUSE, 2004; VERFAILE, 2002).

Pelo fato de não possuírem marcadores únicos, são frequentemente definidas pela sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em pelo menos um tipo de célula especializada e pelo tipo de crescimento em cultura, seja ela aderente, na qual as células se multiplicam sobre uma superfície plástica, ou cultura em suspensão (MEIRELLES; KAPLAN; NARDIA, 2008).

Podem ser categorizadas em dois seguimentos principais: hematopoiéticas e mesenquimais (SCHUSTER *et al.*, 2008).

2.3.1 Células-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são uma população de células capazes de se autorrenovar e produzir células genitoras capazes de dar origem a

todos os tipos de células sanguíneas (BÁRCENA *et al.*, 2009; BLOMBERG *et al.*, 1998; GROVE; BRUSCIA; KRAUSE, 2004).

O transplante autólogo e alogênico de CTH já é uma prática consagrada no tratamento efetivo de doenças hematológicas (GROTTO; NORONHA, 2003; SILVA; MACEDO, 2006). No entanto, os tecidos hematopoiéticos, como a medula óssea e o sangue de cordão umbilical, são constituídos por uma população heterogênea de células-tronco, incluindo outros tipos celulares que não o hematopoiético. Desta forma, as células-tronco originárias do tecido hematopoiético não são somente CTH (ANGELI; OLIVEIRA, 2007). Além das células-tronco hematopoiéticas, organismos adultos possuem células denominadas células-tronco mesenquimais (KOÇ; LAZARUS, 2001; MINGUELL; ERICS; GONGEL, 2000, 2001; SCHOEBERLEIN *et al.*, 2005).

2.3.2 Células-tronco mesenquimais

Por definição, as células-tronco mesenquimais (CTM) são as que têm morfologia semelhante a fibroblasto, capazes de autorrenovar-se e diferenciar-se em no mínimo três tecidos da linhagem mesodermal (LEE, O. *et al.*, 2004). Foram isoladas e caracterizadas pela primeira vez por Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina (1970), pela sua capacidade de formar colônias aderentes com células em formato de espícula, semelhantes morfologicamente a fibroblastos (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970).

Essas células proliferam, formam colônias e são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, tais como osteoblastos, condroblastos e adipócitos (BAKSH; YAO; TUAN, 2007; BIANCO *et al.*, 2001; KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIIRNOV, 2003; SUDO *et al.*, 2007). Além disso, alguns trabalhos vêm demonstrando que as células-tronco mesenquimais se diferenciam *in vitro*, sob sinais específicos, em outros tipos celulares, como neurônios, hepatócitos, cardiomiócitos, células do músculo liso e do músculo esquelético, compreendendo células características dos três folhetos embrionários (BIANCO *et al.*, 2001; GALMICHE *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 2007; KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999; LEE, K. *et al.*, 2004; MAKINO *et al.*, 1999; PITTENGER *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2005).

Essa pluripotencialidade foi demonstrada por Jiang *et al.* (2002), que salientaram que CTM isoladas da medula óssea geraram células dos três folhetos germinativos quando injetadas em embriões de camundongos posteriormente implantados, sendo que a fusão celular foi excluída, sugerindo a permanência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos (JIANG *et al.*, 2002). As CTM da medula óssea têm, ainda, a capacidade de gerar células da linhagem germinativa e, quando transplantadas, restauram a produção de oócitos em ratos do tipo selvagem esterilizados pela quimioterapia (JOHNSON *et al.*, 2005).

A pluripotencialidade também foi enfatizada em uma população de células aderentes do sangue de cordão placentário humano a partir da diferenciação em células do tecido ósseo, cartilaginoso, hematopoiéticas, neurais, fígado e tecido cardíaco *in vivo*, em vários modelos animais (KOGLER *et al.*, 2004).

O interesse no estudo das CTM vem crescendo exponencialmente nos últimos anos devido ao seu alto potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados e sua capacidade de autorrenovação, mantendo a capacidade de diferenciação, como vem sendo demonstrado em inúmeros estudos clínicos e pré-clínicos (HALE *et al.*, 2008; HORWITZ *et al.*, 1999; KOC *et al.*, 2002; MURPHY *et al.*, 2003; MUSCHLER *et al.*, 2003; ORLIC *et al.*, 2001).

Essa autorrenovação celular é um processo muito importante para a manutenção da pluripotência das células-tronco, pois confere a algumas células a capacidade de se dividir mantendo seu estado indiferenciado (XI; XIE, 2005). Apesar dos genes NANOG, SOX2 e OCT-4 serem frequentemente descritos como marcadores de células-tronco embrionárias e responsáveis pela regulação da capacidade de autorrenovação dessas células, sua expressão também é observada nas células-tronco mesenquimais, com similaridades de ação regulatória nos dois tipos celulares (GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007; PRUSA *et al.*, 2003). Vale ressaltar que esses fatores de pluripotência, NANOG, OCT-4 e SOX2, exercem papel essencial, bloqueando genes que, na ausência dos transcritos, desencadeariam diferenciação (BOYER *et al.*, 2005; TAKAHASHI *et al.*, 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

O alto potencial de diferenciação das CTMs, seu fácil isolamento e cultura, bem como seu alto potencial de expansão *ex vivo* fazem dessas células uma ferramenta terapêutica atrativa capaz de ampla variedade de aplicações clínicas no contexto da terapia gênica e celular. Portanto, faz-se necessário conhecer as

fontes dessas células no corpo humano (KOÇ; LAZARUS, 2001; MINGUELL; ERICS; GONGEL, 2000, 2001; SCHOEBERLEIN *et al.*, 2005).

Embora a medula óssea sirva como reservatório primário para CTM, sua presença tem sido relatada em uma variedade de outros tecidos, incluindo tecido conectivo muscular, medula óssea fetal, fígado e sangue (CAMPAGNOLI *et al.*, 2001; FIBBE, 2002), sendo que em alguns tecidos adultos, como a própria medula óssea e o sangue de cordão umbilical a termo, essas células estão presentes em baixo número (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; CASTRO-MALASPINA *et al.*, 1980; JONES; MCGONAGLE, 2008; SECCO *et al.*, 2008).

Recentes observações em culturas de células de líquido amniótico e em células epiteliais amnióticas fornecem evidências de que elas podem representar novas fontes para seu isolamento, com o potencial de diferenciarem-se em variados tipos celulares (KARLMARK *et al.*, 2005; MIKI *et al.*, 2005; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002).

Embora as características das CTMs de diferentes tecidos pareçam ser semelhantes, já foram demonstradas algumas propriedades diferentes entre elas, o que pode ter implicações na seleção do tipo de célula-tronco para aplicação terapêutica (KERN *et al.*, 2006). Desta forma, é interessante que sejam estudadas as características de células provenientes de diversos tecidos quando se pensa na sua inclusão em terapia celular.

2.4 O líquido amniótico

A amniocentese é um procedimento frequentemente utilizado para diagnóstico pré-natal. Desde sua introdução, tem se submetido a numerosos refinamentos, na tentativa de minimizarem-se os riscos do procedimento e maximizar-se a taxa de sucesso para obtenção da amostra. Inicialmente executada como um procedimento “cego” (sem guia de ultrassom), a taxa de falha para obtenção da amostra e a taxa de complicação do procedimento eram significantes. Entretanto, com o advento do ultrassom, para visibilizar todo o procedimento em tempo real, a taxa de segurança e sucesso para executar amniocentese tem melhorado substancialmente (BENACERRAF; FRIGOLETO, 1983; DONNENFELD; LAMB, 2003; SHULMAN; ELIAS, 1993; WILLIAMSON;

VARNER; GRANT, 1985). A amniocentese convencional é executada a partir da 15ª semana de gestação, sendo que o risco acarretado pelo procedimento é de 0,5% (MAGALHÃES, 2000).

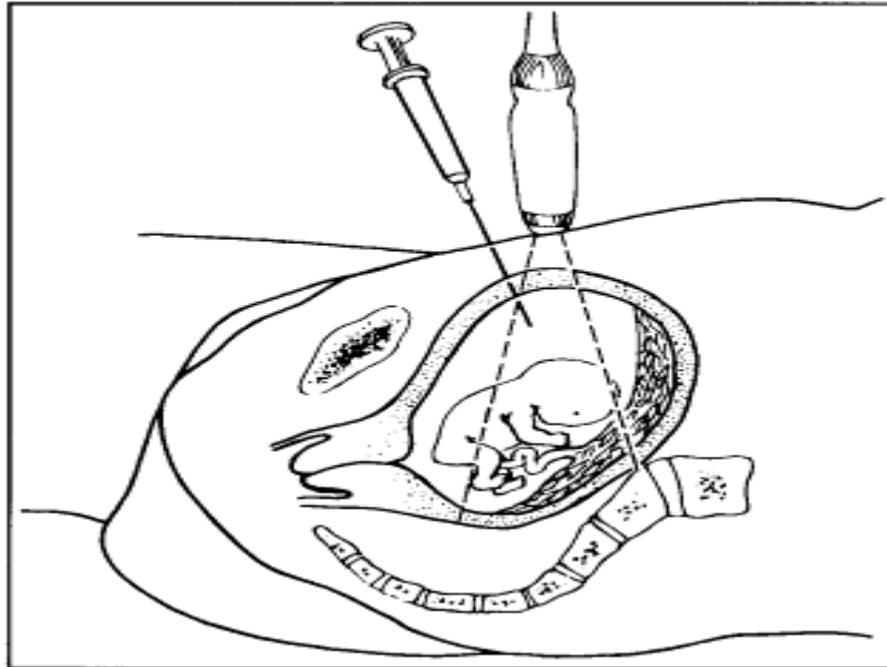


FIGURA 3 - Diagrama ilustrando o procedimento de amniocentese.
Fonte: Shulman e Elias (1993).

Os principais componentes presentes no líquido amniótico estão em suspensão e em dissolução. Entre os elementos em suspensão, encontram-se células esfoliadas do âmnio, principalmente do feto, assim como lanugem e gotículas de gordura. Como elementos de dissolução, são descritas substâncias orgânicas e inorgânicas. Os eletrólitos representam as substâncias inorgânicas e entre os compostos orgânicos estão as proteínas, os aminoácidos, a alfa-feto-proteína, as substâncias nitrogenadas não-proteicas, os lipídios, carboidratos, vitaminas, enzimas, bilirrubina, hormônios e as prostaglandinas (BRACE, 1997; CAMPANA; CHAVES; HAAS, 2003).

As células do líquido amniótico são usadas para uma série de estudos, seja genético, cromossômico ou bioquímico, para diagnóstico pré-natal de ampla escala de anormalidades fetais. Embora diagnósticos de rotina usando essas células estejam bem estabelecidos e extensivamente usados, pouco se sabe sobre a origem e propriedade dessas células (DISTECHE *et al.*, 1984; GUICHET;

BRIAULT; MORAINÉ, 1998; QU *et al.*, 2005). Até mesmo em casos de gravidezes com desenvolvimento fetal normal, as células no líquido amniótico são heterogêneas, variando em relação ao tamanho (5 a 50 µm) e quanto à forma (escamosas a arredondadas). A ampla variedade de investigações executadas desde 1982 tem fornecido evidências de que células das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), dependendo da idade gestacional e da doença fetal, podem ser detectadas no líquido amniótico humano (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; DE COPPI *et al.*, 2007; GOSDEN, 1983; HOEHN; SALK, 1982; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002).

A maior parte das células, porém, está diferenciada em linhagens epiteliais, possuindo capacidade proliferativa e de diferenciação muito limitada (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). A detecção de células progenitoras no líquido amniótico humano foi inicialmente relatada por Torricelli *et al.* (1993), quando células pequenas e arredondadas, identificadas como genitoras hematopoiéticas, foram encontradas antes da 12^a semana de gestação (TORRICELLI *et al.*, 1993). Em 1996, Streubel *et al.* (1996) sugeriram a presença de linhagens não-hematopoiéticas no líquido amniótico e demonstraram a capacidade de diferenciação miogênica dessas células (STREUBEL *et al.*, 1996). Está claro que a maioria das células do líquido amniótico é incapaz de proliferar sob condições de cultura usadas na rotina do diagnóstico laboratorial pré-natal (GOSDEN, 1983; HOEHN; SALK, 1982; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002). No entanto, muitas dessas células são viáveis, como pode ser concluído pelo teste de exclusão azul-tripán (COUSINEAU *et al.*, 2005; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002).

Diversas origens foram sugeridas para essa variedade de células presentes no líquido amniótico. Durante a gestação, ocorre liberação de vários tipos celulares diferentes provenientes do ectoderma, do mesoderma e do endoderma, dependendo principalmente da idade gestacional ou de doenças fetais. Alguns autores sugerem a origem mesenquimal de parte das células do líquido amniótico com base na análise de colágeno secretado por essas células e o fato de que elas secretam antígeno leucocitário humano (HLA) de classe I (HLA-ABC), mas não de classe II (HLA-DR), tanto quanto os fibroblastos (HURYCH *et al.*, 1976; MACEK; HURYCH; REZÁCOVÁ, 1973; WHITSETT *et al.*, 1983).

No decorrer da gestação, o líquido amniótico apresenta constituições celulares diversas, sendo a maior parte das células originária do epitélio, dos

tratos digestivos e urinário do feto e do âmnion. No primeiro trimestre e até a metade do segundo, é composto de células provenientes da descamação da vesícula vitelínica, do embrião e posteriormente do feto, talvez da placenta e do âmnion. A partir da queratinização da pele fetal entre a 17^a e a 20^a semanas de gestação, a deglutição e a diurese fetal assumem importância na composição do líquido amniótico, sendo que na segunda metade da gestação ele passa a ser constituído principalmente de urina fetal. As secreções do trato respiratório e as excreções do trato gastrointestinal também contribuem para o *pool* de células presentes no líquido amniótico (BRACE, 1986; GOSDEN, 1983; HOEHN; SALK, 1982; TROUNSON, 2007).

A população de células viáveis no líquido amniótico contém:

- a) Células que aderem ao plástico sob condições de cultura de rotina:
 - Tipos de células que dividem e formam colônia.
 - Células que não proliferam sob condições de cultura usadas rotineiramente.
- b) Células que não aderem ao plástico sob condições de cultura de rotina.

Uma mistura de aspectos morfológicos, critérios bioquímicos limitados e características de crescimento levaram à classificação das células do líquido amniótico, as quais aderem e formam colônias sob condições de cultura de rotina em:

- Células tipo E (epiteloide) derivadas de pele e urina fetais.
- Células tipo AF, específicas do líquido amniótico, que produzem estrógeno, progesterona e gonadotrofina coriônica humana, sendo derivadas do âmnion e do trofoblasto.
- Células tipo F, fibroblastoide, derivadas do tecido conjuntivo fetal (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997; LAUNDON; PRIEST; PRIEST, 1981; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002; ROONEY, 2001).

As células do tipo AF do líquido amniótico apresentam-se em cultura, pleomórficas e multinucleadas; as do tipo E apresentam formato poligonal, com pouca substância intracelular e pobre dissociação pela tripsina; e, finalmente, as

células do tipo F apresentam morfologia como fibroblasto (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997).

A princípio, acreditava-se que as melhores amostras para a obtenção de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico fossem obtidas no segundo trimestre de gestação. Hoje se sabe que é possível obter essas células no terceiro trimestre e que elas possuem expressão do marcador de linhagem celular embrionária (OCT-4) e dispõem de potencial de diferenciação de multilinhagens (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; DE COPPI *et al.*, 2007; PRUSA *et al.*, 2003; YOU *et al.*, 2008). Dependendo das condições de cultura específica, elas podem diferenciar-se em adipócitos, condrócitos, osteócitos ou células neuronais (KIM *et al.*, 2006; PRUSA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2004).

As CTMs do líquido amniótico podem se proliferar rapidamente em condições de cultura, mantendo seu cariótipo normal e capacidade de expansão por longos períodos, além de manter a capacidade proliferativa após 32 anos de criopreservação (BYDLOWSKI *et al.*, 2009; WOODBURY *et al.*, 2006). Apresentam fenótipo bastante semelhante ao das células mesenquimais da medula óssea e do cordão umbilical. Expressam os antígenos de superfície da membrana celular *cluster differentiation* - CD29, CD44, CD90, CD73 e CD105 e não expressam CD34, CD14, CD45 e HLA-DR (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; LEE, O. *et al.*, 2004; OSWALD *et al.*, 2004; PAROLINE *et al.*, 2008; ROUBELASKIS *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2006). Esse mesmo padrão imunofenotípico, do tipo mesenquimal, é mantido pelas células-tronco mesenquimais do líquido amniótico após isolamento, expansão, criopreservação por cinco meses e descongelamento (STEIGMAN *et al.*, 2008).

Portanto, o líquido amniótico é bastante promissor como uma possível fonte de células-tronco pluripotentes para terapia celular, ressaltando-se que não levantam as preocupações éticas associadas ao uso de células-tronco embrionárias (KIM *et al.*, 2007).

Considerando o fácil acesso às amostras para cultura de célula-tronco, o alto potencial de terapia celular usando células-tronco fetais e a praticidade da engenharia do tecido fetal intrauterino, o líquido amniótico pode fornecer excelente fonte alternativa para investigação de CTM e aplicação de seu potencial terapêutico (TSAI *et al.*, 2004).

Entretanto, o uso terapêutico de células derivadas do líquido amniótico humano requererá entendimento muito mais completo da sua biologia. Alguns objetivos importantes incluem determinar o tempo de vida replicativo e o potencial de produção celular dos tipos de células componentes na cultura, caracterizar o perfil de expressão gênica dessas células e determinar se o perfil muda durante a expansão *ex vivo* (KIM *et al.*, 2007).

Sabe-se hoje que o líquido amniótico pode ser utilizado como fonte de células-tronco mesenquimais a partir da obtenção de células em cultura, porém subcultivos extensos impedem a função celular pelo aparecimento evidente de sinais de senescência e/ou apoptose (KIM *et al.*, 2007). Levando em consideração o intervalo de quatro a seis meses entre a amniocentese e o nascimento, técnicas de conservação dessas células se fazem necessárias, entretanto, técnicas de preservação simples como refrigeração ou cultura de tecidos apresentam determinados inconvenientes tais como prazo limitado de conservação, alto custo e risco de contaminação; a criopreservação se torna uma técnica atrativa na preservação de amostras biológicas (KARLSSON; TONER, 1996).

2.5 Criopreservação

O campo da criobiologia abrange um grupo de processos em sistemas vivos que são governados por princípios de transferência de massa e calor. Desde o início da criobiologia, pesquisadores procuram adquirir mais entendimento sobre os eventos que controlam o comportamento das células durante ciclos de congelamento e descongelamento (DILLER, 1997; MASSUMOTO *et al.*, 1997). Sendo assim, a criopreservação - manutenção de amostras biológicas a temperaturas criogênica - tem sido revisada por vários autores com o intuito de obter protocolos que causem menos danos às células de diversas amostras biológicas (FAHY *et al.*, 1984; FLEMING; HUBEL, 2006; MASSUMOTO, *et al.*, 1997; XIANG *et al.*, 2007).

Devido à abundância de água em sistemas biológicos, a fase de transição água-gelo é um fenômeno crítico durante a criopreservação, visto que as células sofrem variações termais, químicas e de forças mecânicas, que podem afetar

profundamente sua função biológica (KARLSSON; TONER, 1996; MAZUR; PINNA; KLEINHANSA, 2007; SONG *et al.*, 2009).

Desta forma, a taxa de resfriamento (graus decrescidos em relação ao tempo até a temperatura de armazenamento final) é um fator importante para o sucesso da criopreservação, podendo afetar profundamente o destino das amostras biológicas criopreservadas (BERZ *et al.*, 2007; NOWSHARI; BREM, 2001). A utilização do congelamento rápido provoca a formação de cristais de gelo intracelulares, o que pode ocasionar a ruptura mecânica de estruturas celulares. Além disso, o volume de água intracelular permanece praticamente constante durante o resfriamento a -80°C , porque não há tempo suficiente para a água sair da célula por osmose. Por outro lado, no congelamento gradativo, com decréscimo gradual e constante da temperatura, a formação de gelo será primariamente extracelular, ocorrendo menos dano celular, permitindo a saída da água para que esta se equilibre com o gelo extracelular. Portanto, quando a taxa de congelamento é lenta o suficiente para prevenir a formação de gelo intracelular, porém rápida o suficiente para evitar os sérios efeitos da desidratação, a célula pode sobreviver aos processos de congelamento e descongelamento (KARLSSON; TONER, 1996; MAZUR, 1984).

Há duas abordagens básicas para a criopreservação de células e tecidos: procedimentos de congelamento-degelo e vitrificação. Em técnicas de preservação de congelamento-degelo, a solução extracelular é congelada, mas medidas são tomadas para minimizar a probabilidade de formação de gelo intracelular. Nos procedimentos de vitrificação, há tentativa de prevenir-se a formação de gelo em toda a amostra. A primeira abordagem aproveita-se das propriedades regulatórias do gelo extracelular utilizando o congelamento lento, enquanto a segunda procura evitar os efeitos potencialmente prejudiciais do gelo intra e extracelular, usando frequentemente o congelamento rápido com altas concentrações de crioprotetores (CHO *et al.*, 2002; KARLSSON; TONER, 1996; KIM *et al.*, 2006; MASSUMOTO *et al.*, 1997; XIANG *et al.*, 2007).

Para a técnica de congelamento-degelo, a curva ideal de congelamento pode ser obtida por meio de congeladores programáveis (SANTIN; BLUME; MONDADORI, 2009).

Em verdade, os protocolos de criopreservação para ambas as técnicas - vitrificação e congelamento-degelo - envolvem a adição de crioprotetores às

amostras e, em seguida, resfriamento das amostras à temperatura em que serão armazenadas. Contudo, os protocolos de vitrificação empregam grandes concentrações de crioprotetores a fim de suprimir completamente a formação de gelo durante a criopreservação (CHO *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2006; MASSUMOTO *et al.*, 1997; McGANN, 1978; XIANG *et al.*, 2007).

Os produtos químicos crioprotetores podem ser divididos em duas categorias: crioprotetores permeabilizantes, por exemplo: dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, 1,2-propanodiol, que podem passar através das membranas celulares; e crioprotetores não-permeabilizantes, como polivinilpirrolidona, amido de hidroxietil e açúcares diversos, que não podem entrar nas células (GILMORE *et al.*, 1997). A proteção contra a formação de gelo intracelular tem sido associada aos efeitos coligativos dos crioprotetores químicos, sendo que em concentrações elevadas resultam em aumento da viscosidade das soluções extra e intracelular e, assim, reduzem drasticamente as taxas de gelo e crescimento de cristais (KARLSSON; TONER, 1996).

Apesar de sua proteção para as células durante o congelamento e descongelamento, os crioprotetores podem ser prejudiciais para as células, especialmente quando usados em alta concentração (FAHY, 1986).

A temperatura de armazenamento também é crítica para o sucesso da criopreservação. Temperaturas abaixo de -80°C são geralmente necessárias para a preservação de células e tecidos durante longos períodos de tempo, sendo que o prazo de validade aumenta drasticamente à medida que a temperatura de armazenamento é reduzida. A manutenção em Nitrogênio Líquido a -196°C (o ponto de ebulição do Nitrogênio Líquido) previne efetivamente todas as reações químicas conduzidas por calor (BERZ *et al.*, 2007; KARLSSON; TONER, 1996; MAZUR, 1984; VALERI; PIVACEK, 1996).

Além da taxa de resfriamento e da temperatura de armazenamento, a taxa na qual as amostras são descongeladas para temperaturas normotérmicas também pode ser importante. Embora os mecanismos pelos quais o processo de aquecimento influencia a sobrevivência das células não sejam conhecidos, taxas de aquecimento rápido parecem ser benéficas para amostras que sofreram rápida refrigeração, enquanto as taxas de aquecimento lentas são recomendadas para as amostras resfriadas lentamente (KARLSSON; TONER, 1996). O método-

padrão conhecido é o aquecimento em banho-maria a 37°C até que todos os cristais de gelo desapareçam (BERZ *et al.*, 2007; KATAYAMA *et al.*, 1997).

Apesar de atualmente já existirem vários bancos de amostras de sangue de cordão umbilical criopreservados, alguns autores vêm buscando na criopreservação uma alternativa para o armazenamento de células-tronco derivadas de outros tecidos, como a medula óssea e o líquido amniótico (BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1998; MASSUMOTO *et al.*, 1997; PENTZ; HORLER, 1980; STEIGMAN *et al.*, 2008; XIANG *et al.* 2007). A criopreservação de células-tronco derivadas da medula óssea não interfere na sua capacidade proliferativa *in vitro* nem na capacidade de diferenciação condrogênica, osteogênica, adipogênica e neurogênica, permitindo, ainda, que essas células sejam utilizadas com sucesso na recuperação da hematopoese (BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1998; MASSUMOTO *et al.*, 1997; XIANG *et al.*, 2007).

Estudos que utilizaram a criopreservação de células do líquido amniótico humano como técnica de conservação enfatizaram que essas células estão entre as que podem suportar a criopreservação prolongada, mantendo a sua identidade e, ainda, proliferando em elevado número, de modo a tornar viáveis ensaios clínicos de terapias celulares (PENTZ; HORLER, 1980; STEIGMAN *et al.*, 2008; WOODBURY *et al.*, 2006).

Em 1980, com o objetivo de avaliar a recuperação celular após diferentes protocolos de criopreservação, Pentz e Horler (1980) realizaram a criopreservação de células cultivadas e não-cultivadas do líquido amniótico de 16 amostras, verificando sua recuperação após diferentes protocolos. Para tal, procederam à criopreservação das células empregando dois protocolos em paralelo, sendo um com a adição de DMSO de forma rápida e o outro com a adição de DMSO de forma lenta. Após descongelamento, pôde-se observar que houve melhor recuperação (viabilidade) e menos tempo para aparecimento de células em divisão, quando reiniciadas em cultura, no protocolo no qual o DMSO foi adicionado de forma lenta. Foi ainda observado que para as células criopreservadas sem cultivo prévio não se registraram diferenças quanto ao número de colônias formadas, quando essas células foram iniciadas em cultura antes de criopreservadas e após criopreservadas (PENTZ; HORLER, 1980).

Em 2006, Woodbury *et al.* examinaram a plasticidade de uma linhagem celular de amniócitos criopreservados por 32 anos, a partir da análise de expressão gênica, indução à diferenciação osteogênica e neural e imunocitoquímica, referindo que essas células expressam β -tubulina ectodermal e fibronectina mesodermal, além dos marcadores de pluripotência OCT-4 e Rex-1. Quando induzidas, a diferenciação neurogênica e osteogênica apresentaram expressão de genes neuronais (GAP 43, NF-M) e fosfatase alcalina, respectivamente (WOODBURY *et al.*, 2006). Dois anos mais tarde, Steigman *et al.* isolaram e expandiram células-tronco mesenquimais do líquido amniótico de 11 pacientes, caracterizaram por citometria de fluxo e criopreservaram por três a cinco meses. Depois de descongeladas, essas células mantiveram 88% de viabilidade celular e o perfil de células progenitoras (CD29+, CD73+ e CD44+; sendo menos que 5% CD34+ e CD45+) (STEIGMAN *et al.*, 2008).

Alinhado a esses dados, a proposta deste trabalho é avaliar os efeitos da criopreservação sobre a manutenção da capacidade de diferenciação multipotente, viabilidade e estabilidade cromossômica das células-tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico humano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as células-tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico humano antes e após o processo de criopreservação, quanto à manutenção da sua capacidade de diferenciação multipotente, viabilidade e estabilidade cromossômica.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar células-tronco mesenquimais do líquido amniótico humano e verificar seu comportamento e morfologia *in vitro* antes e após criopreservação.
- Verificar o padrão imunofenotípico das células cultivadas do líquido amniótico humano.
- Comprovar a capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica de células cultivadas do líquido amniótico humano e verificar se essa capacidade persiste após criopreservação.
- Verificar a viabilidade celular após criopreservação e degelo.
- Determinar se os procedimentos de cultivo celular, passagem celular e a criopreservação de células do líquido amniótico humano, induzem o aparecimento de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais.
- Comparar a expressão do gene OCT-4 nas células-tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico humano antes e após criopreservadas.
- Verificar interferências de anormalidades cromossômicas na capacidade de diferenciação e no perfil de expressão gênica das células cultivadas do líquido amniótico humano.

4 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo transversal no qual foram incluídas as gestantes acompanhadas no Centro de Medicina Fetal do Hospital das Clínicas da UFMG e que apresentaram indicação para realização de procedimentos invasivos (cordocentese ou amniocentese). Nessa oportunidade, foi obtida amostra de líquido amniótico para a realização do presente estudo e 10 gestantes foram acompanhadas no período de outubro de 2008 a julho de 2009.

As gestantes doadoras foram orientadas verbalmente e por escrito sobre o projeto de pesquisa, sua justificativa, seus objetivos e riscos, bem como os benefícios obtidos com a conclusão do estudo. Anteriormente à realização do procedimento invasivo, elas foram informadas quanto à necessidade do mesmo, assim como quanto aos riscos de complicações e à utilização do líquido amniótico para a realização do estudo. As gestantes que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A). A privacidade dos envolvidos foi preservada em todas as fases da pesquisa.

Adotaram-se como critérios de inclusão no estudo:

- Gestações no decurso do segundo ou terceiro trimestre; com idade gestacional mínima de 15 semanas;
- indicação para realização de procedimentos invasivos (cordocentese ou amniocentese) propedêuticos ou terapêuticos;
- concordância em participar do estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

A exclusão foi prevista para pacientes que apresentaram contaminação do líquido amniótico por sangue, contaminação bacteriana e/ou fúngica da cultura celular e desistência de participar do projeto.

4.1 Obtenção das amostras

A coleta do líquido amniótico foi realizada no Centro de Medicina Fetal-HC-UFMG de acordo com o protocolo do serviço e pela mesma equipe de profissionais, sob visão ultrassonográfica. Após assinatura no termo de consentimento livre e esclarecido, a paciente permaneceu em posição *semifowler*,

sendo inicialmente realizada a varredura do abdome materno com sonda ultrassonográfica (3,5 MHz) para determinação da estática fetal, localização da placenta e determinação do local de punção do abdome materno. Após antissepsia com solução de povidina-iodo tópico e anestesia local no ponto de punção do abdome materno, usou-se lidocaína 1% sem vasoconstritor (Laboratório Astra ®) e puncionou-se o abdome materno com agulha calibre 20 gauge (*Becton Dickinson*, Frankin Lakes, NJ, USA).

A punção foi sempre guiada pelo ultrassom, sendo a agulha inserida através da parede abdominal, seguida da parede uterina, atingindo a cavidade amniótica. Retirado o guia da agulha, conectou-se a seringa e foi aspirada pequena quantidade de líquido amniótico, o qual foi descartado pelo risco de contaminação com células maternas. A segunda amostra aspirada, aproximadamente 20 mL de líquido amniótico, foi então utilizada para o estudo.

Finda a punção, foram avaliadas a vitalidade fetal e a presença ou ausência de sangramento por ultrassonografia. A paciente permaneceu em repouso durante alguns minutos, sendo orientada a respeito dos sintomas pós-procedimentos e a retornar às suas atividades rotineiras.

Imediatamente após a coleta, o material foi enviado ao Departamento de Genética Humana do Instituto Hermes Pardini Ltda., refrigerado e acondicionado na própria seringa de coleta.

4.2 Cultura primária

Aproximadamente 20 mL de líquido amniótico foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno (*Corning*, New York, USA) e centrifugados a 1.000 rotações por minuto (rpm) por oito a 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de meio amniomax suplementado com 14% de suplemento para meio amniomax (*Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, *United States of America* - USA). O conteúdo do tubo foi transferido para dois frascos T25 (*Corning*, New York, USA), os quais foram incubados a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) durante quatro a cinco dias em repouso.

Todos os procedimentos de cultivo celular foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos de manutenção de esterilidade de materiais e soluções (FRESHNEY, 2005). Vale ressaltar que o crescimento celular foi monitorado sob microscopia óptica invertida quanto à presença de células aderidas, confluência e morfologia das colônias. O meio de cultura foi trocado a cada três ou quatro dias, utilizando-se o mesmo meio suplementado descrito, após remoção do antigo.

As células mesenquimais foram isoladas das demais células presentes no líquido amniótico, pela sua capacidade de expansão e aderência ao plástico. E após atingir 80% de confluência (80% da área cultivável do frasco cobertos por células), um dos frascos foi preparado para a obtenção do **cariótipo** e o outro foi submetido a três passagens celulares.

4.3 Passagens celulares

As células mesenquimais do líquido amniótico secretam uma matriz extracelular e proteínas, que permitem que estas células se dividam aderidas sobre uma superfície de crescimento. Sendo assim, faz-se necessário um tratamento com enzima proteolítica para que elas percam a adesão. Para tal, o meio de cultura foi retirado da cultura de células, a qual foi lavada com solução *Hanks* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e acrescentado 1,5 mL de tripsina EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), com o objetivo de recobrir toda a monocamada de células. A amostra foi então incubada a 37°C por três a cinco minutos e, logo após, as células foram visualizadas ao microscópio óptico invertido para a confirmação da perda de adesão ao plástico. A ação da tripsina foi paralisada com 10 mL de meio amniomax suplementado com 14% de suplemento para tal meio (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e homogeneizada.

Metade do conteúdo final foi então transferido para uma nova garrafa T25, a qual foi incubada a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por dois dias. Salienta-se que o restante do material foi descartado, seguindo-se as normas de biossegurança. Após esses dois dias em que a cultura permaneceu em repouso, foram realizadas trocas de meio a cada três a quatro dias e as

culturas foram observadas diariamente quanto à presença de células aderidas, confluência e morfologia das colônias.

Esse procedimento, denominado **passagem celular**, foi repetido por mais duas vezes, sendo que na terceira passagem metade da suspensão celular foi reiniciada em cultura como anteriormente descrito (frasco 1), $\frac{1}{4}$ da suspensão celular foi completado até o volume de 5 mL com meio amniomax suplementado e transferido para outro frasco T25 (frasco 2) e o restante foi contado em hemocítmetro. A partir daí, alíquotas de 1,5 mL contendo 1×10^4 células diluídas em meio amniomax suplementado foram transferidas sobre seis lâminas 26 X 76 mm (*Perfecta*, Mooma, São Paulo, Brasil), as quais foram colocadas no interior de placas de Petri 100 X 20 mm (*Perfecta*, Mooma, São Paulo, Brasil) e mantidas em repouso a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por dois dias (lâminas 3, 4, 5, 6, 7, 8). Após esse período, foram acrescentados 10 mL de meio amniomax suplementado no interior da placa e foram realizadas trocas de meio a cada três a quatro dias, sendo as culturas observadas diariamente quanto à morfologia e confluência das colônias.

Ao atingirem 80% de confluência, a cultura 2 foi preparada para a obtenção do **cariótipo**, a cultura 1 foi encaminhada para o **teste de viabilidade celular**, **ensaios de expressão gênica**, **imunofenotipagem** e para a **criopreservação** e as culturas em lâminas 3, 4 e 5 foram induzidas às **diferenciações adipogênica**, **condrogênica e osteogênica**, respectivamente. As culturas 4, 5 e 6 foram usadas como controles negativos de diferenciação mantidas, desta forma, em cultura, sendo realizadas trocas de meio a cada três a quatro dias.

Para esclarecer a finalidade desses testes no contexto deste estudo, destaca-se que experimentos de imunofenotipagem, cariótipo e os ensaios de diferenciação celular foram realizados inicialmente com propósito de caracterização das células cultivadas. Para determinar os efeitos da criopreservação sobre essas células, foram realizados ensaios de expressão gênica, teste de viabilidade celular, cariótipo e novamente diferenciação celular.

4.4 Criopreservação

O meio de cultura do frasco 1 foi retirado e mantido em um tubo cônico, a cultura foi lavada com solução *Hanks* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e acrescentou-se 1,5 mL de tripsina EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), a qual foi mantida por três a cinco minutos até que as células se desprendessem do frasco. O conteúdo foi então adicionado junto ao meio de cultura com o intuito de paralisar a ação da tripsina e dessa suspensão foram retirados 20 μ L para determinação do número de células por meio de contagem de células em hemocítômetro e para o teste de viabilidade por exclusão de azul tripan.

O volume correspondente a 5×10^4 células foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de meio de cultura amniomax (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), homogeneizado e dividido em cinco tubos criogênicos. Para cada paciente, foram criopreservados cinco frascos de cultura contendo 1×10^4 células da suspensão final do frasco 1 em 1 mL de meio de cultura amniomax sem suplementação.

Aos tubos criogênicos foi adicionado *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (*Cryoserv*, Galway, Ireland) para uma concentração final de 10% v/v. O volume necessário de DMSO foi adicionado lentamente usando-se micropipeta e os tubos foram homogeneizados lentamente.

Em seguida, os tubos foram levados até o equipamento de congelamento programado *Cryomed* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA - USA), onde permaneceram por 10 minutos a 4°C e depois foram congelados à taxa de congelamento de -1°C/min até a temperatura final de -80°C. O protocolo de congelamento foi otimizado para uma etapa inicial de resfriamento 1°C/min até 4°C, seguido de resfriamento de 10°C/min até -40°C e aquecimento de 12°C/min até -15°C/min. A partir daí, realizou-se resfriamento de 1°C/min até -40°C e mais uma etapa de resfriamento à taxa de 10°C/min até -80°C, segundo instruções do fabricante - Manual de criopreservação - *Thermo* (BROCKBANK; COVAULT; TAYLOR, 2003). Após essa etapa, os tubos criogênicos contendo as células foram levados ao Nitrogênio líquido (-196°C).

4.5 Descongelamento

Os tubos foram descongelados a cada 30 dias após o congelamento (30, 60, 90, 120, 160 dias), a 37°C em banho-maria.

4.6 Cultura após criopreservação

Para cada tubo descongelado de cada paciente, foram centrifugadas e realizadas duas trocas de meio para retirar o DMSO residual, retirando-se daí uma alíquota de 10 µL para a realização do **teste de viabilidade celular** e o restante iniciado em cultura em duas garrafas T25 pelo mesmo procedimento da cultura primária. Um dos frascos foi avaliado diariamente quanto à morfologia celular e confluência das colônias e utilizado para a obtenção do **cariótipo** após atingir 80% de confluência e o outro foi descartado após a análise do cariótipo, sendo apenas um frasco reserva.

Para o último tubo descongelado de cada paciente (160 dias após congelamento), o mesmo procedimento foi realizado, entretanto, o frasco de cultura anteriormente denominado reserva foi submetido a uma passagem celular após atingir 80% de confluência. Nessa primeira passagem, a suspensão celular foi contada em hemocítômetro e foram confeccionados: um novo frasco de cultura (1) contendo metade do conteúdo celular e seis culturas em lâminas (2, 3, 4, 5, 6, 7) contendo 1×10^4 células cada.

Após atingirem 80% de confluência, as culturas em lâminas 2, 3, 4 foram induzidas à diferenciação **adipogênica, condrogênica e osteogênica**, respectivamente, e as culturas 5, 6 e 7 foram mantidas em cultura como controle negativo de diferenciação, sendo realizadas trocas de meio a cada três a quatro dias. A cultura do frasco 1 foi submetida a mais duas passagens após atingir 80% de confluência.

Para cada passagem, a cultura foi ressuspensa com 1,5 mL de tripsina EDTA (Invitrogen) e inoculada em 10 mL de meio de cultura correspondente. Logo após, metade do conteúdo final foi transferida para uma nova garrafa T25, a qual foi incubada a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO² por dois dias. Vale enfatizar que o restante do material foi descartado, seguindo-se as normas de biossegurança. Posteriormente a esse período, foram realizadas trocas de meio a cada três a quatro dias e as culturas foram avaliadas quanto à presença de células aderidas, confluência e morfologia das colônias.

Depois de três passagens completas e de atingidos 80% de confluência, a cultura do frasco 1 foi lavada com solução *Hanks* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e ressuspensa com 1,5 mL de tripsina EDTA (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) para a realização dos testes de **expressão gênica pós-criopreservação**.

4.7 Contagem celular em hemocitômetro e análise de viabilidade celular

Para estabelecimento do número de células para extração de ácido ribonucleico (RNA), imunofenotipagem e para criopreservação, as suspensões celulares da cultura do frasco 1 foram sempre contadas. Para tal, 20 uL da suspensão celular foram adicionados a 20 µL de solução de azul de tripan 0,4% (*Sigma Chemical*, St Lois, MO, USAI). Cada amostra foi homogeneizada e, desta, 10 µL foram transferidos para o hemocitômetro (câmara de Neubauer).

Para determinar a concentração de células, foram contadas as células dos quatro quadrantes, o número total foi dividido por quatro, multiplicado pelo fator de correção (10.000) e pelo fator de diluição, obtendo-se, ao final, o número de células por mililitro da amostra contada.

A viabilidade celular, avaliada nas amostras antes da criopreservação e após criopreservação e degelo, foi verificada pela contagem do número de células coradas (não-viáveis) em relação ao número de células total (células coradas + células não-coradas), expressa em porcentagem, sendo contado para cada amostra o mínimo de 100 células (FRESHNEY, 2005).

4.8 Cariótipo

A fim de verificar a constituição cromossômica das células cultivadas do líquido amniótico humano e a manutenção desse conjunto após os procedimentos de passagem celular e criopreservação por diversos tempos, as culturas de todos os pacientes foram submetidas aos procedimentos para a confecção do cariótipo.

A divisão celular foi paralisada com 200 µL de *kario max colcemid solution* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera

úmida contendo 5% de CO₂ por uma hora e 30 minutos. Posteriormente, o meio foi retirado e mantido em um tubo cônico, a cultura foi lavada com solução *Hanks* (Invitrogen) e acrescentado 1,5 mL de tripsina EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), a qual foi mantida por três a cinco minutos até que as células se desprendessem do frasco, observado por microscopia óptica invertida. O conteúdo foi então adicionado junto ao meio de cultura com o propósito de paralisar a ação da tripsina e foi centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram acrescentados 5 mL de solução KCl 0,075 M (*Merck*, Darmstadt, Alemanha), homogeneizado e aguardados sete minutos. Logo após foi feita a prefixação com 1 mL de solução metanol/ ácido acético 3:1 (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). O tubo foi centrifugado novamente, retirado o sobrenadante e acrescentados 5 mL de solução metanol/ ácido acético 3:1 (*Merck*, Darmstadt, Alemanha). Esse procedimento foi repetido por mais uma vez e o tubo foi armazenado a -25°C por no mínimo uma hora.

O tubo foi centrifugado novamente, o precipitado celular ressuspenso em 0,5 a 2 mL de solução de metanol/ ácido acético 3:1, homogeneizado e pingadas três a quatro gotas da solução final sobre lâminas 26 x 76 (*Perfecta*, Mooca, São Paulo, Brasil), as quais foram mantidas em chapa aquecida à temperatura de 40° até a secagem. Foram confeccionadas quatro a oito lâminas para cada tubo.

Com o objetivo de desidratação, as lâminas ficaram em estufa em atmosfera seca a 55°C por 24 horas. Logo após, foram banhadas em solução de tripsina 1:250/ tampão *Dulbecco's* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) 0,05% previamente aquecida a 37°C por quatro a 12 segundos, inativadas em solução de tampão fosfato potencial de Hidrogeniônico (pH) 6,8 a 6,9 adicionada de 20% de soro bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e coradas em corante *Giemsa* por um a dois minutos (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997).

A análise cromossômica foi realizada segundo o *International system for human cytogenetic nomenclature* (ISCN) 2005, sendo que para cada cultura foram contadas 50 células (SHAFFER; TOMMERUP, 2005).

4.9 Diferenciação

Para caracterizar as células cultivadas do líquido amniótico humano e verificar sua capacidade de diferenciação antes e após 150 dias de criopreservação, as culturas foram submetidas à indução da diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica.

4.9.1 Diferenciação adipogênica

Após atingir 80% de confluência, o meio de cultura foi trocado por um meio adipogênico composto de meio amniomax suplementado com 14% de suplemento para meio amniomax (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 1 μM de dexametasona, 0,5 μM /L 3 – isobutil-1-metilxantina, 0,05 mg/L insulina humana e 200 μM indometacina (*Sigma Chemical*, St Lois, MO, USA). Foram realizadas trocas de meio a cada três dias e as culturas foram observadas diariamente quanto à presença de gotículas lipídicas intracelulares, as quais foram confirmadas por coloração *oil red* depois de duas semanas (KIM *et al.*, 2007).

4.9.2 Diferenciação condrogênica

O meio de cultura, ao atingir 80% de confluência, foi trocado por um meio condrogênico composto de meio *minimum essential medium eagle - Dulbecco modification* (DMEM) *high glucose* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) suplementado com 10 mg/mL de insulina de pâncreas bovino, 5,5 mg/mL de transferrina humana, 5 ng/mL de selenito de sódio, 0,5 mg/mL de albumina de soro bovino e 4,7 mg/mL de ácido linoleico (ITS + 1), 0,1 μM /L de dexametasona, 50 μg /mL de ácido ascórbico-2- fosfato, 100 μg /mL de piruvato de sódio, 40 μg /mL de L-prolina, 10 ng/mL de *transforming growth factor* – B1 (*Sigma Chemical*, St Lois, MO, USAI).

Foram realizadas trocas de meio a cada três dias e as culturas foram observadas diariamente, sendo que a diferenciação foi identificada por coloração *periodic acid schiff -alcian blue* (PAS-AB) após três semanas (KIM *et al.*, 2007).

4.9.3 Diferenciação osteogênica

Ao atingir 80% de confluência, o meio da cultura foi trocado por um meio osteogênico composto de meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), 0,1 µM/L de dexametasona, 10 mM/L B-glicerol-fosfato, 50 µM/L de L-ácido ascórbico e 10 nM/L 1,25 di-hidroxi vitamina D3 (*Sigma Chemical*, St Lois, MO, USA).

Foram realizadas trocas de meio a cada três dias e as culturas foram observadas diariamente, sendo que a diferenciação foi identificada por coloração *von kossa* após duas semanas (BAKSH; YAO; TUAN, 2007).

4.10 Coloração das lâminas induzidas à diferenciação

As lâminas induzidas à diferenciação e as lâminas de controle de indiferenciação foram fixadas em solução de formalina neutra por cinco minutos e, então, encaminhadas para etapa de coloração específica.

Para duas pacientes em particular, a cultura induzida à diferenciação *von kossa* foi ressuspensa com tripsina EDTA, conforme protocolo já descrito anteriormente. A suspensão celular foi centrifugada e o botão celular foi processado como *cell block*, preparadas para inclusão em parafina, sendo cortadas em micrótomo rotativo (*Leica*, Wetzlar, Germany) em secções de 4 µm de espessura, sendo os cortes coletados em lâminas silanizadas.

4.10.1 Coloração *oil red*

A lâmina foi coberta com solução de *oil red O* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) 0,5% diluída em propileno glicol (*Synth*, Diadema, São Paulo, Brasil) e aguardados dois minutos. Logo após, foi lavada em solução de propileno glicol 85% por um minuto, lavada duas vezes em água, corada rapidamente na hematoxilina de *Mayer's* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e lavada novamente em água. A lâmina foi deixada à temperatura ambiente para secagem e quando seca foi realizada a montagem, pingando-se uma gota de glicerina (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e coberta por lamínula (*Perfecta*, Mooca, São Paulo, Brasil).

A coloração *oil red* cora de vermelho-alaranjado acúmulos lipídicos, o que identifica a diferenciação adipogênica (PROPHET, 1994).

4.10.2 Coloração PAS-AB

As lâminas foram lavadas com água desmineralizada, cobertas com *alcian blue* 1% (*Sigma-Aldrich*, St Louis, MO, USA) e aguardados 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas em água destilada e mantidas 15 minutos em ácido periódico 0,5% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) à temperatura de 2 a 8°C, lavadas novamente e mantidas no reativo de *Schiff* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) por quatro minutos. As lâminas foram lavadas e deixadas na hematoxilina de *Mayer's* durante 50 segundos e lavadas novamente em água corrente durante cinco minutos.

Em seguida, as lâminas foram mergulhadas quatro vezes em cubas de álcool absoluto (*Minálcool*, Brasil) e 10 vezes em cubas de xilol (*Nuclear*, Brasil) e montadas com uma gota de glicerina (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) coberta com lamínula (*Perfecta*, Mooca, São Paulo, Brasil).

A coloração PAS-AB cora de azul glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas (observadas em vacúolos citoplasmáticos) e de magenta glicoproteínas neutras (observadas em vacúolos citoplasmáticos), ambas presentes no tecido cartilaginoso, o que identifica a diferenciação condrogênica (PROPHET, 1994).

4.10.3 Coloração von kossa

A lâmina foi coberta com solução de nitrato de prata 5% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) por 60 minutos sob a luz ultravioleta, lavada quatro vezes em água, coberta com solução de hipossulfito de sódio 5% (*Synth*, Diadema, São Paulo, Brasil) por cinco minutos e lavada novamente. As lâminas foram contrastadas com vermelho de *bordeaux* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) por um minuto, lavadas em água e desidratadas em quatro banhos de álcool absoluto (*Minálcool*, Brasil) seguidos de 10 banhos de xilol (*Nuclear*, Brasil). A montagem

foi realizada com uma gota de glicerina (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e coberta com lamínula (*Perfecta*, Mooca, São Paulo, Brasil).

A coloração *von kossa* cora de preto acúmulos de cálcio, o que identifica a diferenciação osteogênica (PROPHET, 1994).

4.11 Imunofenotipagem e expressão gênica

O meio foi retirado do frasco 1 e mantido em um tubo cônico, a cultura foi lavada com solução *Hanks* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) e acrescentou-se 1,5 mL de tripsina EDTA 0,25% (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), a qual foi mantida por três a cinco minutos até que as células se desprendessem do frasco. O conteúdo, então, foi adicionado junto ao meio de cultura com o objetivo de paralisar a ação da tripsina e dessa suspensão foram retirados 20 µL para determinação do número de células por meio de contagem de células em hemocítômetro.

4.11.1 Imunofenotipagem

Para a avaliação dos antígenos de superfície da população de células cultivadas, foi empregada a citometria de fluxo. Um painel de anticorpos monoclonais foi montado, sendo composto dos seguintes anticorpos: CD14 FITC (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador de monócito CD90 FITC (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA) e CD105 PE (*Beckman Coulter*TM Brea, CA, USA); marcador de célula-tronco mesenquimal CD34 PE (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador de célula-tronco hematopoiética CD45 PE-Cy5 e FITC (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador panleucocitário CD73 PE (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador de linfócito T e expresso em células-tronco mesenquimais HLA-DR PE-Cy5 (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador de antígeno de classe II do *histocompatibility complex* (MHC) e *7-Amino-actinomycin D* (7-AAD) (BD *Pharmingen*TM San Jose, CA, USA); marcador de viabilidade.

Os anticorpos estavam marcados com três fluorocromos diferentes: isotiocianato de fluoresceína - *fluorescein isothiocyanate* (FITC); ficoeritina – *phicoeritin* (PE); e ficoeritina-Cy5 - *phicoeritin* ligada ao Cy5 (PE-Cy5), que permitiu a marcação das células com três anticorpos simultaneamente.

Para obter-se a calibração do aparelho e a definição de positividade, utilizaram-se células sabidamente CD34-.

As células foram contadas, como descrito anteriormente, e a concentração foi ajustada para 05×10^6 células/mL. Uma alíquota de 200 μ L dessa suspensão foi centrifugada a 800 g por cinco minutos, 150 μ L do sobrenadante foram descartados e foram acrescentados 10 μ L do anticorpo. As células foram brevemente agitadas em um vórtex com agitação leve e o tubo foi colocado ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação, as células foram fixadas em 500 μ L de ISOTON® II (*Beckman Coulter*TM Brea, CA, USA). A aquisição celular ocorreu no aparelho FC 500 MCL System (*Beckman Coulter*TM Brea, CA, USA) de pelo menos 10.000 eventos e os dados foram analisados no CXP software (*Beckman Coulter*TM Brea, CA, USA).

4.11.2 Expressão gênica

Imediatamente após a contagem celular, foi separado o volume de células correspondente a 1×10^5 células e centrifugado a 1.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensado em 1 mL de solução *Hanks* (Invitrogen), homogeneizado e congelado a -80°C até o momento da extração de RNA, para posterior ensaio de quantificação do gene de pluripotência OCT-4.

4.11.2.1 Extração de RNA

As alíquotas de 1 mL de cultura de células, na concentração 1×10^6 células/mL, foram centrifugadas por cinco minutos a 800 g e ressuspensas em 150 μ L de meio de cultura. O volume total foi empregado para extrair RNA usando

o kit de extração – QIAamp® viral RNA (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras foram etiquetadas e conservadas a -70°C até o prosseguimento dos experimentos.

4.11.2.2 Quantificação da expressão de OCT-4

A reação de amplificação do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) de OCT-4 ocorreu em dois passos. A primeira reação foi responsável pela transcrição reversa do RNA total presente na amostra. Esse passo foi realizado utilizando-se o kit *high-capacity complementary desoxiribonucleic acid (cDNA) reverse transcription*® (Life technologies™, Frederick, Maryland, USA), seguindo-se as instruções do fabricante, no termociclador GeneAmp® *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) System 9600* (Life technologies™, Frederick, Maryland, USA). O segundo passo foi realizado no aparelho de PCR em tempo real *StepOnePlus*™ (Life technologies™, Frederick, Maryland, USA), utilizando-se o ensaio TaqMan® *gene expression Hs00742896_s1* (Life technologies™, Frederick, Maryland, USA) pré-desenhado, composto de iniciadores e sonda específicos para amplificarem o RNAm de OCT-4. A reação de amplificação foi de acordo com as instruções do fabricante e as condições de temperatura e tempo do aparelho foram as seguintes: uma fase de dois minutos a 50°C, uma fase de desnaturação de 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de duas fases, 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto.

Para avaliar a influência da criopreservação na expressão de OCT-4 nas células-tronco mesenquimais isoladas de líquido amniótico, o método de quantificação escolhido foi o comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), que avaliou antes e 150 dias após a criopreservação. O controle endógeno utilizado foi o RNAm de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, ensaio número HS99999905_m1 TaqMan® *gene expression* (Life technologies™, Frederick, Maryland, USA) e a amostra referência de comparação foi a própria cultura de células-tronco mesenquimais antes da criopreservação comparada a essa mesma cultura criopreservada.

4.12 Preparo de soluções

- **Tampão *Dulbecco's***

O conteúdo do envelope de *Dulbecco's Phosphate buffered powder* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) foi diluído em 1 L de água destilada, conforme instruções do fabricante, e estocado entre -5 e -25°C por até seis meses. O frasco em uso foi mantido em geladeira entre 2 e 8°C por até 15 dias.

- **Solução de tripsina 1:250/ tampão *Dulbecco's***

Foi diluído 0,5 g de tripsina 1:250 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) em 100 mL de tampão *Dulbecco's* (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA) e homogeneizado. A solução foi alíquotada no volume de 4 mL em frascos de citologia e conservada entre -5 e -25°C por até seis meses. No momento do uso, essa solução foi diluída na proporção 1:10 em tampão *Dulbecco's*, resultando na concentração final de 0,05%.

- **Corante *Giemsa***

Foram diluídos: 0,15 g de eosina-azul de metileno segundo *Giemsa* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e 0,25 g de eosina-azul de metileno, segundo *Wright* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha), em 100 mL de glicerina C₃H₈O₃ (Casa da Química - CAQ, Brasil), homogeneizado e mantido por 12 horas a 55°C em estufa. Após esse período, foi mantido à temperatura ambiente até atingir esta temperatura. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de metanol (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) homogeneizados e filtrados em frasco âmbar, utilizando-se funil e papel de filtro.

- **Tampão fosfato pH 6.8 a 6.9**

Foram diluídos 0,925 g de Na₂HPO₄ (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) e 1,348 g de KH₂PO₄ (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) em 1.000 mL de água

destilada, homogeneizados e estocados à temperatura de -5 a -25°C por até seis meses. O frasco em uso foi mantido à temperatura ambiente por até sete dias.

- **Vermelho de *bordeaux***

Diluiu-se 0,1 g de vermelho de *bordeaux* (*Merck*, Darmstadt, Alemanha) em 100 mL de solução de sulfato de alumínio aquosa a 5% (*Merck*, Darmstadt, Alemanha).

4.13 Análise estatística

Realizou-se estudo descritivo para a análise do tempo de cultura, viabilidade, expressão gênica e imunofenótipo das células obtidas do líquido amniótico. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%.

Foram utilizados os *softwares* de análise de dados *Excel 2003* e *Graphpad Prism* versão 3.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e cultura das células do líquido amniótico humano

Em torno do quarto ou quinto dia de cultura, as culturas primárias do líquido amniótico humano apresentaram, à microscopia óptica invertida, uma população visível de células esparsas com morfologia variada, sobre a qual se puderam destacar células com formato poligonal e células com formato fibroblastoide aderidas ao frasco de cultura nas 10 amostras estudadas (FIG. 3). No mesmo momento, por ocasião da primeira troca de meio de cultura, foi observado também elevado número de células não-aderentes, disformes, com núcleo pequeno em relação ao citoplasma, as quais foram descartadas por meio da troca de meio.

As células aderentes apresentaram a característica de se dividir em colônia, sendo que nessa etapa constatou-se a formação de colônias com morfologia heterogênea, com o tempo médio de 10 dias para atingir a confluência de 80%, com desvio-padrão de 1,4 (FIG. 3).

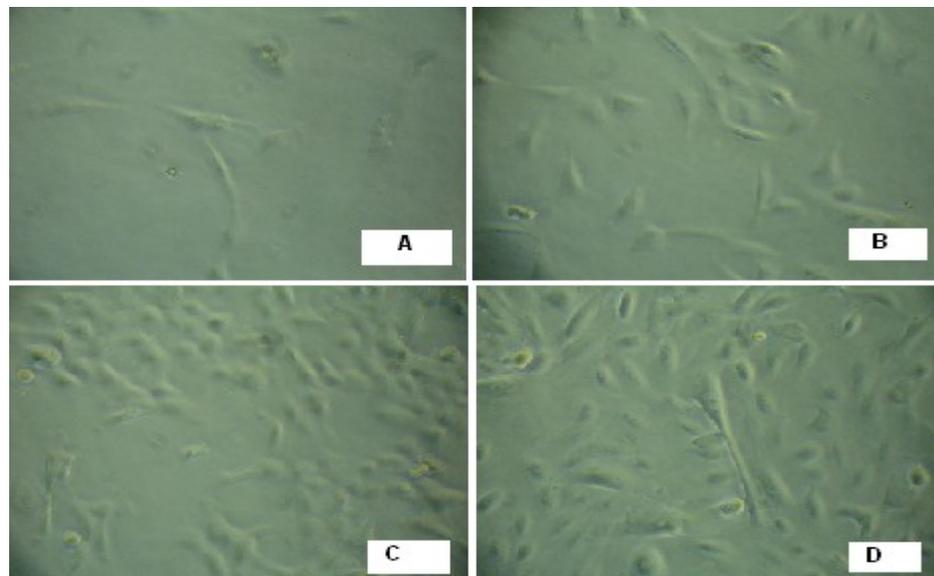


FIGURA 4 - Cultura de células do paciente 1 após início da cultura.

A) Quatro dias após o início da cultura; B) seis dias após o início da cultura; C) oito dias após o início da cultura; D) 10 dias após o início da cultura.

5.2 Passagens celulares

Verificou-se que ao longo da realização das passagens celulares houve mudança da morfologia celular, sendo que as células foram, em sua maioria, adquirindo formato fibroblatoide e, ao final da terceira passagem, quase a totalidade das células apresentava esse formato (FIG. 5). Para cada vez em que se realizou uma passagem celular, o tempo médio para adquirir a confluência de 80% foi de 2,9 dias, com desvio-padrão de 0,74 na primeira passagem; 2,9 dias, com desvio-padrão de 0,57 na segunda passagem; e de 2,8 dias, com desvio-padrão de 0,63 na terceira passagem, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas (valor $p=0,9$) (GRÁF. 1).

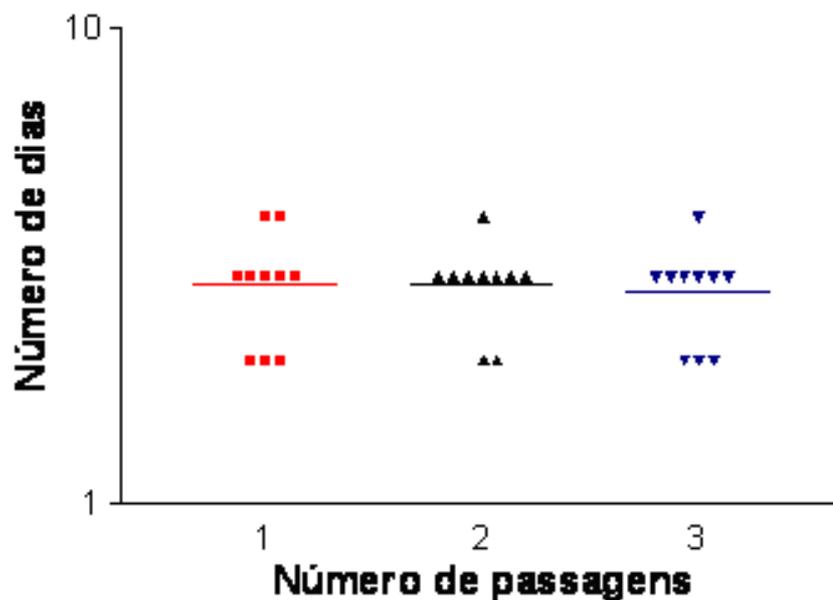


GRÁFICO 1 - Número de dias para que as células adquirissem 80% de confluência após as passagens celulares 1, 2 e 3.

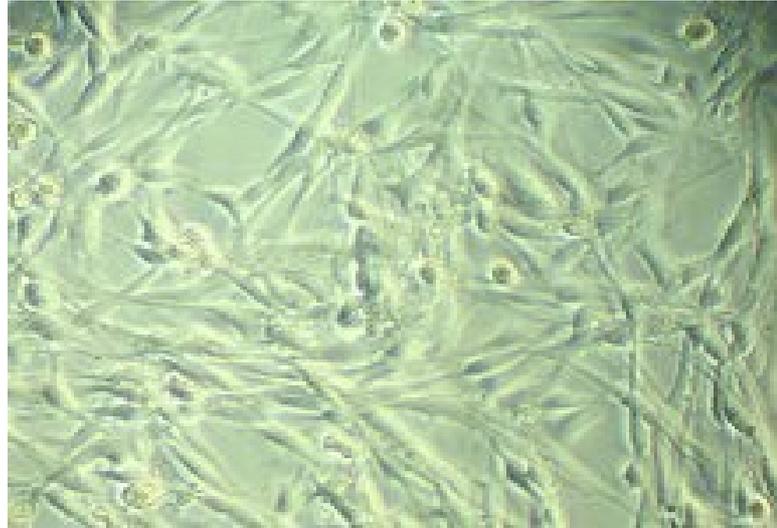


FIGURA 5 - Cultura de células do paciente 1 após três passagens celulares e dois dias após o reinício da cultura.

5.3 Viabilidade celular

Foi registrada viabilidade média das culturas após três passagens celulares de 94,2%, com desvio-padrão de 1,55, sendo que após 150 dias de criopreservadas apresentaram média de viabilidade de 88,8, com desvio-padrão de 1,75, ocorrendo perda média de viabilidade de 5,4%, a qual foi estatisticamente significativa ($p > 0,0001$). A distribuição da viabilidade pode ser observada no GRÁF. 2.

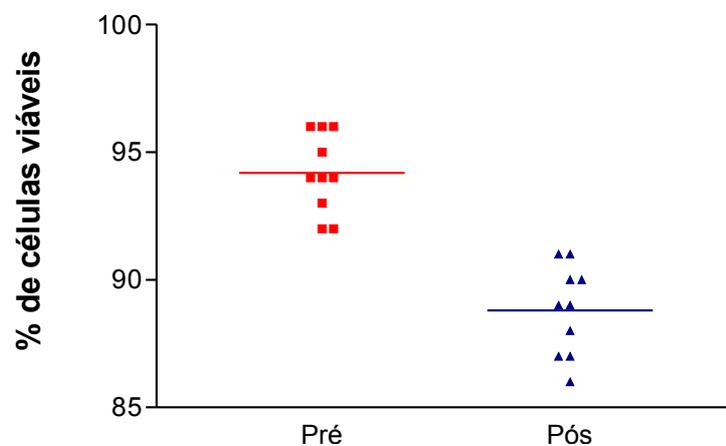


GRÁFICO 2 - Distribuição da viabilidade celular pré-criopreservação e após 150 dias de criopreservação.

Como não houve diferenças significativas entre a viabilidade celular nos diferentes tempos de criopreservação, nesta análise foram utilizados apenas os dados da viabilidade após 150 dias de criopreservação. Os dados relativos aos outros tempos encontram-se na TAB. 1.

TABELA 1

Viabilidade celular em porcentagem das culturas dos pacientes 1 a 10 nos diferentes tempos de criopreservação

| | 30 DIAS | 60 DIAS | 90 DIAS | 120 DIAS | 150 DIAS |
|---------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 87 | 89 | 89 | 88 | 89 |
| 2 | 91 | 90 | 88 | 89 | 90 |
| 3 | 87 | 89 | 89 | 89 | 87 |
| 4 | 86 | 84 | 84 | 85 | 86 |
| 5 | 90 | 91 | 90 | 92 | 91 |
| 6 | 88 | 90 | 89 | 90 | 88 |
| 7 | 86 | 85 | 88 | 85 | 87 |
| 8 | 90 | 92 | 93 | 92 | 91 |
| 9 | 88 | 90 | 90 | 87 | 89 |
| 10 | 90 | 89 | 91 | 88 | 90 |
| MÉDIA | 88,3 | 88,9 | 89,1 | 88,5 | 88,8 |
| DESVIO | 1,82 | 2,66 | 2,33 | 2,46 | 1,75 |
| PADRÃO | | | | | |

5.4 Cultura das células do líquido amniótico humano após criopreservação

Não foram encontradas diferenças na morfologia das células cultivadas após descongelamento quando comparadas com as culturas antes da criopreservação. Para todas as alíquotas descongeladas de cada paciente, tempo 30, 60, 90, 120 e 150 dias após criopreservação, percebeu-se presença de quase a totalidade de células com morfologia fibroblastoide, sendo que o tempo médio para adquirir 80% de confluência foi de seis dias, com desvio-padrão de 0,6, demonstrando a capacidade dessas células se multiplicarem em cultura após criopreservação (FIG. 6).

Para o último frasco descongelado de cada paciente, em que uma das culturas foi submetida a três passagens celulares, também não foram observadas diferenças na morfologia celular quando comparadas com as culturas antes da criopreservação. E o tempo médio para adquirir a confluência de 80% na primeira passagem foi de 2,7 dias, com desvio-padrão de 0,67; na segunda passagem, foi

de 2,9 dias, com desvio-padrão de 0,74; e na terceira passagem, foi de 2,9 dias, com desvio-padrão de 0,57, não havendo diferenças estatisticamente significativas quando comparado com a primeira, segunda e terceira passagens celulares realizadas antes da criopreservação (valor $p=0,58$, $0,97$ e $0,74$, respectivamente), o que demonstra que as células em questão mantêm a capacidade de se multiplicar em cultura mesmo após os procedimentos de criopreservação, degelo e três passagens celulares.

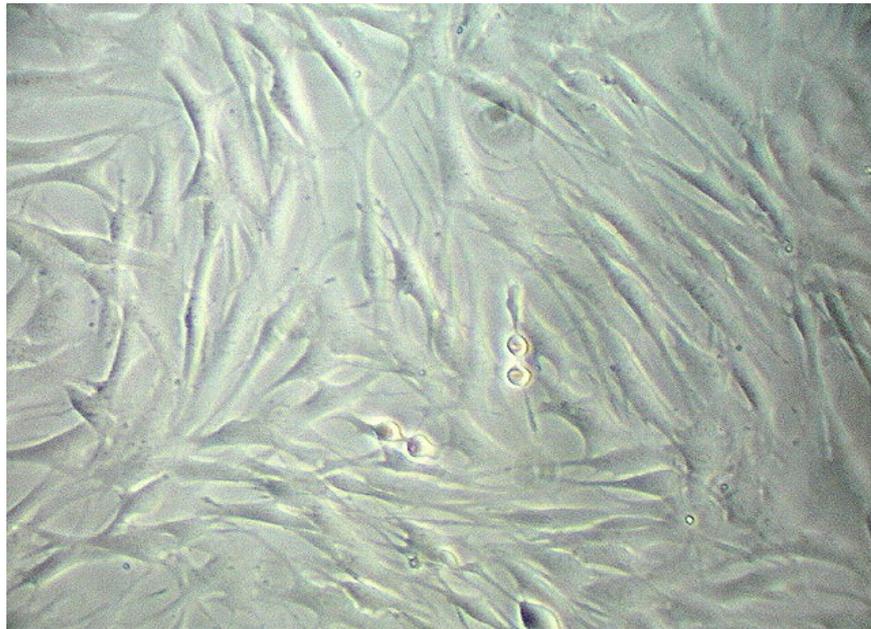


FIGURA 6 - Cultura de células do paciente 1 após 150 dias de criopreservação.

5.5 Cariótipo

Entre as amostras cultivadas, cinco apresentaram cariótipo 46,XX, quatro apresentaram cariótipo 46,XY e uma apresentou cariótipo 69,XXY. Visando investigar a manutenção do conjunto cromossômico após o cultivo celular prolongado (três passagens) e pela criopreservação nos diversos tempos deste estudo, foi comparada a constituição cromossômica após esses eventos com os cariótipos anteriormente descritos e em nenhuma das amostras avaliadas foi constatada diferença (FIG. 7).

No que diz respeito a alterações não-clonais, na cultura inicial do paciente 4, o qual apresentou cariótipo masculino normal, foi visualizada uma célula com

trissomia do cromossomo 22. Essa alteração não foi visualizada nas culturas após três passagens e nas culturas descongeladas após criopreservação nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 dias.

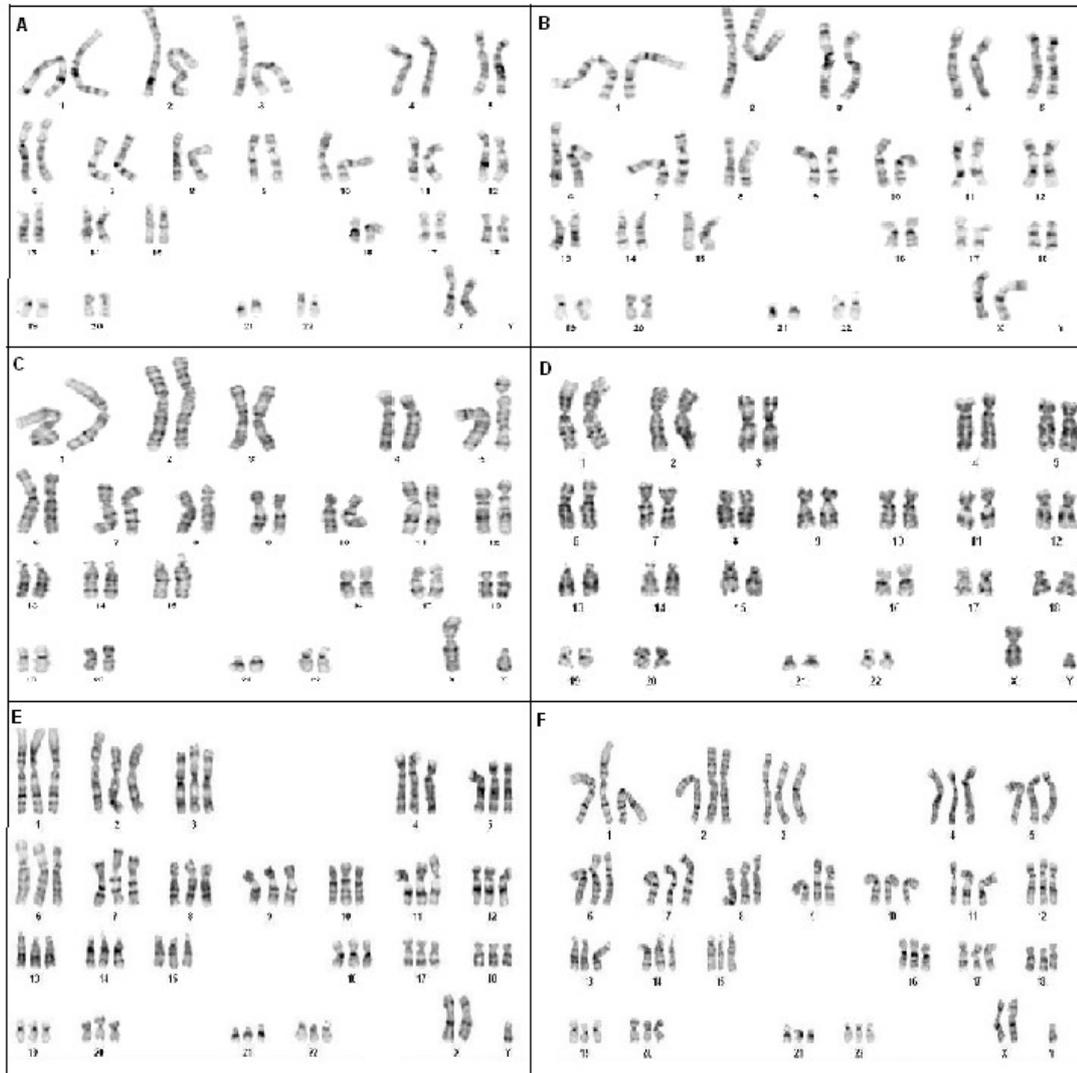


FIGURA 7 – Cariótipos pacientes 1,2 e 5 antes e após a criopreservação.

A) Cariótipo feminino normal do paciente 1 antes da criopreservação; B) Cariótipo feminino normal do paciente 1 após 150 dias de criopreservação; C) Cariótipo masculino normal do paciente 2 antes da criopreservação; D) Cariótipo masculino normal do paciente 2 após 150 dias de criopreservação; E) Cariótipo triploide do paciente 5 antes da criopreservação; F) Cariótipo triploide do paciente 4 após 150 dias de criopreservação.

5.6 Capacidade de diferenciação celular

5.6.1 Diferenciação adipogênica

A capacidade de diferenciação adipogênica foi constatada em todas as amostras deste estudo, a qual foi demonstrada pela presença de células globosas apresentando microvacúolos visualizados sobre microscopia óptica invertida durante a cultura de células induzida. A existência de microvacúolos pode ser detectada, em média, três dias após indução adipogênica da cultura, com desvio-padrão de 0,8; e a morfologia celular começou a demonstrar alteração após cinco dias de indução (FIG. 8).

Quando as culturas foram coradas por *oil red O* após duas semanas do início da indução, ressaltaram-se microvacúolos corados de vermelho-alaranjado, em média, em 80% das células cultivadas, com desvio-padrão 8,1, demonstrando a presença de gotículas lipídicas, o que identificou a diferenciação adipogênica (FIG. 9B).

Quando se avaliou a manutenção da capacidade de diferenciação após 150 dias de criopreservação, realçaram-se as mesmas características descritas anteriormente, não havendo diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois procedimentos (FIG. 10). As culturas apresentaram, em média, 80% de células *oil red* positivo, com desvio-padrão de 6,6.

O controle negativo de diferenciação não apresentou qualquer uma dessas características descritas, relatando-se apenas células coradas de roxo, sem a vigência de vacúolos *oil red* positivo, para todas as amostras testadas neste estudo (FIG. 9A).



FIGURA 8 – Cultura de células do paciente 1 após cinco dias de indução adipogênica.

Notam-se a morfologia globosa e a presença de microvacúolos citoplasmáticos (aumento de 400X).

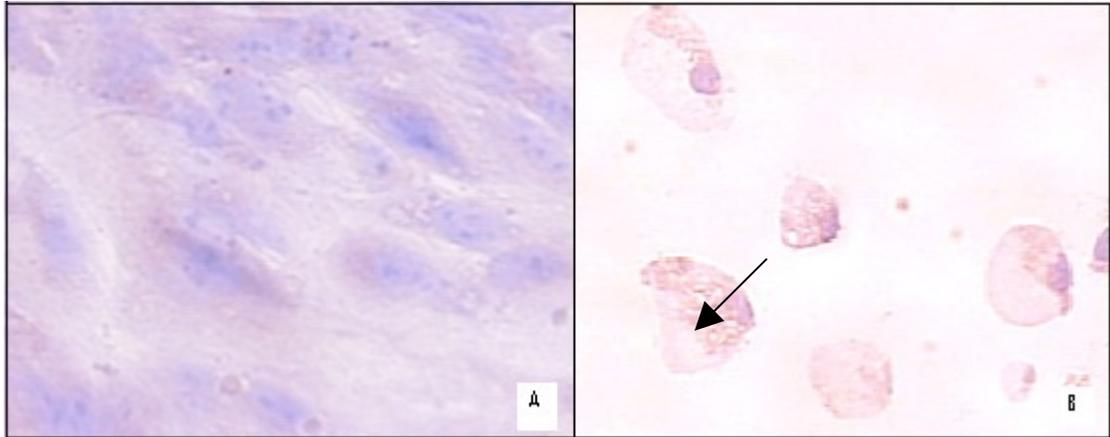


FIGURA 9 - Cultura de células do paciente 1 sem e com indução corada por *oil red O*.

A) Cultura de células do paciente 1 sem indução corada por *oil red O*; B) Cultura de células do paciente 1 induzida à diferenciação adipogênica corada por *oil red O*. Nota-se na FIG. 9A a morfologia fibroblastoide negativa para coloração *oil red O*. E na FIG. 9B a morfologia globosa com presença de microvacúolos positivos para a coloração *oil red O*, indicada pela seta (aumento de 400X).

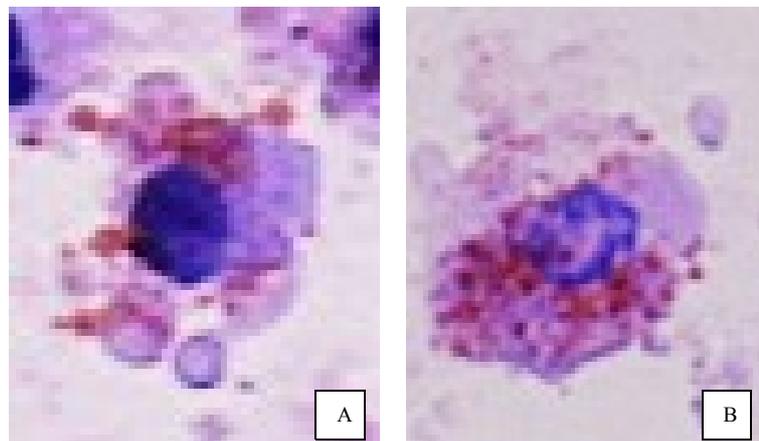


FIGURA 10 – Cultura de células do paciente 1 antes e 150 dias após a criopreservação.

Notam-se gotículas lipídicas coradas de vermelho. A) Cultura de células do paciente 1 antes da criopreservação induzida à diferenciação adipogênica por duas semanas e coradas por *oil red O*; B) Cultura de células do paciente 1 após 150 dias de criopreservação induzida à diferenciação adipogênica por duas semanas e corada por *oil red O* (aumento de 1.000X).

5.6.2 Diferenciação condrogênica

A capacidade de diferenciação condrogênica, salientada inicialmente em todas as amostras deste estudo, foi identificada pela existência de células positivas para coloração PAS-AB após três semanas da indução. A reação foi considerada positiva nas células que apresentaram vacúolos citoplasmáticos corados de azul, o que representa glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas, e/ou nas células que apresentaram vacúolos citoplasmáticos corados de magenta, o que representa glicoproteínas neutras, ambas presentes no tecido cartilaginoso, o que identifica a diferenciação condrogênica. A positividade foi relatada em todas as amostras estudadas, em média, em 70% das células analisadas, com desvio-padrão de 8,1 (FIG. 11B).

Quando se analisou a manutenção da capacidade de diferenciação após 150 dias de criopreservação, foram observadas as mesmas características descritas anteriormente, não havendo diferenças significativas entre os resultados obtidos nos dois procedimentos (FIG. 12). As culturas induzidas após criopreservação apresentaram, em média, 70% de células PAS-AB positivo, com desvio-padrão de 5,7.

O controle negativo de diferenciação não apresentou nenhuma das características mencionadas, exibindo apenas células coradas de roxo, sem a presença vacúolos PAS-AB positivo (FIG. 11 A).

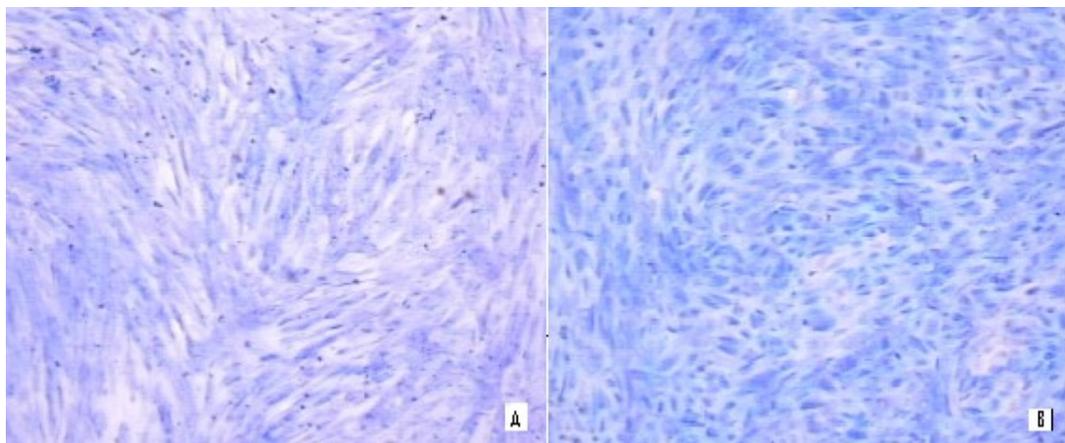


FIGURA 11 – Cultura de células do paciente 1, com e sem indução à diferenciação condrogênica.

Nota-se diferença na coloração. A) Cultura de células do paciente 1 sem indução, apresentando coloração roxa (negativa para coloração PAS-AB); B) Cultura de células do paciente 1 induzida à diferenciação condrogênica, apresentando coloração azul (positiva para coloração PAS-AB) – aumento de 100X.

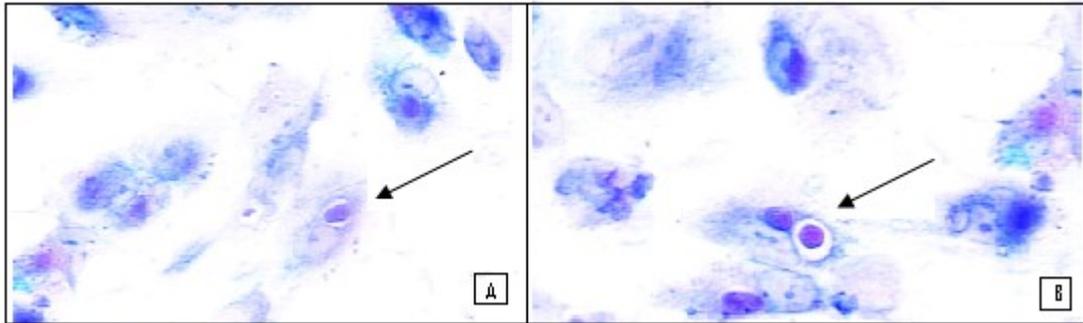


FIGURA 12 – Cultura de células do paciente 2 antes e 150 dias após a criopreservação.

Nota-se a presença de células com vacúolos citoplasmáticos corados de azul e magenta. A) Cultura de células do paciente 2 antes da criopreservação, induzida à diferenciação condrogênica por três semanas e coradas por PAS-AB; B) Cultura de células do paciente 2 após 150 dias de criopreservação induzida à diferenciação condrogênica por três semanas e coradas por PAS-AB (aumento de 1.000 X).

5.6.3 Diferenciação osteogênica

A capacidade de diferenciação osteogênica foi constatada em todas as amostras deste estudo, a qual foi determinada pelas células positivas para a coloração *von kossa*, após duas semanas da indução. A reação foi considerada positiva nas culturas em que foram verificados depósitos corados de preto intracelular ou extracelular, o que representa acúmulo de cálcio, caracterizando a diferenciação osteogênica. A positividade foi referida em todas as amostras, em média, em 60% das células analisadas, com desvio-padrão de 12,47. Para as duas amostras, as quais foram incluídas em parafina, a positividade foi mais predominantemente extracelular (FIG. 13B).

Quando se considerou a manutenção da capacidade de diferenciação após 150 dias de criopreservação, registraram-se as mesmas características relatadas anteriormente, não havendo diferenças significativas entre os dois procedimentos (FIG. 14). As culturas induzidas após criopreservação apresentaram média de

60% das células analisadas positivas para coloração *von kossa*, com desvio-padrão de 12,9%.

O controle negativo de diferenciação não mostrou qualquer das características anteriormente mencionadas, apenas com células coradas de roxo com ausência de regiões positivas para a coloração *von kossa* (FIG. 13A).

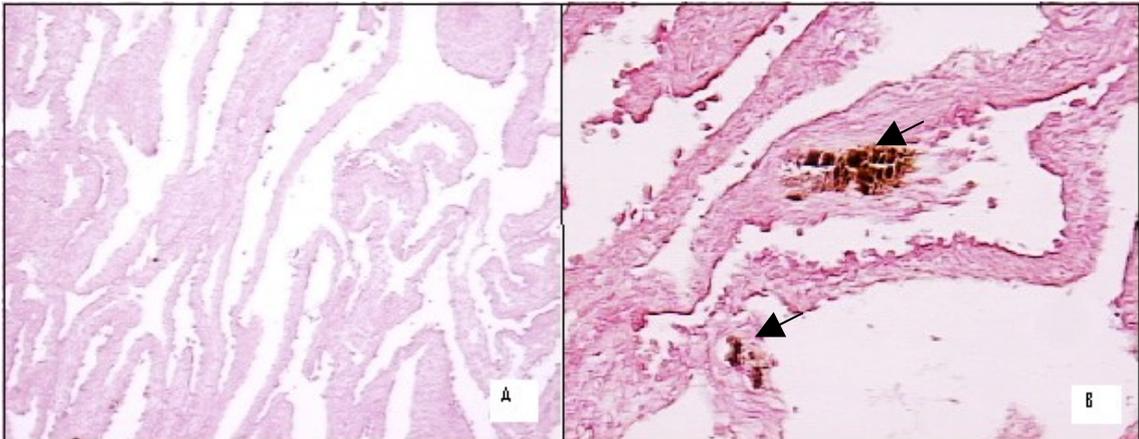


FIGURA 13 – Cultura de células do paciente 1, negativa e positiva para coloração *von kossa*.

A) Cultura de células do paciente 1 sem indução incluída em parafina, negativa para coloração *von kossa*; B) Cultura de células do paciente 1 induzida à diferenciação osteogênica, incluída em parafina, positiva para coloração *von kossa*. Destacam-se regiões indicadas pelas setas (aumento de 400X).

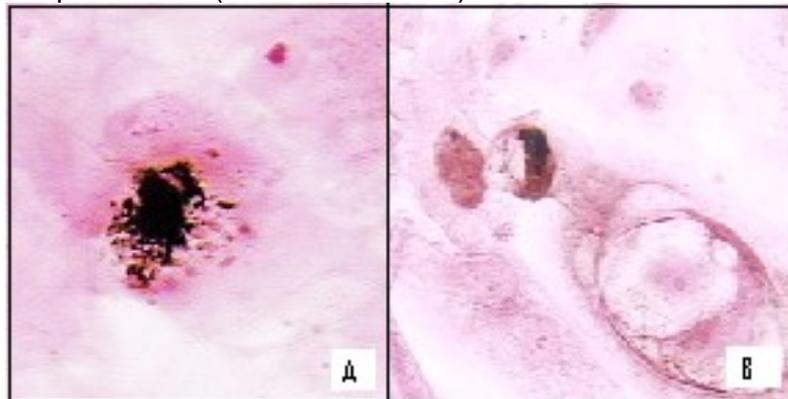


FIGURA 14 – Cultura de células do paciente 2 antes e 150 dias após a criopreservação induzida à diferenciação osteogênica.

Notam-se depósitos intracelulares de cálcio corados de preto, indicados pelas setas. A) Cultura de células do paciente 2 antes da criopreservação induzida à diferenciação osteogênica por duas semanas e positivas para a coloração *von kossa*; B) Cultura de células do paciente 2 após 150 dias de criopreservação induzida à diferenciação osteogênica por duas semanas e positiva para a coloração *von kossa*.

5.7 Expressão gênica OCT- 4: quantificação relativa

Os dois ensaios pré-desenhados possuem eficiência de amplificação de 100%, +/- 10%, que é uma das exigências para a utilização de GAPDH como controle endógeno para avaliar a expressão de RNAm de OCT-4, gene associado à pluripotência e à renovação celular. Anteriormente à análise final, foi feita uma avaliação dos resultados obtidos individualmente de cada amostra. Os resultados inadequados foram omitidos da análise e os pontos de limiar, do inglês *threshold*, e a linha de base foram ajustados de acordo com o fabricante. Para a análise da quantificação da expressão gênica de OCT-4 antes e após a criopreservação, as amostras foram avaliadas separadamente, omitindo-se todas as outras, sendo que aquela de antes da criopreservação foi selecionada como de referência e comparada com a mesma amostra após a criopreservação.

Das 10 amostras estudadas, apenas para uma não foi possível obter amplificação em nenhum dos dois tempos estudados (paciente 4). Para as demais, quando se avaliou o efeito da criopreservação por 150 dias sobre a expressão gênica desse transcrito, houve variação no nível de expressão após esse procedimento, entretanto, essa variação não seguiu uma tendência. Considerando as amostras antes da criopreservação como referência, as culturas dos pacientes 2, 5, 6, 8 e 9 tiveram redução no nível de expressão após criopreservação (FIG. 15 B, D, E, G, H) e as culturas dos pacientes 1, 3, 7 e 10 apresentaram aumento nesse nível após criopreservação (FIG. 15 A, C, F, I). Sendo assim, a variação ocorrida na expressão gênica antes e após a criopreservação não pode ser justificada por esse processo, nem por sua influência nos processos regulatórios de OCT-4.

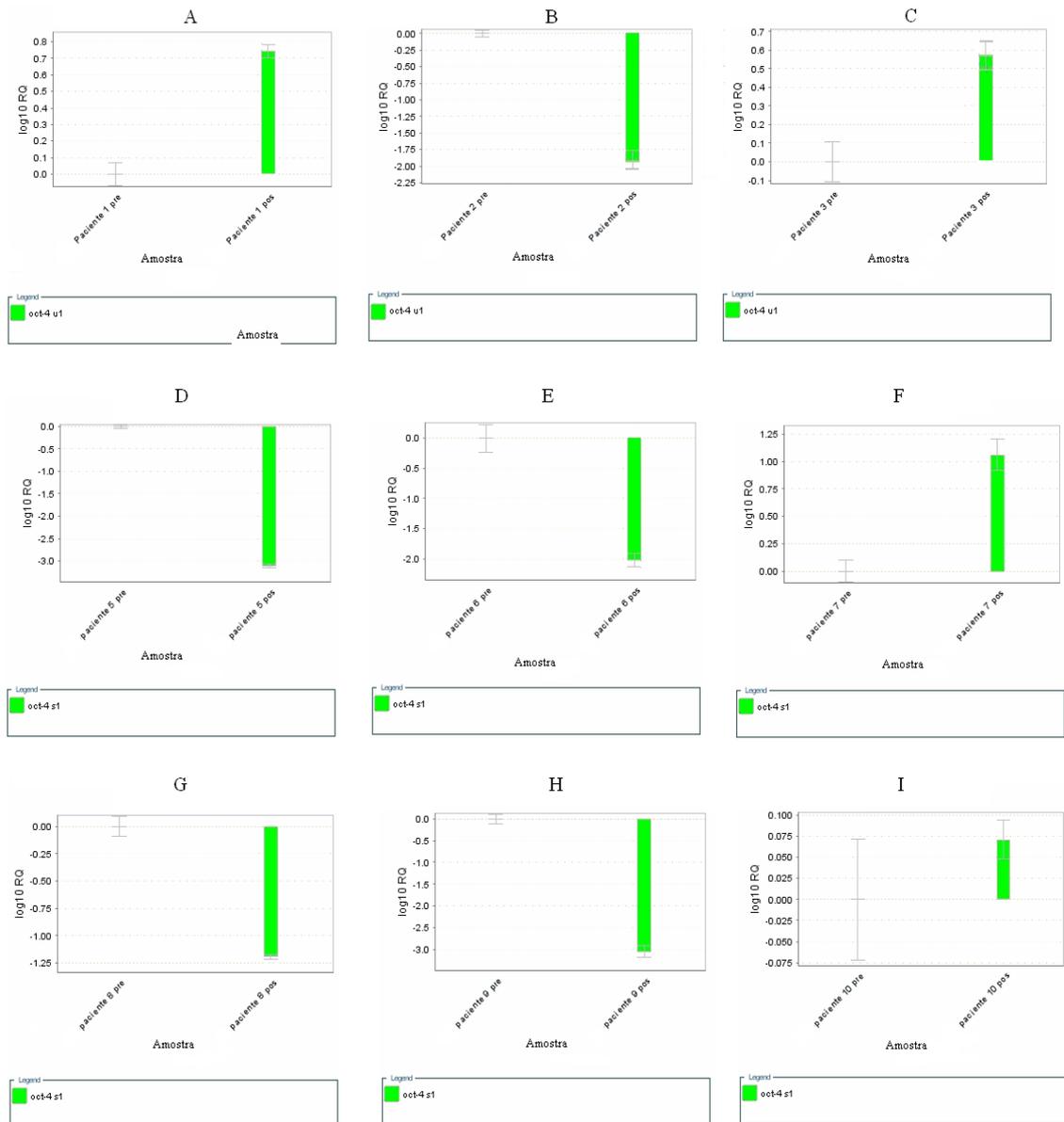


FIGURA 15 - Gráficos representando a expressão gênica de OCT-4

para as nove amostras em que foi obtida a amplificação.

A) paciente 1; B) paciente 2; C) paciente 3; D) paciente 5; E) paciente 6; F) paciente 7; G) paciente 8; H) paciente 9; I) paciente 10.

5.8 Imunofenotipagem

Os resultados obtidos a partir da análise por citometria de fluxo demonstraram que as células cultivadas do líquido amniótico humano possuem características imunofenotípicas específicas de células-tronco mesenquimais. A expressão foi muito baixa (< 5%) para os marcadores CD14, CD45, CD34 e para o complexo de histocompatibilidade MHC de classe II HLA-DR, sendo considerados negativos. A expressão foi alta (>70%) para os antígenos característicos de células-tronco mesenquimais CD90, CD105 e CD73,

considerados positivos, sendo que a viabilidade celular foi >90% quando avaliada pelo marcador de exclusão de viabilidade 7AAD (FIG. 16, 17 e 18).

Os resultados da imunofenotipagem estão representados na forma de *dot plotting* e a proporção das células encontra-se distribuída de acordo com o tamanho celular *forward side scatter* (FSC) e complexidade interna *side scatter* (SSC) (FIG. 16, 17, 18).

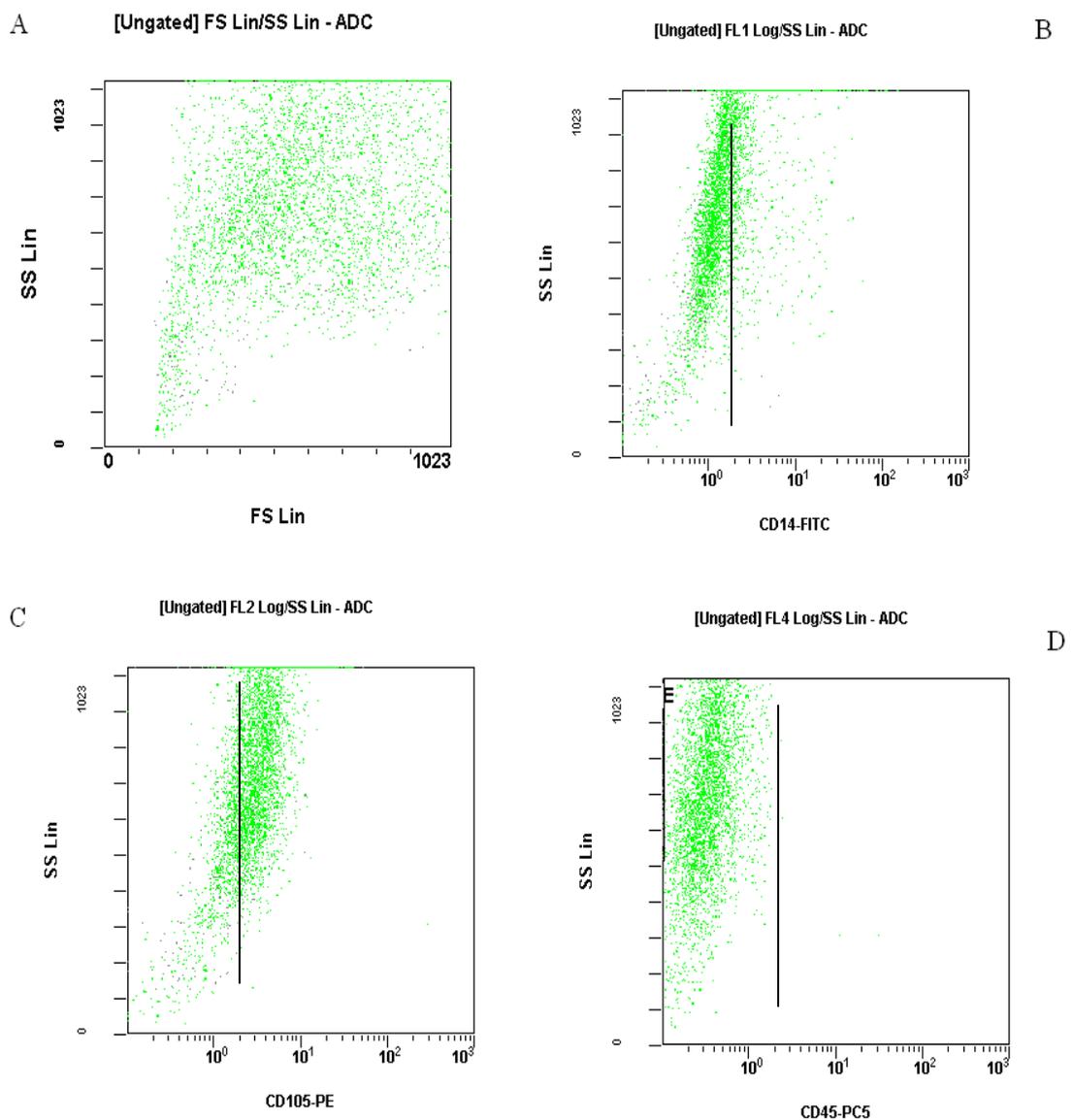


FIGURA 16 - *Dot plotting* da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando características de expressão dos antígenos de superfície dessas células.

A) Distribuição das células segundo tamanho (FS) e complexidade (SS); B) Expressão do antígeno CD14 > 5%; C) Expressão do antígeno CD105 < 70%; D) Expressão do antígeno CD45 > 5%.

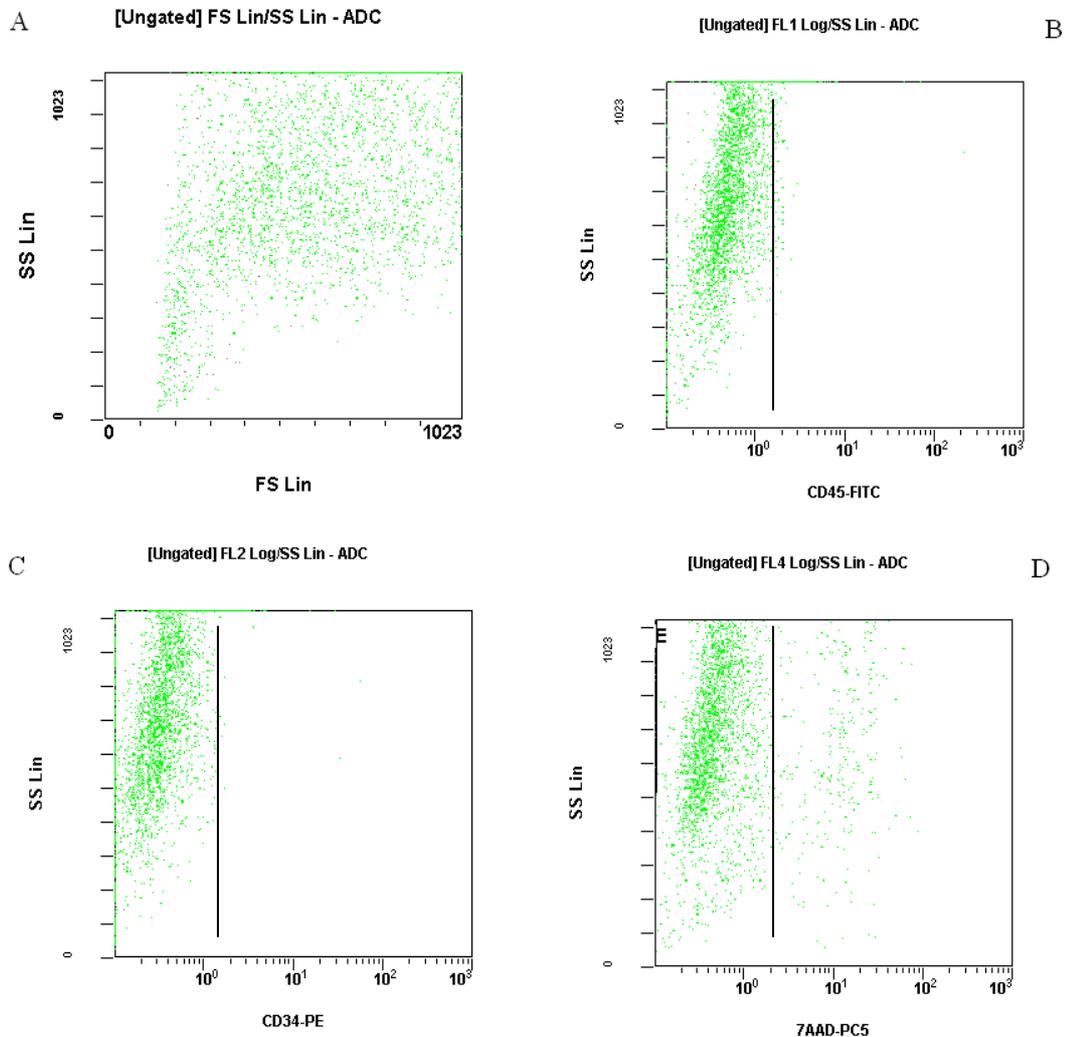


FIGURA 17 - *Dot plotting* da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando características de expressão dos antígenos de superfície dessas células.

A) Distribuição das células segundo tamanho (FS) e complexidade (SS); B) Expressão do antígeno CD45 < 5%; C) Expressão do antígeno CD34 < 5%; D) Viabilidade celular > 70% pelo marcador de exclusão de viabilidade 7AAD.

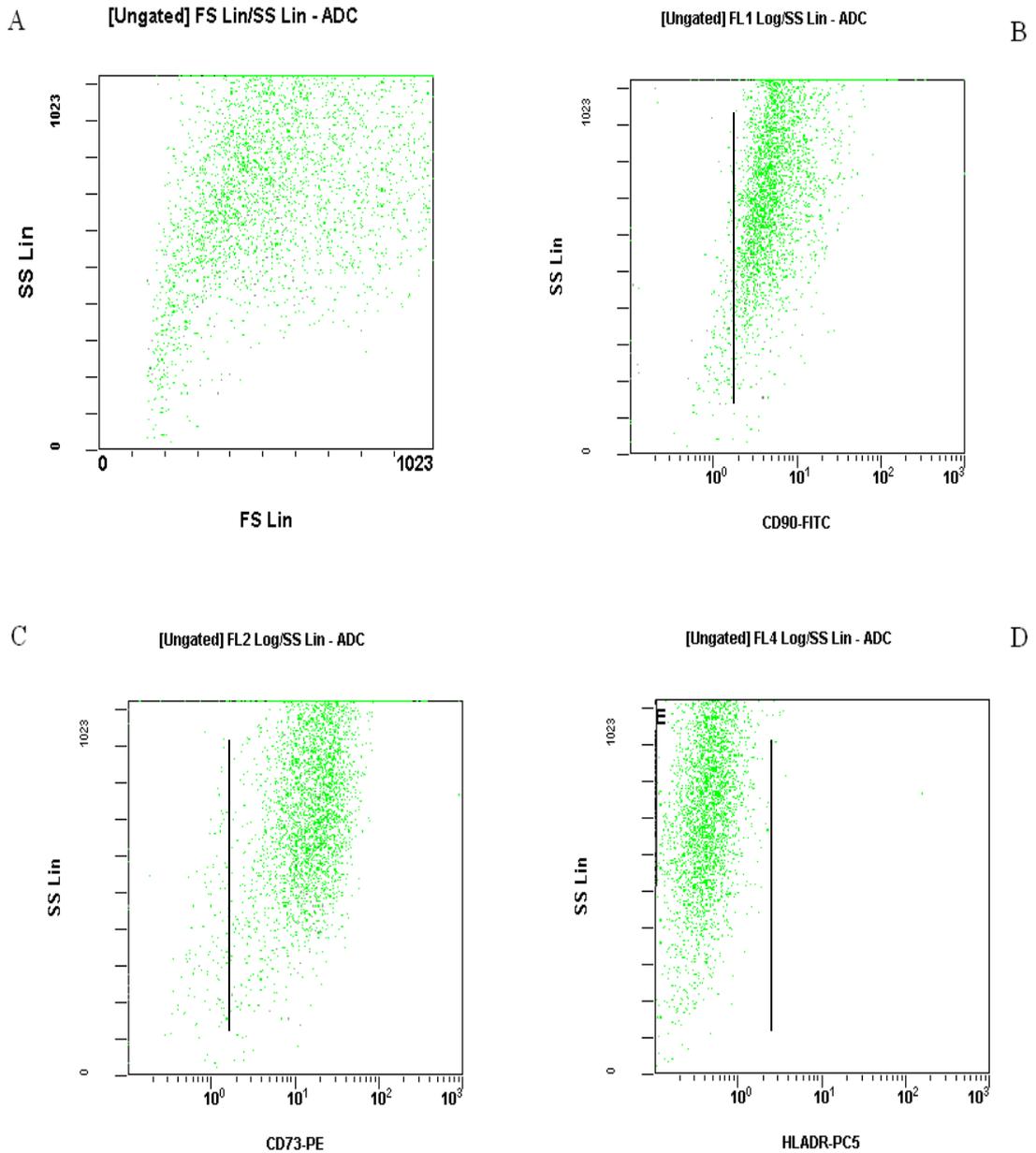


FIGURA 18 - *Dot plotting* da aquisição, pelo citômetro de fluxo, das células mesenquimais cultivadas do líquido amniótico demonstrando características de expressão dos antígenos de superfície dessas células.

A) Distribuição das células segundo tamanho (FS) e complexidade (SS); B) Expressão do antígeno CD90 > 70%; C) Expressão do antígeno CD73 > 70%; D) Expressão do antígeno HLA-DR < 5%.

6 DISCUSSÃO

Intensas pesquisas refletem o grande interesse no estudo das propriedades das células mesenquimais obtidas do líquido amniótico, as possibilidades de isolamento e cultura, as capacidades de diferenciação e, em especial, a sua potencial aplicação em terapia celular (MIKI *et al.*, 2005; PRUSA; HENGSTSCHLAGER, 2002; TSAI *et al.*, 2006). Essas células têm demonstrado muita capacidade de diferenciação *in vitro* e, além disso, possuem a característica de expressar genes relacionados à pluripotência (KARLMARC *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007).

Há um vasto campo de pesquisa para possíveis aplicações terapêuticas dessas células em inúmeras doenças metabólicas, gênicas, imunológicas e degenerativas, nas quais ocorre perda funcional ou estrutural de determinado tecido (diabetes, fibrose cística, doenças neurológicas, cardiopatias, doenças do tecido conjuntivo e hematopoiético). Vislumbra-se particular interesse também nas possibilidades do uso dessas células para terapia celular intrauterina. Embora a maioria dos defeitos congênitos seja de tratamento pós-natal, alguns passíveis de correção intrauterina apresentam alto risco materno e fetal, principalmente ruptura de membranas e prematuridade. Portanto, técnicas menos invasivas e a possível transplantação dessas células prometem expandir as possibilidades de tratamento intrauterino de algumas doenças.

Neste contexto, as células fetais obtidas de tecidos como placenta e líquido amniótico mostram-se como uma boa opção de trabalho, uma vez que parecem ter características de células pluripotentes sem os empecilhos éticos, legais e técnicos que envolvem a manipulação de células-tronco embrionárias (BOSSOLASCO *et al.*, 2006; DE COPPI *et al.*, 2007).

Estudos prévios demonstraram que o líquido amniótico humano contém células que expressam o marcador de célula-tronco embrionária, OCT-4 (TSAI *et al.*, 2004) e que o mesmo é uma fonte de células-tronco mesenquimais (CTM) que são fenotipicamente semelhantes às CTMs da medula óssea. Essas células do líquido amniótico humano foram consideradas capazes de diferenciarem-se em células adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e neurogênicas (KIM *et al.*, 2007; PRUSA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2004, 2006).

Apesar de todos os estudos citados ressaltarem a capacidade de células derivadas de líquido amniótico se diferenciarem em vários tipos celulares distintos e indicarem potencial terapêutico, sua preservação até uma provável utilização ainda foi pouco abordada. É sabido que células mantidas em cultura durante períodos relativamente longos entram em processo de envelhecimento celular, podendo perder características como plasticidade (BONAB *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007). Desta forma, a criopreservação, técnica avaliada por este estudo, adquire muita importância como alternativa de armazenamento celular por longos períodos.

Para este estudo, o líquido amniótico deveria ser proveniente de gestações de segundo e terceiro trimestres, com idade gestacional mínima de 15 semanas, visto que quando o procedimento é realizado antes dessa idade, pode acarretar mais riscos à gestante e ao feto, embora, teoricamente, possa oferecer outra população celular, possivelmente mais primitiva. A escolha de amostras na ocasião do parto certamente reduziria o risco de punção pré-natal com a obtenção de células com imunofenótipo, potencial de expansão e diferenciação semelhantes (YOU *et al.*, 2008). Porém, como a proposta inicial da pesquisa era o estudo das CTMs, para possível manipulação no período pré-natal, a obtenção das amostras no momento do parto seria tardia. Para outras aplicações, no neonato, infante ou até mesmo no adulto, esta abordagem se tornaria interessante.

Com o intuito de verificar as interferências de alterações cromossômicas nas características das células cultivadas, não foram excluídas deste estudo amostras de gestações em que o feto era portador de quaisquer alterações no cariótipo. Por outro lado, foi prevista a exclusão, deste estudo, das amostras que apresentavam contaminação por sangue, a fim de prevenir-se da contaminação por células maternas, entretanto, essa exclusão não se fez necessária.

Quanto ao meio de cultura utilizado neste trabalho, a escolha pelo amniomax decorreu do fato de que o mesmo proporcionou o melhor índice de proliferação das células cultivadas do líquido amniótico, quando comparado com outro meio testado, publicado em um estudo prévio (CABRAL *et al.*, 2008). Observaram-se, também, diferenças no índice de proliferação celular quando testados diferentes suplementos para esse meio em um estudo prévio, sendo que

o suplemento próprio para o meio em questão demonstrou melhor desempenho (dados não publicados).

Não se mostrou necessária a adição do fator de crescimento de fibroblastos, gelatina, fibronectina ou colágeno para facilitar a aderência celular ao frasco de cultura. Outros autores, contudo, empregaram esse método provavelmente por usarem um meio diferente, relacionado a menor potencial de expansão das CTMs (KUNISAKI *et al.*, 2007; STEIGMAN *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que o soro presente no meio de cultura utilizado no presente estudo e nos demais citados exerce importante função no crescimento celular, pelos fatores de crescimento, aminoácidos e proteínas que o constituem. Porém, isso pode gerar controvérsias quando se pensa no emprego dessas células em humanos, pois como apresentam componentes de origem não-humana, podem acarretar riscos, como o de serem veículo de vírus estranhos ao ser humano como também de príons, reações inflamatórias e imunes locais, pela contaminação com proteínas bovinas, mesmo após lavagens repetidas da cultura, podendo levar à formação de anticorpos e consequente rejeição das células transplantadas (COBO; TALAVERA; CONCHO, 2006; MACKENSEN *et al.*, 2000; TUSCHONG *et al.*, 2002). Desta forma, alguns estudos vêm buscando a eliminação de componentes de origem bovina nos meios de cultura utilizados para a expansão dessas células (NIMURA *et al.*, 2008; STUTE *et al.*, 2004).

Em publicação recente, o soro fetal bovino foi substituído pelo soro humano como suplementação em meio de cultura para cultivo de células mesenquimais da medula óssea, obtendo-se resultado semelhante quando utilizado soro bovino ou humano (NIMURA *et al.*, 2008). Em contrapartida, outro estudo prévio semelhante mostrou discordância desse resultado, com baixo potencial de crescimento nas células cultivadas com meio de cultura suplementado com soro humano (STUTE *et al.*, 2004). Assim, faz-se necessário número mais elevado de estudos neste aspecto, para, então, haver padronização sobre o cultivo das CTMs quando se pensa na inclusão destas no contexto da terapia celular.

Na presente pesquisa, as células isoladas do líquido amniótico humano tiveram a capacidade de formar colônias aderentes com células em forma de espícula, sendo capazes de se multiplicar *in vitro*. Essas células apresentaram inicialmente morfologia heterogênea, sendo que após três passagens se tornaram

morfologicamente homogêneas, exibindo consistentemente morfologia semelhante a fibroblasto, como também relatado por Kim *et al.* (2007).

Vale salientar que as características registradas nas culturas deste estudo são condizentes com a morfologia descrita inicialmente por Friedenstein, Chailakhjan e Lalykina (1970) para células-tronco mesenquimais. Essas características morfológicas foram mais tarde também relatadas por vários outros autores (KIM *et al.*, 2007; LEE, O. *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2004, 2006).

Além da morfologia característica das células-tronco mesenquimais, as células isoladas do líquido amniótico demonstraram características imunofenotípicas específicas dessas células (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; OSWALD *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2006). A expressão foi inferior a 5% para os marcadores CD14, CD45, CD34 e para o complexo de histocompatibilidade MHC de classe II HLA-DR e superior a 70% para os antígenos característicos de células-tronco mesenquimais CD90, CD105 e CD73, como também destacado por Steigman *et al.* (2008), que preconizou definirem-se protocolos de cultura, criopreservação e degelo de células-tronco do líquido amniótico humano para possíveis fins terapêuticos.

Em consenso publicado por Chamberlain *et al.* (2007), em que destaca o fenótipo das células-tronco mesenquimais, sustentam-se os resultados encontrados no presente estudo. Um ano mais tarde, outro consenso publicado por Paroline *et al.* (2008), que visou a padronizar a caracterização de células-tronco da placenta a termo, citou achados imunofenotípicos semelhantes para as células desse tecido, quando avaliada a expressão dos mesmos antígenos de superfície testados nesse estudo, revelando semelhança entre o padrão imunofenotípico para as células mesenquimais das diferentes fontes. Quando comparadas com as células-tronco derivadas da medula óssea, essas células também sustentam o padrão imunofenotípico semelhante (OSWALD *et al.*, 2004). Diferentemente, entretanto, foi observado neste estudo uma pequena expressão dos marcadores hematopoiéticos, o que não foi relatado por Oswald *et al.* (2004). Esse fato pode estar relacionado à presença de diferentes populações celulares originalmente no líquido amniótico, tendo em vista que, apesar da tentativa de homogeneizar-se essa população celular por meio da realização de passagens celulares durante a cultura, nenhum método de isolamento específico de células foi utilizado.

Além da identificação das CTMs baseada nas suas características morfológicas ou fenotípicas, um caminho posterior para identificação dessas células é a averiguação da sua capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Neste estudo a diferenciação osteogênica foi obtida do meio indutor suplementado com soro bovino fetal, dexametasona, β -glicerol fosfato, L-ácido ascórbico e di-hidroxitamina D3, conforme descrito por outros autores (BAKSH; YAO; TUAN, 2007; PAROLINE *et al.*, 2008). A identificação dessa diferenciação ocorreu pela demonstração da produção de cálcio pelas células coradas por *von kossa*, método também bastante utilizado (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; KERN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; LEE, O. *et al.*, 2004).

A diferenciação adipogênica foi obtida do meio indutor suplementado com dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina, insulina humana e indometacina, conforme a literatura (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; SUDO *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2004). A identificação dessa diferenciação ocorreu pela presença de células *oil red* positivo, técnica também usada em diversas pesquisas (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; KERN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; LEE, K. *et al.*, 2004).

A diferenciação condrogênica foi obtida do meio indutor suplementado ITS+1, dexametasona, ácido ascórbico, piruvato de sódio, L-prolina e TGF β 1, conforme descrito por Lee, O. *et al.* (2004) e Kim *et al.* (2007). A identificação dessa diferenciação ocorreu pela presença de células PAS-AB positivas, conforme também referido por Kim *et al.* (2007).

Os ensaios de diferenciação celular enfatizaram que as células cultivadas do líquido amniótico humano têm o potencial de diferenciação na linhagem mesodermal, como também reportado em diversos estudos que caracterizaram células-tronco mesenquimais de diversas fontes (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; KERN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2007; LEE, O. *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, a diferenciação na linhagem mesodermal é empregada frequentemente na caracterização das células-tronco mesenquimais, entretanto, salienta-se que o potencial de diferenciação condrogênica e osteogênica é de muita importância clínica na regeneração da cartilagem ou na regeneração óssea quando se pensa no emprego dessas células no contexto da terapia celular (HORWITZ *et al.*, 1999, 2002; MANO; REIS, 2007).

Tendo em vista que subcultivos extensos comprometem a viabilidade celular pelo aparecimento de sinais evidentes de senescência celular, a criopreservação das células mesenquimais do líquido amniótico reveste-se de importância clínica, uma vez que essas células poderão ser colhidas ainda no período pré-natal e poderão ser armazenadas para que possam ser utilizadas em tratamentos no pós-parto imediato ou até mesmo tardio. Neste estudo, as células cultivadas e criopreservadas do líquido amniótico humano foram comparadas com células provenientes da mesma cultura antes da criopreservação quanto à capacidade de proliferação celular, viabilidade celular, capacidade de diferenciação celular, expressão do gene OCT-4 e manutenção do cariótipo.

Quando se avaliaram a morfologia celular e o tempo de cultura necessário para adquirir 80% de confluência entre as passagens celulares nas culturas reiniciadas após 150 dias de criopreservação, não foram visualizadas diferenças entre os dados anteriormente relatados para as mesmas culturas antes da criopreservação, o que indica que a criopreservação não afetou a capacidade de expansão *in vitro* dessas células, nem suas características morfológicas, como também demonstrado por outros autores (PENTZ; HORLER, 1980; STEIGMAN *et al.*, 2008; WOODBURY *et al.*, 2006).

Quando se avaliou a viabilidade celular antes e após criopreservação, houve perda de viabilidade de 5,4%, mantendo-se, ainda, 88,8% das células viáveis. Estes dados são compatíveis com os achados de Steigman *et al.* (2008), que também adotaram o congelamento com taxa programada.

A principal razão para usar taxa de congelamento controlada em vez de simplesmente colocar as amostras em ambientes frios é que a temperatura, compensação fornecida para a liberação do calor latente, resulta em melhor viabilidade celular pós-criopreservação (BROCKBANK; COVAULT; TAYLOR, 2003). Essa abordagem aproveita-se das propriedades do gelo extracelular, utilizando-se o congelamento lento (KARLSSON; TONER, 1996).

Como demonstrado na literatura, o líquido amniótico contém células que expressam o gene OCT-4, um marcador de pluripotência celular (PRUSA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2004). Neste estudo, avaliou-se a expressão desse gene após 150 dias de criopreservação quando comparada com a expressão prévia a esse procedimento, no qual foi registrada variação no nível de expressão, que não seguiu uma tendência. Desta forma, a variação ocorrida na expressão gênica

antes e após a criopreservação não pode ser justificada por esse processo, nem por sua influência nos processos regulatórios de OCT-4, podendo estar associada a outros fatores.

O gene OCT-4 é frequentemente descrito como marcador das células-tronco embrionárias, contudo, outros genes participam, juntamente com ele, da manutenção da pluripotência e do estado indiferenciado dessas células, podendo-se citar os genes SOX2 e NANOG (ALBERIO; CAMPBELL; JOHNSON, 2006; DARR; MAYSHAR; BENVENISTY, 2006; PRIOR; WALTER, 1996). Como realçado por outros autores, a expressão desses genes não é exclusiva das células-tronco embrionárias, estando expressos também nas células-tronco mesenquimais (GRECO; LIU; RAMESHWAR, 2007; PRUSA *et al.*, 2003).

Baseado nos estudos que enfatizaram a expressão do gene OCT-4 em CTM do líquido amniótico (KIM *et al.*, 2007; PRUSA *et al.*, 2003; TSAI *et al.*, 2004), na presente investigação buscou-se identificar se o procedimento de criopreservação interferiria de alguma forma na expressão desse gene. Apesar de não ter sido revelada correlação das variações nos níveis de expressão de OCT-4 com esse procedimento, não se pode afirmar sobre a pluripotência dessas células com base apenas neste ensaio. No que diz respeito às CTMs do líquido amniótico, há comprovação de sua capacidade de diferenciação em células derivadas das três linhagens germinativas (DE COPPI *et al.*, 2007), há descrição da formação de corpos embrioides (WANG *et al.*, 2008), mas ainda se faz necessária a realização de testes mais específicos para que, então, seja confirmada a pluripotência dessas células.

Quando avaliada a capacidade de diferenciação na linhagem mesodermal após 150 dias de criopreservação, inferiu-se que esse procedimento não influenciou no potencial multipotente dessas células. Woodbury *et al.* (2006) também salientaram a capacidade de diferenciação de uma linhagem de células cultivadas do líquido amniótico e criopreservadas por 32 anos, obtendo sucesso na diferenciação osteogênica e neurogênica, mas não na diferenciação adipogênica. Entretanto, neste estudo não foram realizados experimentos de diferenciação dessas células antes da criopreservação para verificar se essa linhagem celular única tinha esse potencial. Vários trabalhos relataram o potencial de diferenciação das CTMs do líquido amniótico, contudo, poucos evidenciaram

essa capacidade após criopreservação (DE COPPI *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; PERIN *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2004, 2006).

Quando comparados com trabalhos que exploraram a diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea adulta humana, nossos resultados foram semelhantes. Xiang *et al.* (2007) demonstraram o potencial de diferenciação adipogênica, condrogênica e nerogência de células cultivadas da medula óssea após criopreservadas e descongeladas. Liu *et al.* (2008) verificaram o potencial de diferenciação osteogênica dessas células.

Além da capacidade de diferenciação celular, outra preocupação quando se pensa na utilização das células derivadas do líquido amniótico após cultivo e criopreservação é a estabilidade cromossômica dessas células após esses procedimentos. De fato, têm sido relatado a ocorrência de instabilidade cromossômica nas células-tronco embrionárias humanas quando estas são cultivadas continuamente (INZUNZA *et al.*, 2004). Entretanto, existem poucos trabalhos que verificaram a estabilidade cromossômica de células-tronco cultivadas de origem fetal ou adulta após subcultivos extensos ou criopreservação. Certamente, os telômeros fornecem estabilidade cromossômica durante as divisões celulares, apesar de que o telômero vai reduzindo-se gradualmente durante essas divisões, visto que a telomerase, enzima responsável pela manutenção dos telômeros, também diminui sua atividade durante subcultivos extensos (KIM *et al.*, 2007). Esses autores informaram a atividade da telomerase em células-tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico comparando essa atividade em culturas submetidas a cinco e a 21 passagens, referindo redução dessa atividade nas culturas de 21ª passagem.

No presente estudo, nas culturas submetidas a três passagens celulares, não foram encontradas mutações cromossômicas decorrentes desse procedimento, semelhantemente ao mencionado em outros trabalhos, que identificaram estabilidade cromossômica de CTM isolada do sangue de cordão umbilical e da medula óssea (KARAHUSEYINOGLU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007). Ampliando os dados relatados por esses trabalhos, assinalou-se a manutenção dos mesmos conjuntos cromossômicos após diversos tempos de criopreservação; e também não foram visualizadas alterações cromossômicas decorrentes desse processo.

O processo de criopreservação pode dar origem a dois grandes problemas: alterações morfológicas e cromossômicas, que levam a alterações na função celular e em sua viabilidade (DIAFERIA *et al.*, 2008). O congelamento e descongelamento em particular são responsáveis pela formação de bolhas intra e extracelulares, as quais induzem a segregação anormal dos cromossomos pelo rompimento das fibras do fuso mitótico; contudo, o uso combinado de DMSO e o resfriamento parecem reduzir muito os efeitos sobre os microtúbulos do fuso (DIAFERIA *et al.*, 2008; VICENT *et al.*, 1990).

Neste trabalho, constatou-se que a criopreservação com taxas de resfriamento controladas utilizando-se o crioprotetor DMSO possibilitou a recuperação de células viáveis e cromossomicamente estáveis.

Um único paciente apresentou uma célula com uma alteração numérica não-clonal na cultura inicial, que não havia sido submetida nem aos procedimentos de passagem celular, nem à criopreservação. Desta forma, a ocorrência dessa alteração não deve ser relacionada a esses procedimentos, podendo estar associada a fatores intrínsecos da amostra, da gestante ou até mesmo de alguma anomalia fetal. É interessante comentar que o paciente que apresentou resultado do cariótipo poliploide não exibiu diferença quanto aos ensaios realizados neste estudo, mantendo a capacidade de diferenciação celular.

O presente trabalho demonstrou que as células isoladas do líquido amniótico humano expressam os marcadores imunofenotípicos característicos de células-tronco mesenquimais e confirmou a capacidade de diferenciação em células de linhagem mesodermal (adipócitos, condrócitos e osteócitos). A partir de técnicas de criobiologia, essas células, que expressam o gene de pluripotência OCT-4, podem ser criopreservadas durante pelo menos cinco meses e serem recuperadas após esse período, mantendo sua capacidade de crescimento *in vitro*, capacidade de diferenciação e a expressão do gene OCT-4, indicando, assim, a manutenção de sua característica de célula-tronco. Além disto, a análise cariotípica dessas células indica que tanto a cultura quanto a criopreservação não induzem surgimento de aberrações cromossômicas, fato importante para uma possível utilização terapêutica.

Desta forma, as células derivadas de líquido amniótico mostram-se como uma grande promessa no campo de terapia celular, tendo sua provável aplicação

na regeneração tecidual autóloga. Este trabalho sugere que a técnica de criopreservação de células de líquido amniótico desenvolvida pode ser uma ferramenta extremamente útil na conservação dessas células coletadas durante a gestação. Entretanto, estudos ainda se fazem necessários para verificar sua capacidade de regeneração tecidual *in vivo*.

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho, caracterizando células cultivadas do líquido amniótico humano antes e após criopreservadas, permitiu concluir:

a) Quanto à caracterização das células cultivadas do líquido amniótico humano nas amostras analisadas

- As células do líquido amniótico humano demonstraram a capacidade de proliferação *in vitro*.
- As células do líquido amniótico apresentaram heterogeneidade morfológica, adquirindo morfologia fibroblastoide após três passagens, característica de células-tronco mesenquimais.
- As células cultivadas do líquido amniótico humano demonstraram padrão imunofenotípico característico de células-tronco mesenquimais.
- As células cultivadas do líquido amniótico humano demonstraram a capacidade de diferenciação em células da linhagem mesodermal (osteogênica, condrogênica e adipogênica).
- As células cultivadas do líquido amniótico apresentaram características que permitem classificá-las como células-tronco mesenquimais.

b) Quanto à manutenção das características celulares após cultivo, criopreservação e degelo

- As células do líquido amniótico permanecem viáveis após a criopreservação por cinco meses, utilizando taxa de congelamento controlada de 1°C por minuto.
- As células cultivadas do líquido amniótico não apresentaram alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais decorrentes dos procedimentos de cultivo celular, três passagens e cinco meses de criopreservação.
- Não ocorrem variações na morfologia celular, nem na capacidade de proliferação *in vitro*, após as células cultivadas do líquido amniótico serem criopreservadas por até cinco meses e reiniciadas em cultura.

- As células cultivadas do líquido amniótico humano mantiveram a capacidade de diferenciação em células da linhagem mesodermal após criopreservadas por cinco meses.
- A criopreservação não interferiu na expressão do marcador de pluripotência OCT-4.
- Não houve interferência de anormalidades cromossômicas constitucionais na capacidade de diferenciação celular, no perfil de expressão do gene OCT-4, nem no padrão imunofenotípico das células cultivadas do líquido amniótico.
- O protocolo de criopreservação testado foi eficiente para a conservação das células tronco mesenquimais cultivadas do líquido amniótico humano.

REFERÊNCIAS

ALBERIO, R.; CAMPBELL, K.H.; JOHNSON, A.D. Reprogramming somatic cells into stem cells. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 709-720, 2006.

ALVES, M.S.D.; CRUZ, V.L.B.C. **Embriologia**. Minas Gerais: Imprensa Universitária da UFMG, 8. ed., p. 9-106, 2007.

ANGELI, F.S.; OLIVEIRA, E.M. Terapia celular no tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Rev Bras Cardiol Invas**, v. 15, n. 2, p. 145-150, 2007.

BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R.S. Comparison of proliferative and multilineage Differentiation potential of Human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. **Stem cells**, v. 25, p. 1384-1392, 2007.

BÁRCENA, A. *et al.* A new role for the human placenta as a hematopoietic site throughout gestation. **Reprod Sci**, v. 16, n. 2, p. 178-187, 2009.

BARCH, M.J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J.L. **The AGT cytogenetics Laboratory Manual**. Philadelphia Lippincott-Raven, 3. ed., 1997.

BENACERRAF, B.R.; FRIGOLETTO, F.D. Amniocentesis under continuous ultrasound guidance: a series of 232 cases. **Obstet Gynecol**, v. 62, p. 760-764, 1983.

BERZ, D. *et al.* Cryopreservation of hematopoietic stem cells. **Am J Hematol**, v. 82, n. 6, p. 463-472, 2007.

BIANCO, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

BLANPAIN, C.; FUCHS, E. Epidermal stem cells of the skin. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 22, p. 339-373, 2006.

BLOMBERG, M. *et al.* Repetitive bone marrow transplantation in nonmyeloablated recipients. **Exp Hematol**, v. 26, p. 320-324, 1998.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. **Adv Cancer Res**, v. 100, p. 133-58, 2008.

[BONAB](#), M.M. *et al.* Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. **BMC Cell Biol**, v. 10, p. 7-14, 2006.

BOSSOLASCO, P. *et al.* Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. **Cell Res**, v. 16, n. 4, p. 329, Apr. 2006.

BOYER, L.A. *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-56, 2005.

BRACE, R.A. Amniotic fluid volume and its relationship to fetal fluid balance: review of experimental data. **Semin Perinatol**, v. 10, n. 2, p. 103-12, 1986.

- BRACE, R.A.** Physiology of amniotic fluid volume regulation. **Clin Obstet Gynecol**, v. 40, n. 2, p. 280-289, 1997.
- BROCKBANK, K.G.M.; COVAULT, J.C.; TAYLOR, M.J. Cryopreservation manual. **Thermo Electron Corporation**, p. 1-24, 2003.
- 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. **J Cell Biochem**, v. 64, n. 2, p. 278-294, 1994.
- BYDLOWSKI, S.P. *et al.* Células-tronco do líquido amniótico. **Rev Bras Hematol Hemot**, v. 31, p. 45-52, 2009.
- CABRAL, A.C.V. *et al.* Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células-tronco de líquido amniótico. **Rev Assoc Med Bras**, v. 54, n. 6, p. 489-93, 2008.
- CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal cells in human first fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 198, n. 8, p. 2396-2406, 2001.
- CAMPANA, S.G.; CHAVEZ, J.A.; HAAS, P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 39, n. 3, p. 215-218, 2003.
- CARPENTER, M.K. *et al.* Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. **Dev Dyn**, v. 229, p. 243-258, 2004.
- CASTRO-MALASPINA, H. *et al.* Characterisation of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v. 56, p. 289-301, 1980.
- CHAMBERLAIN, G. *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739-2749, 2007.
- CHAN, J.; O'DONOGHUE, K.; FISK, N.M. Developmental stem cell therapy. *In*: STUDD, J.; TAN, S.L.; CHERVENAK, F.A. (editors). **Progress in obstetrics and gynaecology**. London: Elsevier, p. 15-30, 2006.
- CHEN, S.; HILCOVE S.; DING S. Exploring stem cell biology with small Molecules. **Mol Biol Syst**, v. 2, p. 18-24, 2006.
- CHEW, J.L. *et al.* Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 14, n. 6031-46, 2005.
- CHICKARMANE, V. *et al.* Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 9, p. 1080-1092, 2006.

- CHO, H.J. *et al.* An Improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. **Hum Reprod**, v. 17, n. 9, p. 2419-2422, 2002.
- COBO, F.; TALAVERA, P.; CONCHA, A. Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. **Virology**, v. 347, n. 1, p. 1-10, 2006.
- COUSINEAU, J. *et al.* Separation of amniotic fluid cell types in primary culture by percoll density gradient centrifugation. **Prenat Diagn**, v. 2, n. 4, p. 241-249, 2005.
- DAI, Y. *et al.* Mobilized bone marrow progenitor cells serve as donors of cytoprotective genes for cardiac repair. **J Mol Cell Cardiol**, v. 44, n. 3, p. 607-617, 2008.
- DARR, H.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. **Development**, v. 133, n. 6, p. 1193-1201, 2006.
- DEANS R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. **Osiris Therapeutics**, v. 28, p. 875-884, 2000.
- DE COPPI, P. *et al.* Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 100-106, 2007.
- DENKER, H.W. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. **J Med Ethics**, v.32, n.11, p. 665-671, 2006.
- DIAFERIA, G.R. *et a.* Is stem cell chromosomes stability affected by cryopreservation conditions? **Cytotechnology**, v. 58, p. 11-16, 2008.
- DILLER, K.R. Engineering-based contributions in cryobiology. **Cryobiology**, v. 34, p. 304-314, 1997.
- DINGER, T.C. *et al.* Androgenetic embryonic stem cells form neural progenitor cells *in vivo* and *in vitro*. **Stem Cells**, v. 26, p. 1474-1483, 2008.
- DISTECHE, C. *et al.* Prenatal identification of a deleted Y chromosome by cytogenetics and a Y-specific repetitive DNA probe. **Hum Genet**, v. 67, p. 222-224, 1984.
- DONNEFELD, A.E.; LAMB, A.N. Cytogenetics and molecular cytogenetics in prenatal diagnosis. **Clin Lab Med**, v. 23, p. 457-480, 2003.
- DRAPER, J.S. *et al.* Recurrent gain of chromosomes 17 q and 12 in cultured human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 22, p. 53-54, 2004.
- FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant 'toxicity' to cryobiology. **Cryobiology**, v. 23, p. 1 -13, 1986.

FAHY, G.M. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, n. 4, p. 407-426, 1984.

FIBBE, W.E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p. 29-31, 2002.

FLEMING, K.K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. **Transf Apher Sci**, v. 34, p. 309-315, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone-marrow and spleen. **Cell tissue Kinet**, v. 3, p. 393-403, 1970.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique. 3. ed. Willey, 2005.

GALMICHE, M.C. *et al.* Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. **Blood**, v. 82, p. 66-76, 1993.

GAMOLD, N.; BLUNDELL, R. Stem Cell in Perspective. **Int J Mol Med Adv Sci**, v. 3, n. 4, p. 160-165, 2007.

GIANGRECO, A.; REYNOLDS, S.D.; STRIPP, B.R. Terminal bronchioles harbor a unique airway stem cell population that localizes to the bronchoalveolar duct junction. **Am J Pathol**, v. 16, n. 1, p. 173-182, 2002.

GILMORE, J.A. *et al.* Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 12, n. 1, p. 112-118, 1997.

GOSDEN, C.M. Amniotic fluid cell types and culture. **Br Med Bull**, v. 39, n. 4, p. 348-54, 1983.

GRECO, S.J.; LIU, K.; RAMESHWAR, P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. **Stem Cell**, v. 25, n. 12, p. 3143-3154, 2007.

GROTTO, H.Z.W.; NORONHA, J.F.A. Identificação de células-tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional *versus* contador hematológico automatizado. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, n. 3, p. 169-172, 2003.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow derived stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 487-500, 2004.

GUICHET, A.; BRIAULT, S.; MORAINÉ, C.I. High resolution chromosome analysis and *in situ* hybridization on amniotic fluid for diagnosis of a cryptic translocation. **Prenatal diagnosis**, v. 18, n. 4, p. 399-403, 1998.

GUILLOT, P.V. *et al.* Human first-trimester fetal MSC Express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. **Stem Cell**, v. 25, p. 646-654, 2007.

HAKELIEN, A.M. *et al.* Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. **Nat Biotechnol**, v. 20, p. 460-466, 2002.

HALE, S.L. *et al.* Mesenchymal stem cell administration at coronary artery reperfusion in the rat by two delivery routes: a quantitative assessment. **Life Sci**, v. 83, n. 13-14, p. 511-515, 2008.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, 2003.

HOEHN, H.; SALK, D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. **Methods Cell Biol**, v. 26, p. 11-34, 1982.

HONG, H.U. *et al.* Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. **Am J Pathol**, v. 164, n. 2, p. 577-588, 2004.

HORWITZ, E.M. *et al.* Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, n. 13, p. 8932-7, 2002.

HORWITZ, E.M. *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med**, v. 5, p. 309-313, 1999.

HURYCH, J. *et al.* Biochemical characteristics of collagen produced by long term cultivated amniotic fluid cells. **Hum Genet**, v. 31, n. 3, p. 335-40, 1976.

INZUNZA, J. *et al.* Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. **Mol Hum Reprod**, v. 10, p. 461-466, 2004.

IVANOVA, N. *et al.* Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. **Nature**, v. 442, p. 533-538, 2006.

JIANG, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, p. 41-49, 2002.

JOHNSON, J. *et al.* Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2005.

JONES, E.; MCGONAGLE, D. Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. **Rheumatology**, v. 47, p. 126-131, 2008.

JUN, H.S.; YOON, J.W. Approaches for the cure of type 1 diabetes by cellular and gene therapy. **Curr Gene Ther**, v. 5, p. 249-262, 2005.

KARAHUSEYINOGLU, S. *et al.* Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: *In situ* and *in vitro* surveys. **Stem cells**, v. 25, p. 319-331, 2007.

KARLMARC, K.R. *et al.* Activation of ectopic OCT-4 and Rex-1 promoters in human amniotic fluid cells. **Int J Mol Med**, v. 16, p. 987-992, 2005.

KARLSSON, J.O.M.; TONER, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. **Biomaterials**, v. 17, p. 243-256, 1996.

KATAYAMA, Y. *et al.* The effects of a simplified method for cryopreservation and thawing procedures on peripheral blood stem cells. **Bone Marrow Transplant**, v. 19, p. 283-287, 1997.

KAWADA, H.; OGAWA, M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. **Blood**, v. 98, p. 2008-2013, 2001.

KEHAT, I. *et al.* Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 22, p. 1282-1289.

KEIRSTEAD, H.S. *et al.* Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 25, p. 4694-4705, 2005.

KELLY, P. *et al.* Umbilical cord blood stem cells: Application for the treatment of patients with hemoglobinopathies. **J Pediatr**, v. 130, p. 695-703, 1997.

KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v. 24, p. 1294-1301, 2006.

KIM, J. *et al.* Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. **Cell Prolif**, v. 40, p. 75-90, 2007.

KIM, S.H. *et al.* Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. **Yons Med J**, v. 47, n. 3, p.399-404, 2006.

KOÇ, O.N.; LAZARUS, H.M. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. **Bone Marrow Transplant**, v. 27, p. 235-239, 2001.

KOÇ, O.N. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone Marrow Transplant**, v. 30, p. 215-222, 2002.

KOGLER, P. *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Experim Med**, v. 200, n. 2, p. 123-135, 2004.

KOPEN, G.C.; PROCKOP, D.J.; PHINNEY, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 10711-10716, 1999.

KORBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair: a new therapeutic concept? **N Engl J Med**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

KUNISAKI, S.M. *et al.* Tissue engineering from human mesenchymal amniocytes: a prelude to clinical trials. **J Pediatr Surg**, v. 42, n. 6, p. 974-9, 2007.

LAUNDON, C.H.; PRIEST, J.H.; PRIEST, R.E. The characterization of hCG regulation in cultured human amniotic fluid cells. **Prenat Diagn**, v. 1, n. 4, p. 269-275, 1981.

LEE, K.D. *et al.* *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Hepatology**, v. 40, p. 1275-1284, 2004.

LEE, O.K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Hematopoiesis**, v. 103, n. 5, p. 1669-75, 2004.

LENSCH, M.W. *et al.* Teratoma Formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera cell. **Stem Cell**, v. 1, n. 3, p. 253-258, 2007.

LIN, F. *et al.* Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 1188-1199, 2003.

LIU, G. *et al.* Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. **Criobiology**, v. 56, p. 209-215, 2008.

LOH, Y.H. *et al.* The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat Genet**, v. 38, n. 4, p. 431-440, 2006.

MACEK, M.; HURYCH, J.; REZÁCOVÁ, D. Collagen synthesis in long-term cultures of amniotic fluid. **Cesk Pediatr**, v. 28, n. 9, p. 478-480, 1973.

MACKENSEN, A. *et al.* Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer Immunol Immunother**, v. 49, n. 3, p. 152-156, 2000.

MAGALHÃES, J.A.A. Medicina fetal. **HCPA**, v. 20, p. 157-168, 2000.

MAKINO, S. *et al.* Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. **J Clin Invest**, v. 103, p. 697-705, 1999.

MANO, J.F.; REIS, R.L. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 1, n. 4, p. 261-273, 2007.

MARCUS, A.J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not die. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

MASSUMOTO, C.M. *et al.* Criopreservação de medula óssea e células pluripotentes periféricas utilizando um congelador programável: experiência em 86 congelamentos. **Rev Assoc Méd Bras**, v. 43, n. 2, p. 93-98, 1997.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **J Physiol Cell Physiol**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MAZUR, P.; PINNA, I.L.; KLEINHANSA, F.W. Intracellular ice formation in mouse oocytes subjected to interrupted rapid cooling. **Cryobiology**, v. 55, n. 2, p. 158-166, 2007.

McGANN, L.E. Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, p. 382-390, 1978.

McKINNEY-FREEMAN, S.L. *et al.* Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 99, p. 1341-1346, 2002.

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

MIKI, T. *et al.* Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v. 23, p. 1549-1559, 2005.

MINGUELL, J.J.; ERICS, A.; GONGET, P. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Br J Med Biol Res**, v. 3, p. 881-887, 2000.

MINGUELL, J.J.; ERICS, A.; GONGET, P. Mesenchymal stem cell. Society for Experimental. **Biol Med**, v. 226, p. 507-520, 2001.

MONTZKA, K. *et al.* Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. **BMC Neuroscience**, v. 10, n. 16, p. 1-12, 2009.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Início do desenvolvimento humano: primeira semana. *In: Embriologia clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed., p. 15-43, 2000.

MORALES, M.M. **Terapias avançadas**: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo: Atheneu, 2007.

MURPHY, M. *et al.* Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 3464-3474, 2003.

MUSCHLER, G.F. *et al.* Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. **Clin Orthoped**, v. 407, p. 102-118, 2003.

NATHANSON, M.A. Bone matrix-directed chondrogenesis of muscle *in vitro*. **Clin Orthop**, v. 200, p. 142–158, 1985.

NIMURA, A. *et al.* Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparasons with boné marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 2, p. 501-510, 2008.

NISTOR, G.I. *et al.* Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. **Glia**, v. 49, p. 385-396, 2005.

NOWSHARI, M.A.; BREM, G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. **Hum Reprod**, v. 16, p. 2368-2373, 2001.

ORLIC, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-705, 2001.

OSWALD, J. *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into Endothelial Cells *in vitro*. **Stem Cells**, v. 22, p. 377-384, 2004.

PAROLINE, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 300-311, 2008.

PASSIER, R. *et al.* Increased cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells in serum- free cultures. **Stem Cells**, v. 23, p. 772-780, 2005.

PENTZ, S.; HORLER, H. A cryopreservative procedure for storing cultivated and uncultivated amniotic fluid cells in liquid nitrogen. **J Med Gen**, v. 17, p. 472-475, 1980.

PERIN, L. *et al.* Renal differentiation of amniotic fluid stem cells. **Cell Prolif**, v. 40, p. 936-948, 2007.

PETERSEN, B.E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, p. 5417, p. 1168-1170, 1999.

PITTENGER, M.F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.

PRIOR, H.M.; WALTER, M.A. SOX genes: architects of development. **Mol Med**. v. 2, n. 4, p. 405-12, 1996.

PROPHET, E.B. Laboratory methods in histotechnology: Armed Forces Institute of Pathology. Washington, **Am Reg Pathol**, 1994. 275 p.

PRUSA, A.R. *et al.* Oct-4-expressing cells in human amniotic fuid: a new source for stem cell research? **Hum Reprod**, v. 18, n. 7, p. 1489- 1493, 2003.

PRUSA, A.R.; HENGSTSCHLAGER, M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. **Med Sci Monit**, v. 8, p. 253-257, 2002.

QU, J.Y. *et al.* Synchronization of amniotic fluid cells for high resolution cytogenetics. **Prenatal Diagn**, v. 9, n. 1, p. 49-56, 2005.

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

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIIRNOV, V.N. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. **Stem cells**, v. 21, p. 105-110, 2003.

ROOBROUCK, V.D.; ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C.M. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 9, p. 1937-1944, 2008.

ROONEY, D.E. **Human cytogenetics constitutional analysis**. New York: Oxford University Press, 3. ed, 2001.

ROSLER, E.S. *et al.* Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. **Dev Dyn**, v. 229, p. 259-274, 2004.

ROUBELAKIS, M.G. *et al.* Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 16, n. 6, p. 931-52, 2007.

SANTIN, T.R.; BLUME, H.; MONDADORI, R.G. Criopreservação de embriões- metodologias de vitrificação. **Vet Zoo**, v. 16, n. 4, p. 561-574, 2009.

SATO, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 303-315, 2005.

SCHOEBERLEIN, A. *et al.* Tissue-specific engraftment after *in utero* transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells into sheep fetuses. **Am J Obstet Gynecol**, v. 192, p. 1044-1052, 2005.

SCHUSTER, M.D. *et al.* Células-tronco mesenquimais para reparo cardíaco. **Rev Bras Cardiol Invas**, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2008.

SECCO, M. *et al.* Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 146-150, 2008.

SHAFFER, L.G.; TOMMERUP, N. An International System for human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). **Citogen Genome Res**, 2005.

SHEN, C.N.; SLACK, J.M.; TOSH, D. Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver. **Nat Cell Biol**, v. 2, p. 879-887, 2000.

SHULMAN, L.P.; ELIAS, S. Amniocentesis and chorionic villus sampling. **West J Med**, v. 159, p. 260-268, 1993.

SILVA, R.L.; MACEDO, M.C.M.A. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas sem uso de hemocomponentes. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 28, n. 2, p. 153-156, 2006.

SONG, Y.S. *et al.* Microfluidics for cryopreservation. **Lab Chip**, v. 9, n. 13, p. 1874-1881, 2009.

STEIGMAN, S.A. *et al.* Preclinical regulatory validation of a 3-stage amniotic mesenchymal stem cell manufacturing protocol. **J Pediatr Surg**, v. 43, n. 6, p. 1164-1169, 2008.

STREUBEL, B. *et al.* *In vitro* transformation of amniotic cells to muscle cells-background and outlook. **Wien Med Wochenschr**, v. 146, n. 9-10, p. 216-217, 1996.

STUTE, N. *et al.* Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. **Exp Hematol**, v. 32, n. 12, p. 1212-1225, Dec. 2004.

SUDO, K. *et al.* Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic and/or adipogenic cells *in vitro* are present in most primary fibroblast-like cell populations. **Stem cells**, v. 25, p. 1610-1617, 2007.

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

TAKAHASHI, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 1-12, 2007.

TANG, D.G. *et al.* Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. **Science**, v. 291, p. 868-871, 2001.

TERADA, N. *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, v. 416, p. 542-545, 2002.

THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH RESOURCE FOR STEM CELL RESEARCH, 2006. **What are adult stem cells?** Disponível em: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics2.asp>. Acesso em janeiro de 2010.

THOMSON, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

TILL, J.E.; McCULLOCH, E.A. A Direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiation Res**, v. 14, n. 2, p. 213-222, 1961.

TORRICELLI, F. *et al.* Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. **Ital J Anat Embryol**, v. 98, n. 2, p. 119-126, 1993.

TROUNSON, A. A fluid means of stem cell generation. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 62-73, 2007.

TSAI, M.S. *et al.* Clonal amniotic fluid: derived stem cells express characteristics of both mesenchymal and neural stem cells. **Biol Reprod**, v. 74, p. 545-551, 2006.

TSAI, M.S. *et al.* Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. **Human Reproduction**, v. 19, n. 6, p. 1450-1456, 2004.

TUSCHONG, L. *et al.* Immuneresponse to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after cell gene therapy. **Hum Gene Ther**, v. 1;13, n. 13, p. 1605-1610, 2002.

VALERI, C.R.; PIVACEK, L.E. Effects of the temperature, the duration of frozen storage, and the freezing container on *in vitro* measurements in human peripheral blood mononuclear cells. **Transfusion**, v. 36, p. 303-308, 1996.

VELIN, N.R. *et al.* FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. **J Clin Invest**, v. 115, n. 7, p. 1724-1733, 2005.

VERFAILIE, C.M. Adult stem cells assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

VICENT, C. *et al.* Dimethylsulphoxide affects the organization of microfilaments in the mouse oocyte. **Mol Reprod Dev**, v. 26, p. 227-235, 1990.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, p. 639-649, 2004.

WANG, H. *et al.* Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v. 24, n. 9, p. 1582-7, 2008.

WEISS, M.L. *et al.* Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. **Stem Cells**, v. 24, p. 781-792, 2006.

WHITSETT, C.F. *et al.* HLA typing of cultured amniotic fluid cells. **Am J Clin Pathol**, v. 79, n. 2, p. 186-94, 1983.

WILLIAMSON, R.A.; VARNER, M.W.; GRANT, S.S. Reduction in amniocentesis risks using a real-time needle guide procedure. **Obstet Gynecol**, v. 62, p. 760-764, 1983.

WOBUS, A.M.; BOHELER, K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiol Rev**, v. 85, p. 635-678, 2005.

WOODBURY, D. *et al.* Long-term cryopreserved amniocytes retain proliferative capacity and differentiate to ectodermal and mesodermal derivatives *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 11, p. 1463-1472, 2006.

XIANG, Y. *et al.* *Ex vivo* expansion and pluripotential differentiation of cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. **J Zhejiang University Sci**, v. 8, n. 2, p. 136-146, 2007.

XI, R.; XIE, T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. **Science**, v. 310, n. 5753, p. 1487-1489, 2005.

YING, Q.Y. *et al.* Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**, v. 416, p. 545-548, 2002.

YOON, Y.S. *et al.* Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 326-338, 2005.

YOU, Q. *et al.* Isolation of human mesenchymal stem cells from third-trimester amniotic fluid. **Int J Gynaecol Obstet**, v. 103, n. 2, p. 149-52, 2008.

ZHANG, Z.X. *et al.* Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged *in vitro*. **Cell Biology Int**, v. 31, p. 645-648, 2007.

APÊNDICE

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido

Aplicado a menores de 18 anos

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de se utilizarem células-tronco para tratamento de doenças (terapia celular). Por se tratar de estudos recentes, pouco se sabe sobre a caracterização e aplicação destas. O líquido amniótico é intrigante como uma possível fonte de células-tronco pluripotentes para essa aplicação. Entretanto, o uso terapêutico de células derivadas do líquido amniótico humano requererá entendimento muito mais completo da sua biologia.

O líquido amniótico pode ser utilizado como fonte de células-tronco de duas maneiras: em cultura ou criopreservadas, porém questionamentos sobre a preservação das características das células submetidas a esses processos devem ser respondidos.

Este trabalho tem o objetivo de verificar a viabilidade de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico após processos de cultura e criopreservação.

Fica garantido aos participantes deste trabalho o sigilo sobre os dados clínicos e laboratoriais e a proteção de sua identidade em caso de publicação na imprensa científica. Como os mesmos já iriam se submeter ao processo invasivo por motivos terapêuticos ou propedêuticos, este estudo não oferecerá adição de quaisquer riscos aos participantes.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em forma de resumo e pôsteres em eventos científicos e envio para apreciação e publicação em periódicos nacionais e internacionais, podendo ser consultados para pesquisas relacionadas.

A coordenação do projeto é do Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral.

Ressarcimento ou indenização não se aplicam ao caso de não-obtenção de resultados, seja por que razão for.

Todo o material biológico, após a realização dos testes inerentes a este trabalho, será descartado segundo as normas da Vigilância Sanitária.

Eu _____ ()
 concordo e me responsabilizo pela participação de
 _____ no trabalho:

Caracterização de células-tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas a processo de criopreservação e permito que seja utilizada sua amostra de líquido amniótico para o estudo citado.

Eu _____
 _____ () não concordo e não me responsabilizo pela participação de
 _____ no trabalho:

Caracterização de células-tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas ao processo de criopreservação e não permito que seja utilizada sua amostra de líquido amniótico para o estudo citado.

Assinatura do **responsável**

Data: ___/___/___

Assinatura do **pesquisador responsável:**

Data: ___/___/___

Contatos:

Pesquisador responsável: Antônio Carlos Vieira Cabral
 Rua Desembargador Assis Rocha, nº 72, Belvedere, CEP 30320-250 – Belo Horizonte/MG
 Telefone: 031.32862610

Colaborador: Victor Cavalcanti Pardini
 Rua Aimorés, nº 33, Funcionários – CEP 30140-070 – Belo Horizonte/MG
 Telefone: 031.32286200

Orientanda: Patrícia Caroline Ângelo
 Rua Helianto, nº 52 /201, Nova Suíça – CEP 30460-110 – Belo Horizonte/MG
 Telefone: 031.33720752

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
 Av. Antônio Carlos, nº 6.627 / Unidade Administrativa II – 2º andar *Campus*
 Pampulha Belo Horizonte/ MG
 Telefone: 31 34094592

Termo de consentimento livre e esclarecido

Aplicado a maiores de 18 anos

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de se utilizarem células-tronco para tratamento de doenças (terapia celular). Por se tratar de estudos recentes, pouco se sabe sobre a caracterização e aplicação destas. O líquido amniótico é intrigante como uma possível fonte de células-tronco pluripotentes para essa aplicação. Entretanto, o uso terapêutico de células derivadas do líquido amniótico humano requererá entendimento muito mais completo da sua biologia.

O líquido amniótico pode ser utilizado como fonte de células-tronco de duas maneiras: em cultura ou criopreservadas, porém questionamentos sobre a preservação das características das células submetidas a esses processos devem ser respondidos.

Este trabalho tem o objetivo de verificar a viabilidade de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico após processos de cultura e criopreservação. Fica garantido aos participantes deste trabalho o sigilo sobre os dados clínicos e laboratoriais e a proteção de sua identidade em caso de publicação na imprensa científica. Como os mesmos já iriam se submeter ao processo invasivo por motivos terapêuticos ou propedêuticos, este estudo não oferecerá adição de quaisquer riscos aos participantes.

Os resultados desta pesquisa serão divulgados em forma de resumo e pôsteres em eventos científicos e envio para apreciação e publicação em periódicos nacionais e internacionais, podendo ser consultados para pesquisas relacionadas.

A coordenação do projeto é do Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral.

Ressarcimento ou indenização não se aplicam ao caso de não-obtenção de resultados, seja por que razão for.

Todo o material biológico, após a realização dos testes inerentes a este trabalho, será descartado segundo as normas da Vigilância Sanitária.

Eu _____ ()
concordo em participar do trabalho: **Caracterização de células-tronco**

mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas ao processo de criopreservação e permito que seja utilizada minha amostra de líquido amniótico para o estudo citado.

Eu _____
_____ () não concordo em participar do trabalho: **Caracterização de células-tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas ao processo de criopreservação** e não permito que seja utilizada minha amostra de líquido amniótico para o estudo citado.

Assinatura do **paciente**

Data: ___/___/___

Assinatura do **pesquisador responsável:**

Data: ___/___/___

Contatos:

Pesquisador responsável: Antônio Carlos Vieira Cabral
Rua Desembargador Assis Rocha, nº 72, Belvedere, CEP 30320-250 – Belo Horizonte/MG
Telefone: 031.32862610

Colaborador: Victor Cavalcanti Pardini
Rua Aimorés, nº 33, Funcionários – CEP 30140-070 – Belo Horizonte/MG
Telefone: 031.32286200

Orientanda: Patrícia Caroline Ângelo
Rua Heliante, nº 52 /201, Nova Suíça – CEP 30460-110 – Belo Horizonte/MG
Telefone: 031.33720752

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, nº 6.627 / Unidade Administrativa II – 2º andar *Campus*
Pampulha Belo Horizonte/ MG
Telefone: 31 34094592

ANEXOS

ANEXO A – Parecer ético**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP****Parecer nº. ETIC 281/08****Interessado(a): Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia
Faculdade de Medicina - UFMG****DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 6 de agosto de 2008, o projeto de pesquisa intitulado **"Caracterização de células tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas ao processo de criopreservação"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral', is written over a horizontal line.

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

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COEP-UFMG)
PARECER**

Processo nº 0281.0.203.000-08
Recebido pela COEP: 04-06-2008
Recebido pelo parecerista : 26-06-2008
Parecer entregue: 05-08-2008

Título: Caracterização de células tronco mesenquimais isoladas do líquido amniótico humano e submetidas ao processo de criopreservação.

Área de conhecimento: Ciência da Saúde – Medicina – Diag.

Pesquisador responsável: Antônio Carlos Vieira Cabral

Instituição responsável pelo projeto: Faculdade de Medicina da UFMG

Apoio institucional: Faculdade de Medicina da UFMG

Documentos analisados:

1. Folha de rosto: Página de rosto em formulário para pesquisa envolvendo seres humanos assinado pelo Pesquisador Responsável e pelo Vice-Diretor do Hospital das Clínicas da UFMG, como representante da Instituição onde será realizada, em 29/05/2008 e 02/06/2008.
2. Protocolo de pesquisa com descrição do projeto.
3. Data prevista para início: Após aprovação do COEP
Data prevista para término: julho de 2009
4. Parecer consubstanciado da Câmara Departamental do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFMG, aprovado em 25/04/2008.
5. Declaração e Registro do projeto na DEPE/HC-UFMG em 04/06/2008.
6. Parecer favorável à execução do projeto na Unidade Funcional Ginecologia, Obstetrícia e Neonatologia, em 22/04/2008.
7. *Curriculum vitae* dos pesquisadores disponíveis na plataforma Lattes.
8. TCLE adequado.

Sumário do projeto: O trabalho tem como objetivo verificar a viabilidade de células tronco mesenquimais, obtidas de líquido amniótico, após processos de cultura e criopreservação. O líquido amniótico pode ser utilizado como fonte de células tronco porém existem questionamentos sobre a preservação das características das células submetidas a estes procedimentos.

Metodologia: Serão realizados com células obtidas de líquido amniótico testes de viabilidade celular, RT-PCR, análise cromossômica e procedimentos de diferenciação celular para verificar se houve alguma alteração nas características celulares após os processos executados (cultura e criopreservação). O material a ser utilizado (líquido amniótico) será obtido de pelo menos 10 gestantes, de segundo e terceiro trimestre de gestação, enviadas ao Centro de Medicina Fetal (HC-UFMG), por apresentarem gestações que necessitem a realização de procedimentos invasivos (cordocentese ou amniocentese) propedêuticos ou terapêuticos

Parecer final : O projeto é relevante, está bem fundamentado e contempla de forma adequada os quesitos éticos envolvidos. Assim,

VOTO: s.m.j. da plenária do COEP, pela APROVAÇÃO do projeto, conforme apresentado.

Belo Horizonte, 05 de agosto de 2008