



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0514387-0 B1



(22) Data do Depósito: 03/06/2005

(45) Data de Concessão: 28/01/2020

(54) Título: MÉTODO PARA ISOLAR CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS OU MESENQUIMAIS/PROGENITORAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DO CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO IN VITRO PARA CULTIVAR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS/PROGENITORAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UMA CÉLULA-TRONCO EPITELIAL OU MESENQUIMAL/PROGENITORA

(51) Int.Cl.: C12N 5/077.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2004 US 60/632,209; 16/08/2004 US 60/602,208.

(73) Titular(es): CELLRESEARCH CORPORATION PTE LTD.

(72) Inventor(es): TOAN-THANG PHAN; IVOR JIUN LIM.

(86) Pedido PCT: PCT SG2005000174 de 03/06/2005

(87) Publicação PCT: WO 2006/019357 de 23/02/2006

(85) Data do Início da Fase Nacional: 15/02/2007

(57) Resumo: ISOLAMENTO, CULTIVO E USOS DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS. A presente invenção refere-se a um método para isolar células-tronco/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, em que o método compreende separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical in vitro, cultivar tecido de membrana amniótica sob condições que permitem proliferação de célula e isolar as células-tronco/progenitoras das culturas de tecido. As células das células-tronco isoladas podem ter propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias e podem ser usadas para vários propósitos terapêuticos. Em uma modalidade, a invenção refere-se ao isolamento e cultivo de células-tronco como células-tronco/progenitoras epiteliais e/ou mesenquimais sob condições que permitem as células sofrer expansão mitótica. Além disso, a invenção é direcionada a um método para a diferenciação das células-tronco/progenitoras isoladas em células epiteliais e/ou mesenquimais.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA ISOLAR CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS OU MESENQUIMAIS/PROGENITORAS DA MEMBRANA AMNIÓTICA DO CORDÃO UMBILICAL, MÉTODO *IN VITRO* PARA CULTIVAR CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS/PROGENITORAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DE UMA CÉLULA-TRONCO EPITELIAL OU MESENQUIMAL/PROGENITORA".

[0001] A presente invenção refere-se a um método para isolar células-tronco/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, em que o método compreende separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*, cultivar o tecido da membrana amniótica sob condições que permitem proliferação das células e isolar as células-tronco/progenitoras das culturas de tecido. Em particular, a invenção refere-se ao isolamento e cultivo de células-tronco que têm propriedades embrionárias como células-tronco/progenitoras epiteliais e/ou mesenquimais sob condições que permitem as células sofrer expansão mitótica. Além disso, a invenção é direcionada a um método para a diferenciação das células-tronco/progenitoras isoladas em células epiteliais e/ou mesenquimais e usos terapêuticos destas células-tronco/progenitoras.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Células-tronco são uma população de células que possuem as capacidades para auto-renovar indefinidamente e diferenciar em múltiplos tipos de células ou tecidos. Células-tronco embrionárias (de aproximadamente 3 a 5 dias após fertilização) proliferam-se indefinidamente e podem diferenciar-se espontaneamente em todos os tipos de tecidos: elas são desse modo denominadas células-tronco pluripotentes (revisado, por exemplo, em Smith, A. G. (2001) *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17, 435-462). Porém, células-tronco adultas são mais tecido-específicas e podem ter menos capacidade replicativa: elas são desse

modo denominadas células-tronco multipotentes (revisado, por exemplo, em Paul, G. et al. (2002) *Drug Discov. Today* 7, 295-302). A "plasticidade" embrionária e células-tronco adultas contam com sua habilidade para trans-diferenciarem-se em tecidos diferentes de sua origem e, talvez, ao longo das camadas de germe embrionário.

[0003] A habilidade das células-tronco para auto-renovar é crítica para sua função como reservatório de células indiferenciadas primitivas. Em contraste, mais das células somáticas têm uma capacidade limitada por auto-renovação devido ao encurtamento dos telômeros (revisado, por exemplo, em Dice, J. F. (1993) *Physiol. Rev.* 73, 149-159). Terapias com base em célula-tronco desse modo têm o potencial para ser úteis para o tratamento de uma multidão de doenças humanas e animais.

[0004] Células-tronco como também células-tronco/progenitoras podem ser derivadas de fontes diferentes. O potencial de "multilinhagem" de células-tronco embrionárias e adultas foi extensivamente caracterizado. Embora o potencial das células-tronco embrionárias seja enorme, seu uso implica muitos problemas éticos. Portanto, células-tronco não-embrionárias derivadas do estroma da medula óssea, tecido adiposo, derme e sangue do cordão umbilical foram propostas como fontes alternativas. Estas células podem diferenciar *inter alia* em condrócitos, adipócitos, osteoblastos, mioblastos, cardiomiócitos, astrócitos e tenócitos *in vitro* e sofrem diferenciação *in vivo*, tornando estas células-tronco - em geral referidas como células-tronco mesenquimais - candidatos promissores para reparo de defeito mesodérmico e controle de doença.

[0005] Em uso clínico, porém, colheita de tais células-tronco mesenquimais causa vários problemas. A coleta das células é um fardo mental e físico ao paciente quando um procedimento cirúrgico é requerido para obter as células (por exemplo, a coletânea de medula óssea

é uma técnica invasiva executada com uma agulha de biópsia que requer anestesia local ou até mesmo geral). Além disso, em muitos casos o número de células-tronco extraídas é bastante baixo. Mais importante, nenhuma célula epitelial é derivada ou diferenciada destas células. Isto incitou a pesquisa por outras possíveis fontes de células-tronco.

[0006] Sangue do cordão umbilical foi identificado como uma fonte rica de células-tronco/progenitoras hematopoéticas. Porém, é debatida a existência de células-tronco/progenitoras mesenquimais de modo controverso. Por um lado, tais células não puderam ser isoladas ou de forma bem-sucedida cultivadas de sangue do cordão umbilical de termo (Mareschi, K., et al. (2001) *Haematologica* 86, 1099-1100). Ao mesmo tempo, resultados obtidos por Campagnoli, C., et al. (*Blood* (2001) 98, 2396-2402) como também Erices, A., et al. (*Br. J. Haematol.* (2000) 109, 235-242) sugere que células-tronco mesenquimais estão presentes em vários órgãos fetais e circulam no sangue de fetos de pré-termo simultaneamente com precursores hematopoéticos. Consequentemente, Pedido de Patente Internacional WO 03/070922 revela métodos de isolamento e expansão de cultura de células-tronco/progenitoras mesenquimais de sangue do cordão umbilical e um método de diferenciação de tais células em vários tecidos mesenquimais. Eficiências de isolamento de cerca de 60% foram relatadas (Bieback, K., et al. (2004) *Stem Cells* 22, 625-634). No mesmo estudo, tanto o período de tempo de coleta do sangue do cordão umbilical para isolamento das células como o volume da amostra de sangue usada foram determinados como parâmetros cruciais para alcançar um tal rendimento. Porém, ainda é uma questão de debate se estas células-tronco/progenitoras são de fato derivadas do tecido do cordão umbilical.

[0007] Recentemente, células-tronco/progenitoras mesenquimais

foram de forma bem-sucedida isoladas do tecido do cordão umbilical, a saber da geléia de Wharton, a matriz do cordão umbilical, (Mitchell, K. E. et al. (2003) *Stem Cells* 21, 50-60; patente U. S. 5.919.702; Publicação de patente US 2004/0136967). Estas células foram mostradas ter a capacidade para diferenciar, por exemplo, em um fenótipo neuronal e em tecido de cartilagem, respectivamente. Além disso, células-tronco/progenitoras mesenquimais foram também isoladas do endotélio e da camada subendotelial da veia do cordão umbilical, um dos três vasos (duas artérias, uma veia) encontrados dentro do cordão umbilical (Romanov, Y. A. et al. (2003) *Stem Cells* 21, 105-110; Covas, D. T. et al. (2003) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 1179-1183).

[0008] Porém, nenhum destes métodos empregados desse modo até agora resultou no isolamento ou cultivo de células-tronco/progenitoras epiteliais como uma fonte para terapias baseadas em células epiteliais como recobertura da pele, reparo do fígado, criação do tecido da bexiga e outros tecidos de superfície criados. Desse modo, ainda há uma necessidade por métodos e fontes seguras úteis para o isolamento e cultivo de células-tronco/progenitoras epiteliais. Além disso, métodos rápidos e eficientes que são eticamente aceitáveis e não impõem um fardo biomédico ao paciente para o isolamento das células-tronco/progenitoras epiteliais e mesenquimais ainda são requeridos para prover tais células em uma quantidade suficiente para várias aplicações em medicina regenerativa e engenharia de tecido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0009] A invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, o método compreendendo:

- (a) separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*;
- (b) cultivar o tecido de membrana amniótica obtido na etapa

(a) sob condições que permitem proliferação de célula; e

(c) isolar as células-tronco/progenitoras.

[00010] Em uma modalidade, a invenção fornece um método, também compreendendo:

(a'') separar as células do tecido de membrana amniótica antes do cultivo por uma técnica selecionada do grupo que consiste em digestão enzimática e explante de tecido direto.

[00011] Em uma modalidade preferida, a invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras que têm propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias.

[00012] Em outra modalidade preferida, a invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras epiteliais e/ou mesenquimais.

[00013] Em outra modalidade, a invenção fornece um método também compreendendo:

(d) cultivar as células-tronco/progenitoras sob condições permitindo as células sofrer expansão clonal.

[00014] Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método também compreendendo:

(e) cultivar as células-tronco/progenitoras sob condições permitindo a diferenciação das ditas células em células epiteliais e/ou células mesenquimais; e

(f) isolar as células diferenciadas.

[00015] Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método, também compreendendo:

(g) preservar as células-tronco/progenitoras isoladas para outro uso.

[00016] Em ainda uma outra modalidade, a invenção compreendendo um método de cultivar células-tronco/progenitoras da invenção, compreendendo:

Obter um explante de tecido da membrana amniótica do cordão umbilical;

Cultivar o explante de tecido em meios de cultivo e condições de cultivo adequados em um período adequado de tempo.

[00017] Em ainda outras modalidades, a invenção é direcionada aos usos terapêuticos das células-tronco/progenitoras ou extratos celulares destas. Uma destas modalidades fornece um método de tratar um indivíduo tendo um distúrbio compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma célula-tronco/progenitora isolada pelo método inventivo explicado acima. Outra modalidade fornece uma composição farmacêutica correspondente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[00018] A invenção será melhor entendida com referência à descrição detalhada quando considerada junto com os exemplos não-limitativos e os desenhos em que:

[00019] Figura 1 descreve desenvolvimento das células epiteliais da membrana amniótica do cordão umbilical pelo método de explante de tecido direto (ampliação de 40 x) no dia 2 (figura 1A) e dia 5 (figura 1B, C) da cultura de tecido. Superfícies de plástico de cultura de célula foram revestidas com misturas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2; Becton Dickinson) antes de colocar a membrana amniótica na superfície. Os espécimes de membrana amniótica foram submersos em 5 ml de meio de EpiLife ou Meio 171 (ambos de Cascade Biologics). Meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias e desenvolvimento das células através de explante foi monitorado sob microscopia de luz. Microfotografias foram tiradas em intervalos de tempo diferentes como declarado acima. A morfologia de célula poliédrica observada é típica das células epiteliais.

[00020] Figura 2 descreve digestão enzimática dos segmentos do cordão umbilical rendendo células epiteliais similares (ampliação de 40

x) no dia 2 (figura A, C) e dia 5 (figura B, D). Membrana amniótica do cordão umbilical foi dividida em pedaços pequenos de 0,5 cm x 0,5 cm e digeridos em solução a 0,1% (p/v) de colagenase do tipo 1 (Roche Diagnostics) a 37° C durante 8 horas. As amostras foram submetidas à vértice a cada 30 min por 3 min. Células foram colhidas através de centrifugação a 4000 rpm por 30 min. Péletes de célula foram ressuspensos em meio de EpiLife ou Meio 171 (ambos de Cascade Biologics) suplementado com 50 µg/ml de fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), 50 µg/ml de fator-BB de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-BB), 5 µg/ml de fator-β1 de crescimento de transformação (TGF-β1) e 5 µg/ml de insulina (todos obtidos de R&D Systems), contados e semeados em discos de cultura de tecido de 10 cm pré-revestidos com misturas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2; Becton Dickinson) em densidade de 1×10^6 células/disco. Após 24 horas, células ligadas foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS) morna e o meio de cultura foi substituído com meio de EpiLife ou Meio 171 (ambos de Cascade Biologics). O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias, e desenvolvimento das células foi monitorado sob microscopia de luz. Microfotografias foram tiradas em intervalos de tempo diferentes como declarado acima. Uma vez mais, as células demonstraram morfologia poliédrica de célula epitelial típica.

[00021] Figura 3 descreve desenvolver células mesenquimais explantadas da membrana amniótica do cordão umbilical. Desenvolvimento celular foi observado já em 48 horas após colocação em discos de cultura de tecido usando DMEM suplementado com 10% de soro de bezerro fetal (FCS) como meio de cultura (ampliação de 40 x) (figura 3A, C). Os explantes foram submersos em 5 ml de DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone) (DMEM/10% de FBS). Meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Desenvolvimento das células foi monitorado sob microscopia de luz. Microfoto-

grafias foram tiradas em intervalos de tempo diferentes. As células foram caracterizadas por sua morfologia em forma de fuso, e migradas e expandidas tanto fácil como rapidamente *in vitro*, estritamente se assemelhando aos fibroblastos (figura 3B, D).

[00022] Figura 4 (ampliação de 40 x) descreve células mesenquimais das células da membrana amniótica do cordão umbilical isoladas por digestão enzimática de collagenase. figura 4A mostra células mesenquimais isoladas da membrana amniótica do cordão umbilical no dia 2. Proliferação de célula foi observada no dia 5 (figura 4B). Membrana amniótica do cordão umbilical foi dividida em pedaços pequenos de 0,5 cm x 0,5 cm e digerido em 0,1% (p/v) de solução do tipo 1 de collagenase (Roche Diagnostics) a 37°C durante 6 horas. As amostras foram submetidas à vórtice a cada 15 min por 2 min. Células foram colhidas através de centrifugação a 4000 rpm durante 30 min. Péletes de célula foram ressuspensos em DMEM/10% de FBS, contadas e semeadas em disco de cultura de tecido de 10 cm a densidade de 1×10^6 células/disco. Meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Desenvolvimento das células foi monitorado sob microscopia de luz. Microfotografias foram tiradas em intervalos de tempo diferentes. Uma vez mais, células demonstraram morfologia em forma de fuso típica de células mesenquimais como fibroblastos.

[00023] Figura 5 (ampliação de 40 x) descreve a morfologia em condição de cultura livre de soro (DMEM) e condição de cultura de soro (DMEM/10% de FCS) das células mesenquimais da membrana amnióticas do cordão umbilical (UCMC, figura 5E, F, G, H) isoladas de acordo com o método da invenção, fibroblastos dérmicos normais (células de NF109, figura 5A, B) e células mesenquimais derivadas adiposas (ADMC, figura 5C, D). figura 5 mostra as alterações na morfologia de células de NF e ADCMC cultivadas em condições de inanição de soro (DMEM apenas) refletidas por células mais chatas e citoplasma

menos denso quando comparadas com condições ricas em soro (DMEM/10% de FCS) onde as células são mais arredondadas com um citoplasma denso (figura 5A, B, C, D). Nenhuma alteração na morfologia foi observada em ambos os grupos de UCMC cultivados sob condições idênticas de meios livres de soro vs. ricos em soro (figura 5E, F, G, H), indicando uma diferença no comportamento e fisiologia destas células mesenquimais posteriores.

[00024] Figura 6 (ampliação de 40 x) descreve UCMC isolada de acordo com a invenção cultivada em DMEM/10% de FCS nos dias 3 e 7 sem uma camada alimentadora de 3T3. As células são vistas estar crescendo bem, e formando uma colônia (crescimento vertical) em vez de exibir expansão radial. Uma vez mais, isto indica uma diferença no comportamento destas células mesenquimais quando comparadas a suas contrapartes mais diferenciadas.

[00025] Figura 7 (ampliação de 40 x) descreve formação de colônia das células epiteliais do cordão umbilical (UCEC) cultivadas em uma camada alimentadora de 3T3 nos dias 3 e 7. Esta aparência é similar àquela das células-tronco de ceratinócito epiteliais derivadas de pele normal. No anterior, a camada alimentadora de 3T3 mantém a descendência das células.

[00026] Figura 8 (ampliação de 40 x) descreve a formação de colônia óbvia de células mesenquimais do cordão umbilical (UCMC) isoladas de acordo com a invenção cultivadas em uma camada alimentadora de 3T3 nos dias 3 e 7. A camada alimentadora de 3T3 suprime o crescimento de células mesenquimais diferenciadas normalmente como fibroblastos dérmicos humanos. Uma vez mais, isto indica uma diferença no comportamento destas células mesenquimais quando comparadas a suas contrapartes mais diferenciadas.

[00027] Figura 9-1 a Figura 9-27 mostram análise de western blot pela qual a expressão de vários marcadores de células-tronco embrio-

nárias em UCEC e UCMC isolados de acordo com a invenção, foi comparado à expressão destes marcadores em fibroblastos dérmicos humanos (NF), em células mesenquimais da medula óssea (BMSC) e células mesenquimais derivadas adiposas (ADMC). figura 9 também mostra ActivinA e Folistatina altamente segregadas detectadas por ensaio de ELISA em sobrenadantes mesenquimais do cordão umbilical e cultura de célula-tronco epitelial comparada com células-tronco derivadas da medula óssea, adiposas, fibroblastos dérmicos humanos e ceratinócitos epidérmicos.

[00028] Figura 10 mostra análise imunofluorescente indireta dos marcadores de células epiteliais expressos nas células-tronco epiteliais do cordão umbilical como citoceratinas (CK)-general, CK17, CK6, CK10, CK19, CK18, CK16, CK15 (figura10-1); Componentes de hemidesmosoma - integrina alfa6, integrina beta4; Componentes de desmosoma (figura10-2); Componentes de membrana basal - laminina1, laminina5, colágeno IV, colágeno VII (figura10-3) e outros componentes de matriz extracelular importantes como integrina-beta1 e fibronectina (figura10-4).

[00029] Figura 11 mostra análise de arranjo de citocina das citocinas segregadas e fatores de crescimento através de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (UCMC) comparadas com células-tronco mesenquimais da medula óssea humana.

[00030] Figura 12 mostra análise de arranjo de citocina das citocinas segregadas e fatores de crescimento através das células-tronco epiteliais do cordão umbilical (UCEC) comparadas com ceratinócitos epidérmicos humanos.

[00031] Figura 13 mostra células de UCMC cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro de bezerro fetal (FCS) (figura13-1), meios livres de soro PTT-1 (figura13-2), em meios livre de soros PTT-2 (figura13-3, figura13-4) e em meios livre de soros PTT-3 (figura13-5).

figura 13 também mostra o crescimento de células estromais derivadas adiposas (figura13-6) e células estromais derivadas da medula óssea (figura13-7) em meio livre de soro PTT-3.

[00032] Figura 14 mostra expressão de gene global em células-tronco epiteliais e mesenquimais do cordão umbilical analisadas através de microarranjo de DNA. UCEC expressou um total de 28055 genes e UCMC expressou um total de 34407 genes. Há 27308 genes de sobreposição que expressam em ambos os tipos de célula. 747 genes expressos foram únicos para UCEC e 7099 genes expressos foram únicos para UCMC. Os genes selecionados de interesse são apresentados nesta Figura. Ambos os tipos de célula-tronco expressaram 140 genes relacionados às células-tronco embrionárias e desenvolvimento embrionário.

[00033] Figura 15 mostra uma ilustração esquemática de expansão das células-tronco epiteliais e mesenquimais do cordão umbilical usando explantes repetitivos dos tecidos de membrana de revestimento do cordão umbilical.

[00034] Figura 16 descreve uma seção transversal de um cordão umbilical demonstrando a membrana de revestimento amniótica do cordão umbilical (LM), a geléia do Wharton contida (WJ), como também duas artérias umbilicais (UA) e uma veia umbilical (UV) suportada dentro desta geléia.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[00035] A invenção é com base na descoberta surpreendente que a membrana amniótica do cordão umbilical representa uma fonte, da qual as células-tronco/progenitoras como células-tronco/progenitoras mesenquimais e epiteliais podem ser de forma bem-sucedida isoladas e expandidas sob condições *in vitro*. Até mesmo mais surpreendente é a descoberta que estas células mostram características semelhantes à célula-tronca embrionária. A membrana amniótica (também chamada

membrana de revestimento amniótica), isto é saco membranoso mais interno fino encerrando a placenta e desenvolvendo o embrião dos mamíferos, foi recentemente usada como um substrato natural na reconstrução da superfície ocular e como um substrato biológico para expandir células-tronco epiteliais limbais (cf., por exemplo, Anderson, D. F. et al. (2001) *Br. J. Ophthalmol.* 85, 567-575; Grüterich, M., et al. (2003) *Surv. Ophthalmol.* 48, 631-646). Porém, nenhum método foi até agora desse modo descrito para o isolamento de células-tronco/progenitoras da membrana amniótica, pelo menos para humanos, nem a membrana amniótica cobrindo o cordão umbilical foi relatado como uma fonte para células-tronco.

[00036] A invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, o método compreendendo:

(a) separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*;

(b) cultivar o tecido de membrana amniótica obtido na etapa (a) sob condições que permitem proliferação de célula; e

(c) isolar as células-tronco/progenitoras.

[00037] O termo "célula-tronco/progenitor" como aqui usado refere-se a qualquer célula derivada do cordão umbilical que tem as capacidades para auto-renovar indefinidamente e diferenciar em múltiplos tipos de célula ou de tecido como células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, miócitos ou neurônios. Além disso, as células podem ser derivadas de qualquer espécie mamífera, como camundongo, rato, cobaia, coelho, cabra, cachorro, gato, ovelha, macaco ou humano, com células de origem humana sendo preferidas em uma modalidade.

[00038] O termo "propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias" refere-se à habilidade das células derivadas do cordão umbilical que elas podem - quase como ou precisamente como as célu-

las-tronco embrionárias - diferenciar espontaneamente em todos os tipos de tecido, significando que elas são células-tronco pluripotentes.

[00039] O termo "membrana amniótica" como aqui usado refere-se ao saco membranoso mais interno fino que encerra o embrião em desenvolvimento dos mamíferos. Durante a gravidez, o feto é rodeado e almofadado por um líquido chamado fluido amniótico. Este fluido, junto com o feto e a placenta, está incluso dentro de um saco chamado membrana amniótica que também reveste o cordão umbilical. O fluido amniótico é importante por várias razões. Ele amortece e protege o feto, permitindo que o feto movimente-se livremente. O fluido amniótico também permite o cordão umbilical flutuar, impedindo-o de ser comprimido e corte o fornecimento de oxigênio do feto e nutrientes derivados do sangue circulante dentro dos vasos sanguíneos placentários. O saco amniótico contém o fluido amniótico que mantém um ambiente homeostático que protege o ambiente fetal do mundo externo. Esta barreira adicionalmente protege o feto de organismos (como bactérias ou vírus) que poderiam percorrer a vagina e potencialmente causar infecção.

[00040] Meios e reagentes para cultura de tecido são bem conhecidos na técnica (cf., por exemplo, Pollard, J. W. e Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, Segunda Edição, Human Press, Totowa, N J; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, Quarta Edição, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Exemplos de meios adequados para incubar/transportar amostras de tecido do cordão umbilical incluem, mas não são limitados a, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), meios de RPMI, Solução Salina Balanceada de Hanks (HBSS), solução salina tamponada de fosfato (PBS) e meio L-15, com o último sendo preferido em algumas modalidades. Exemplos de meios apropriados para cultivar células-tronco/progenitoras de acordo com a invenção incluem, mas não são limitados a, Meio de Eagle Modificado

por Dulbecco (DMEM), DMEM-F12, meios de RPMI, meio de EpiLife e Meio 171, com o último sendo preferido em algumas modalidades. Os meios podem ser suplementados com soro de bezerro fetal (FCS) ou soro bovino fetal (FBS) como também antibióticos, fatores de crescimento, aminoácidos, inibidores ou outros, que estão bem dentro do conhecimento geral do artesão versado.

[00041] Em uma modalidade, a invenção fornece um método, também compreendendo:

(a") separar estas células-tronco/progenitoras do tecido de membrana amniótica por uma digestão enzimática e/ou técnica de explante de tecido direta antes do cultivo. O termo "técnica de digestão enzimática" como aqui usado significa que as enzimas são adicionadas para clivar as células da massa de tecido principal (aqui a membrana amniótica do cordão umbilical). As células separadas são subsequentemente colhidas. O termo "técnica de explante de tecido direta" como aqui usado significa que o tecido é colocado primeiro em meios sem enzimas. Depois sob condições cuidadosas as células separam por si só da massa de tecido principal - e as células são depois colhidas para coleta.

[00042] Métodos para separar as células de um tecido ou órgão particular através de tratamento com enzimas ou através de explante de tecido direto são bem conhecidos na técnica (cf., por exemplo, Pollard, J. W. e Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, Segunda Edição, Human Press, Totowa, NJ; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, Quarta Edição, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Qualquer enzima que catalisa a dissociação de tecido pode ser usada para executar os métodos da presente invenção. Em modalidades preferidas, collagenase é usada para aquele propósito. A enzima pode ser usada como uma preparação bruta ou na forma purificada. Ela pode ser purificada de qualquer organismo procariótico ou eucariótico (com *Clostri-*

dium histolyticum que é a mais preferida) ou produzida recombinantemente por meio de tecnologia de gene. Qualquer tipo de collagenase pode ser empregado, isto é, tipo 1, tipo 2, tipo 3, tipo 4, ou qualquer combinação destes. Em algumas modalidades o uso de collagenase do tipo 1 está sendo preferido.

[00043] Em uma modalidade, a invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras que têm propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias. Estes células podem por fim ser diferenciadas, mas não limitadas, em morfologia, epitelial ou células mesenquimais.

[00044] Conseqüentemente, em outra modalidade, a invenção fornece um método para isolar células-tronco/progenitoras epiteliais e/ou mesenquimais, em que de acordo com a revelação acima, estes células podem ter propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias.

[00045] Células-tronco/progenitoras epiteliais incluem qualquer célula que exibe uma célula epitelial como morfologia (isto é, uma forma poliédrica) que pode ser diferenciada em qualquer tipo de célula epitelial como, mas não limitado a, células epiteliais da pele, células foliculares do cabelo, células epiteliais da córnea, células epiteliais conjuntivais, células epiteliais retiniais, células epiteliais do fígado, células epiteliais renais, células epiteliais pancreáticas, células epiteliais esofagianas, células epiteliais do intestino delgado, células epiteliais do intestino grosso, células epiteliais do pulmão e vias aéreas, células epiteliais da bexiga ou células epiteliais uterinas.

[00046] Células-tronco/progenitoras mesenquimais incluem qualquer célula que exibe uma célula mesenquimal como morfologia (isto é, uma forma semelhante a fuso) que pode ser diferenciada em qualquer tipo de célula mesenquimal como, mas não limitada a, fibroblastos de pele, condrócitos, osteoblastos, tenócitos, fibroblastos de liga-

mento, cardiomiócitos, células do músculo liso, células do músculo do esqueleto, adipócitos, células derivadas das glândulas endócrinas e todas as variedades e derivados de células neurectodérmicas.

[00047] Em outra modalidade, a invenção fornece um método também compreendendo:

(d) cultivar as células-tronco/progenitoras sob condições que permitem as células sofrer expansão clonal.

[00048] O termo "expansão clonal" (às vezes também referido como "expansão clonal mitótica") refere-se a um processo que ocorre cedo no programa de diferenciação de uma célula pelo qual células-tronco/progenitoras são cometidas a uma linhagem particular e depois sofrem diferenciação terminal. É bem conhecido na técnica que as condições para induzir expansão clonal das células progenitoras podem variar significativamente entre diferentes tipos de célula. Sem estar limitado a um método particular, a indução de expansão clonal é em geral alcançada cultivando as células-tronco/progenitoras em um meio que foi otimizado para proliferação das células. Tais meios estão comercialmente disponíveis de muitos provedores. Exemplos não-limitativos de tais meios são Meio de KGM®-Querinócito (Cambrex), MEGM-Meio de Célula Epitelial Mamária (Cambrex), meio de EpiLife (Cascade Biologics) ou Meio 171 (Cascade Biologics). Alternativamente, um meio de cultura pode ser suplementado com reagentes que induzem proliferação celular como fatores de crescimento. Tais reagentes podem ser misturados em uma solução simples como o Kit de Suplemento de Crescimento de Queratinócito Humano (Cascade Biologics), para citar um exemplo, ou pode ser suplementado individualmente. Tais reagentes incluem, mas não são limitados a, fatores de crescimento (como fator de crescimento epidérmico, fator-1 de crescimento semelhante à insulina, fator-BB de crescimento derivado de plaqueta, fator- β 1 de crescimento de transformação, insulina, por

exemplo), hormônios (como um extrato pituitário bovino), hidrocortisona, transferrina e outros em qualquer combinação adequada para induzir expansão clonal de um tipo de célula dado. O termo "expansão clonal" também inclui cultivo da célula *in vivo*, por exemplo, por injeção das células em mamíferos como seres humanos, camundongos, ratos, macacos, macacos para nomear apenas alguns.

[00049] Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método também compreendendo:

(e) cultivar as células-tronco/progenitoras sob condições que permitem a diferenciação das ditas células em células epiteliais e/ou células mesenquimais; e

(f) isolar as células diferenciadas.

[00050] Em ainda outra modalidade, a invenção fornece um método, também compreendendo:

(g) conservar as células-tronco/progenitoras isoladas para outro uso.

[00051] Métodos e protocolos para preservação e armazenamento das células eucarióticas, e em particular células mamíferas, são bem conhecidos na técnica (cf., por exemplo, Pollard, J. W. e Walker, J. M. (1997) *Basic Cell Culture Protocols*, Segunda Edição, Human Press, Totowa, NJ; Freshney, R. I. (2000) *Culture of Animal Cells*, Quarta Edição, Wiley-Liss, Hoboken, NJ). Qualquer método que mantém a atividade biológica das células-tronco/progenitoras epiteliais ou mesenquimais isoladas pode ser utilizado com relação à presente invenção. Em uma modalidade preferida, as células-tronco/progenitoras são mantidas e armazenadas usando crio conservação.

[00052] Conseqüentemente, a invenção é também direcionada a uma célula progenitora/tronco derivada da membrana amniótica do cordão umbilical por meio dos métodos acima. Além disso, a invenção é também direcionada a um banco de células compreendendo ou con-

sistindo em uma ou mais células progenitoras/tronco que foram isoladas como descrito aqui. Este banco de células progenitoras/células-tronco pode ser autólogo para um indivíduo ou agrupar, e subsequentemente pode ser empregado através de diferenciação adicional para medicina regenerativa, reparar e regeneração de tecido, por exemplo.

[00053] De acordo com o acima, a invenção é também direcionada a uma composição farmacêutica compreendendo uma célula-tronco/progenitora isolada da membrana amniótica do cordão umbilical pelo método inventivo acima. A composição farmacêutica pode ser de qualquer tipo, e usualmente compreende as células-tronco/progenitoras ou um extrato celular destas junto com um veículo/excipientes terapeuticamente aceitável adequado. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica é adaptada para aplicação sistêmica ou tópica.

[00054] Uma composição farmacêutica adaptada para aplicação tópica pode ser em forma líquida ou viscosa. Exemplos desta incluem um unguento, um creme e uma loção e outros. Exemplos para composições farmacêuticas que são adequadas para uso sistêmico são composições líquidas, em que as células-tronco/progenitoras ou o extrato celular são dissolvidos em um tampão que é aceitável para injeção ou infusão, por exemplo.

[00055] Consequentemente, a invenção também refere-se a um método de tratar um indivíduo tendo um distúrbio. Este método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma célula-tronco/progenitora isolada como explicado aqui ou de um extrato celular derivado de uma tal célula.

[00056] Em princípio, qualquer condição que é adequada para ser tratada por meio de células-tronco/células progenitoras pode ser tratada com uma célula ou um extrato celular de presente invenção. Em algumas modalidades, o distúrbio é selecionado do grupo que consiste

em doença neoplástica, envelhecimento acelerado da pele e distúrbios de pele, distúrbios de tecido, deficiências endócrinas viscerais e distúrbios neurais.

[00057] O distúrbio de tecido a ser tratado pode ser um congênito ou uma deficiência de tecido adquirida. Exemplos de deficiência endócrina visceral que pode ser tratada com uma célula da invenção incluem, mas não são limitados a, deficiência de insulina associada à diabetes melito, deficiência de testosterona, anemia, hipoglicemia, hiperglicemia, deficiência pancreática, deficiência ad-renal e deficiências da tireóide.

[00058] Exemplos de distúrbios neurais que podem ser tratados incluem, mas não são limitados à, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Jacob Kreutzfeld, doença de Lou Gehrig, doença de Huntington e condições neoplásticas neurais.

[00059] Um exemplo de uma doença de pele é uma ferida ou uma parte lesada da pele, por exemplo, pele queimada de sol. Também é considerado que envelhecimento da pele é uma doença de pele aqui. Liberação tópica ou similar das células-tronco/progenitoras da invenção ou extratos celulares destas, por exemplo, como um constituinte em loções ou cremes ou qualquer outro veículo adequado, pode desse modo ser usada para reparo de pele danificada por sol e além disso pode reduzir também o processo de envelhecimento da pele (propriedades de anti-envelhecimento) suprimindo, e desse modo fortalecendo, os fatores de crescimento deficientes e elementos de peptídeo relacionados sem os quais o envelhecimento de pele seria acelerado. As células-tronco/progenitoras podem também migrar para regiões feridas do corpo como feridas de superfície para formar os elementos celulares requeridos necessários para os processos reparadores locais (cf. *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 7556-7562; ou *International Journal of Biochemical and Cell Biology* 2004; 36: 598-606.

[00060] A doença neoplástica pode ser câncer, em particular como estudos recentes demonstraram que células-tronco podem seletivamente alvejar tecido de tumor neoplástico (*Journal of the National Cancer Institute* 2004; 96 (21): 1593-1603) permitindo liberação direcionada dos agentes antineoplásticos como interferona para focos neoplásticos. O câncer pode ser qualquer tipo de câncer, incluindo aqueles cânceres que podem formar tumores sólidos, variando de câncer de pele a câncer dos órgãos internos. Exemplos de cânceres a ser tratados incluem, carcinoma de célula escamosa, carcinoma dutal ou lobular de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma nasofaríngeo, câncer do pulmão, câncer de osso, câncer pancreático, câncer de pele, câncer da cabeça ou pescoço, melanoma maligno cutâneo ou intraocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer de mama, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma da cerviz, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, doença de Hodgkin, linfoma de não-Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino, câncer da glândula da tireóide, câncer da glândula da paratireóide, câncer da glândula ad-renal, sarcoma de tecido macio, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer de próstata, leucemias crônicas ou agudas, tumores sólidos de infância, linfoma linfocítico, câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter, carcinoma de célula renal, carcinoma da pélvis renal, neoplasma do sistema nervoso central (CNS), linfoma de CNS primário, angiogênese tumoral, tumor de eixo geométrico espinhal, glioma de tronco cerebral, adenoma pituitário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermóide ou qualquer combinação de tais cânceres, incluindo formas disseminadas (metastisantes) destes. No caso de tratamento de uma doença neoplástica as células-tronco e/ou seus extratos celulares derivados de âmnio do cordão umbilical podem ser administrados sis-

temicamente tanto como um tratamento direto e/ou como um veículo portador. No caso anterior de terapia de tumor antineoplástico, as células compreendem um agente antineoplástico.

[00061] Em outro uso farmacêutico, células-tronco/progenitoras da presente invenção podem ser usadas para terapia de gene. Para este propósito, as células podem ser transformadas com um ácido nucléico que codifica a proteína que será produzida nas células. O ácido nucléico pode ser introduzido em umas células da invenção usando quaisquer dos vários métodos que são bem conhecidos à pessoa versada, por exemplo, usando um vetor viral e/ou um lipídio contendo composição de transfecção como IBAfect (IBA GmbH, Göttingen, Alemanha), Fugene (Roche), GenePorter (Gene Therapy System), Lipofectamina (Invitrogen), Superfect (Qiagen), Metafecten (Biontex) ou aqueles descritos no pedido de patente de PCT WO 01/015755). Em uma modalidade relacionada, as células da invenção, após terem sido transformadas com um ácido nucléico que codifica um polipeptídeo de escolha, podem ser usadas recombinantemente produzindo este polipeptídeo.

[00062] Como mencionado acima, extratos de célula-tronco são ricos em uma variedade de fatores de crescimento e peptídeos que são relevantes para fisiologia de tecido normal. Tais fatores de crescimento e/ou peptídeos podem ser deficientes em partes expostas do corpo, como a pele que é a camada de superfície de todos os seres humanos que protege o corpo de elementos externos para a manutenção de homeóstase interna. Portanto em uma outra modalidade, células-tronco/progenitoras da invenção ou extratos celulares destas são adequados para o tratamento e/ou manutenção de homeóstase interna.

[00063] Em uma outra modalidade e de acordo com a revelação acima, as células-tronco/progenitoras da invenção podem ser usadas

para a produção de qualquer molécula biológica. Por exemplo, a molécula biológica pode ser qualquer molécula que é produzida naturalmente nas células ou uma molécula do ácido nucléico de codificação que foi introduzida nas células por meio de tecnologia de DNA recombinante. Exemplos de moléculas que podem ser produzidas pelas células da invenção incluem, mas não são limitadas a, uma proteína como uma citocina, um fator de crescimento como fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator-beta de crescimento de transformação (TGF-beta), Activina A, uma proteína morfogenética de osso (BMP), PDGF ou um hormônio como insulina ou eritropoetina ou uma proteína transportadora como transferrina, um peptídeo tal como fator de crescimento ou hormônio (por exemplo, hormônio luteínico (LSH), hormônio estimulante do folículo (FSH)), uma molécula orgânica pequena como um hormônio de esteróide, um oligo- ou polissacarídeo, por exemplo, heparina ou sulfato de heparan (cf., exemplo WO 96/23003, ou WO 96/02259 nesta consideração), um proteoglicano, uma glicoproteína como colágeno ou laminina, ou um lipídio, para nomear apenas alguns.

[00064] Em um outro aspecto e de acordo com recentes métodos (ver, por exemplo, Amit, M et al., Human feeder layers for human embryonic stem cells, Biol Reprod 2003; 68: 2150-2156), as células-tronco/progenitoras descritas aqui podem ser usadas como camada alimentadora para o cultivo de outras células-tronco embrionárias, em particular células-tronco embrionárias humanas. Em uma destas modalidades as células da presente invenção são preferivelmente de origem humana, uma vez que usando células humanas como camada alimentadora minimiza o risco de contaminar a cultura de células com componentes derivados de animais como patógenos ou imunógenos de animais. Neste respeito, é para ser observado que as células da invenção podem ser cultivadas sob condições livres de soro. Conse-

qüentemente, empregando as células como camada alimentadora e cultivando a cultura de célula sob com meios livres de soro como os aqui descritos depois, ou em Draper et al. (Culture and Characterization of human embryonic stem cell lines, Stem Cells Dev 2004, 13:325-336) ou no Pedido de Patente Internacional WO 98/30679, por exemplo.

[00065] Nesta conexão, é observado que em cirurgia de transplantação e terapia com base em célula, quantidades altas de células de passagem baixa com uma proporção mínima de células senescentes (isto é, proporção grande de células de qualidade alta) são cruciais e requeridas para ser derivadas dentro do tempo mais curto possível durante a expansão de célula. Por exemplo, células-tronco mesenquimais da medula óssea e sangue de cordão são baixas em quantidade e portanto requerem expansão em muitas passagens durante um período longo de tempo para alcançar o número suficiente de células requerido para transplante celular. As células de passagem alta tendem a deteriorar-se, porém em qualidade e podem levar à senescência da célula ou transformação cancerosa. Foi observado aqui que quantidades altas de células da presente invenção podem ser obtidas através de números de passagem baixa usando uma técnica de explantação repetitiva. A presente invenção desse modo também refere-se a um método de cultivar células-tronco/progenitoras da invenção, em que este método compreende:

Obter um explante de tecido da membrana amniótica do cordão umbilical;

Cultivar o explante de tecido em meios de cultivo e condições de cultivo adequados em um período adequado de tempo,

Opcionalmente expor o explante de tecido aos meios de cultivo frescos e continuar o cultivo sob condições adequadas em um período adequado de tempo (cf., figura 15).

[00066] O cultivo pode ser realizado como muitos ciclos (passagens) conforme querido e ser parado uma vez o número desejado de células foi obtido. Exposição do explante de tecido ao cultivo fresco pode ser realizada removendo o meio de cultivo de célula usado do vaso usado para cultivar as células e acrescentar meios frescos àquele vaso. Em vez de substituir os meios no vaso usado, exposição aos meios de cultivo frescos pode ser alcançada transferindo o explante de tecido para um vaso novo que está cheio com meios de cultivo. O explante de tecido usado para cultura/propagação das células pode ser obtido por qualquer método adequado, por exemplo pela "técnica de explante de tecido direta" como explicado acima (em que o tecido é colocado primeiro em meios sem enzimas, e depois sob condições cuidadosas as células separam por si só da massa de tecido principal - e as células são depois colhidas para coletânea).

[00067] O cultivo dos explantes de tecido pode ser realizado em quaisquer meios que é adequado para o cultivo de células mamíferas. Exemplos incluem os meios convencionais e comercialmente disponíveis como os que são acima dados com respeito ao cultivo ou à expansão clonal das células da invenção, mas não limitados a, Meio de KGM®-Queratinócito (Cambrex), MEGM-Meio de Célula Epitelial Mamária (Cambrex), meio de EpiLife (Cascade Biologics), Meio 171 (Cascade Biologics), DMEM, DMEM-F12 ou meios de RPMI. O cultivo é tipicamente realizado em condições (temperatura, atmosfera) que são normalmente usadas para o cultivo de células das espécies das quais as células são derivadas, por exemplo, a 37°C em atmosfera de ar com 5% de CO₂. Em uma modalidade, o cultivo é realizado usando soro livre, em particular meios livres de soro bovino. O cultivo (em uma passagem) é executado durante qualquer tempo adequado que as células precisam para crescimento, tipicamente, mas de forma alguma limitado a, durante cerca de 1 a vários dias, por exemplo a cerca de 7

ou cerca de 8 dias.

[00068] As invenções ilustrativamente aqui descritas podem ser praticadas adequadamente na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações, não especificamente revelados(as) aqui. Desse modo, por exemplo, os termos "compreendendo", "incluindo", "contendo", etc. devem ser lidos expansivamente e sem limitação. Adicionalmente, os termos e expressões empregados aqui foram usados como termos de descrição e não de limitação, e não há nenhuma intenção no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou porções destes, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Desse modo, deveria ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada por modalidades preferidas e características opcionais, modificação e variação das invenções nelas incorporadas aqui reveladas podem ser re-arranjadas por aqueles versados na técnica, e tais modificações e variações são consideradas estar dentro do escopo desta invenção.

[00069] A invenção foi descrita ampla e geralmente aqui. Cada uma das espécies mais restritas e agrupamentos subgenéricos que caem dentro da revelação genérica também fazem parte da invenção. Isto inclui a descrição geral da invenção com uma condição ou limitação negativa que remove qualquer assunto do gênero, independente se ou não o material excisado é especificamente citado aqui.

[00070] Outras modalidades estão dentro das reivindicações a seguir e exemplos não-limitativos. Além disso, onde características ou aspectos da invenção são descritos em termos de grupos de Markush, aqueles versados na técnica reconhecerão que a invenção é também assim descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo

de membros do grupo de Markush.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: COLETÂNEA DE TECIDO DO CORDÃO UMBILICAL

[00071] Tecido do cordão umbilical é colhido imediatamente após o parto da criança. O espécime é enxaguado limpo e imediatamente transferido para uma garrafa de vidro estéril de 500 ml contendo o meio de transporte de cultura (meio L-15 suplementado com 50 IU/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 250 µg/ml de fungizona, 50 µg/ml gentamicina; todos os reagentes comprados de Invitrogen) antes do transporte para o laboratório. No laboratório, extração das células-tronco é conduzida em uma capela de fluxo laminar sob condições estéreis. O espécime é transferido primeiro para uma bandeja de aço inoxidável estéril. Todo sangue restante nos vasos de cordão é removido por múltiplas lavagens de injeção usando solução salina tampoadada de fosfato morna (PBS) suplementada com 5 IU/ml de heparina (de Sigma). PBS claro sem heparina é usado nas lavagens finais. O espécime de tecido do cordão umbilical é depois cortado em pedaços de 2 cm em comprimento e transferido para discos de cultura de célula de 10 cm de diâmetro onde outra lavagem e desinfecção são executadas com 70% de etanol seguido por lavagens múltiplas usando PBS contendo uma mistura antibiótica (50 IU/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 250 µg/ml de fungizona, 50 µg/ml de gentamicina; todos comprados de Invitrogen) até que a solução fica clara.

EXEMPLO 2: SEPARAÇÃO/CULTIVAÇÃO DE CÉLULA

[00072] Dissecção do tecido do cordão umbilical é primeiro executada para separar a membrana amniótica do cordão umbilical da geléia de Wharton (isto é, a matriz do cordão umbilical) e outros componentes internos. A membrana amniótica isolada é depois cortada em pedaços pequenos (0,5 cm x 0,5 cm) para isolamento da célula. Explante é executado colocando os pedaços da membrana amniótica do cordão

umbilical em discos de cultura de tecido em condições de cultura de célula diferentes para isolamento de células-tronco epiteliais ou mesenquimais.

[00073] Para separação/cultivação das células mesenquimais, os explantes foram submersos em 5 ml de DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Hyclone) (DMEM/10% de FBS) e mantidos em uma incubadora de cultura de célula de CO₂ a 37° C. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Desenvolvimento da célula foi monitorado sob microscopia de luz. Desenvolvendo, as células foram colhidas através de tripsinização (0,125% de tripsina/0,05% de EDTA) para expansão adicional e crio-preservação usando DME-M/10% de FBS.

[00074] Para separação/cultivação das células epiteliais, superfícies de plástico de cultura de célula foram revestidas com misturas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2) antes de colocar as amostras de tecido na superfície. As amostras de tecido foram submergidas em 5 ml de meio de EpiLife ou Meio 171 (ambos de Cascade Biologics). O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Desenvolvimento da célula de explantes de cultura de tecido foi monitorado sob microscopia de luz. Desenvolvendo, as células foram colhidas através de tripsinização (0,125% de tripsina/0,05% de EDTA) usando meio de EpiLife ou Meio 171.

[00075] Para o método de extração enzimática das células, membrana amniótica do cordão umbilical foi dividida em pedaços pequenos de 0,5 cm x 0,5 cm e digerida em 0,1% (p/v) de solução do tipo 1 de collagenase (Roche Diagnostics) a 37° C durante 6 horas. As amostras foram submetidas à vórtice a cada 15 min por 2 min. Células foram colhidas através de centrifugação a 4000 rpm durante 30 min. Foram empregados dois métodos diferentes para isolar as células-tronco epiteliais ou mesenquimais.

[00076] Para isolamento das células-tronco epiteliais, os péletes de

célula foram ressuspensos em meio de EpiLife ou Meio 171 (ambos de Cascade Biologics) suplementado com 50 µg/ml de fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), 50 µg/ml de fator-BB de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-BB), 5 µg/ml de fator-β1 de crescimento de transformação (TGF-β1) e 5 µg/ml de insulina (todos obtidos de R&D System), contadas e semeadas em discos de cultura de tecido de 10 cm pré-revestidos com misturas de colágeno 1/colágeno 4 (1:2; Becton Dickinson) em densidade de 1×10^6 células/disco. Após 24 horas, células ligadas foram lavadas com PBS morno e o meio foi substituído com meio de EpiLife suplementado-adicionado com Meio 171. O meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias. O crescimento de célula e a formação clonal de expansão foram monitorados sob microscopia de luz. A uma confluência de cerca de 70%, as células foram subcultivadas através de tripsinaização (0,125% de tripsina/0,05% de EDTA) para expansão e crio-preservação adicionais.

[00077] Para isolamento das células-tronco mesenquimais, os péletes de célula foram ressuspensos em DMEM/10% de FBS, contados e semeados em discos de cultura de tecido de 10 cm a densidade de 1×10^6 células/disco. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Crescimento e expansão das células foram monitorados sob microscopia de luz. A uma confluência de cerca de 90%, as células foram subcultivadas como esboçado acima.

[00078] Para cultivo de células-tronco epiteliais ou mesenquimais na camada alimentadora, a membrana de revestimento do cordão umbilical foi digerida através de tratamento de collagenase, contada e semeada em discos de cultura de tecido de 10 cm revestidos com fibroblastos letalmente irradiados ou tratados com Mitomicina C 3T3 (camada alimentadora) em meio Green. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias. Formação de colônia foi monitorada sob microscopia de luz e fotografada.

EXEMPLO 3: IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS

[00079] CÉLULAS EPITELIAIS: figura 1 mostra quadros de desenvolvimento de células epiteliais da membrana amniótica do cordão umbilical preparadas pelo método usando explante de tecido (ampliação de 40 x). Fotos foram tiradas no dia 2 (figura 1A) e dia 5 (figura 1B, C) da cultura de tecido. Análise de morfologia de célula demonstrou células semelhantes às epiteliais em forma poliédrica. Digestão enzimática dos segmentos do cordão umbilical rendeu células epiteliais similares (figura 2) no dia 2 (figura A, C) e dia 5 (figura B, D) (ampliação de 40 x). figura 7 mostra quadros de formação de colônia de células-tronco epiteliais da membrana amniótica do cordão umbilical cultivadas em camada alimentadora usando método Green (ampliação de 40 x). Uma colônia de células semelhantes às epiteliais em forma poliédrica expandiram-se rapidamente do dia 3 ao dia 7.

[00080] CÉLULAS MESENQUIMAIS: Desenvolvimento de células mesenquimais explantadas da membrana amniótica do cordão umbilical foi observado já em 48 horas após colocação em discos de cultura de tecido usando DMEM suplementado com 10% de soro de bezerro fetal (FCS) como meio de cultura (figura 3A, C) (ampliação de 40 x). As células foram caracterizadas por sua morfologia em forma de fuso, e migradas e expandidas tanto fácil como rapidamente *in vitro*, estritamente se assemelhando aos fibroblastos (figura 3B, D) (ampliação de 40 x). Observações similares foram observadas no grupo de célula isolada por digestão enzimática de colagenase (figura 4). figura 4A mostra células mesenquimais isoladas da membrana amniótica do cordão umbilical no dia 2. Proliferação das células foi observada no dia 5 (figura 4B) (ampliação de 40 x). Figuras 6 e 8 mostram quadros de formação de colônia de células-tronco mesenquimais da membrana amniótica do cordão umbilical cultivada em condição de camada não-

alimentadora e de camada alimentadora em DMEM/10% de FCS (ampliação de 40 x). As colônias de células semelhantes às fibroblásticas em forma alongada se expandiram rapidamente do dia 3 ao dia 7.

[00081] Análise de western blot (figura9) mostra que as células-tronco mesenquimais da membrana amniótica do cordão umbilical (UCMC) e células epiteliais do cordão umbilical (UCEC) isoladas de acordo com a invenção expressaram o gene de POU5f1 que codifica o fator de transcrição Octâmero-4 (Oct-4) um marcador específico de células-tronco embrionárias (cf. Niwa, H., Miyazaki, J. e Smith, A. G. (2000). *Nat. Genet.* 24, 372-376), desse modo, esta análise indica as propriedades semelhantes às embrionárias destas células-tronco. Estas células também altamente expressaram os outros fatores de crescimento como fator de crescimento de tecido conjuntivo (CTGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à placenta, PLGF, STAT3, fator de célula-tronco (SCF), Fator de Crescimento Derivado de Hepatoma (HDGF), Fator-2 de Crescimento de Fibroblasto (FGF-2), Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF), alfa Actina de Músculo Liso (α -SMA), Fibronectina, Decorina, Sindecin-1,2,3,4. Na figura 9, a expressão destes genes é comparada para fibroblastos dérmicos humanos, células mesenquimais de medula óssea (BMSC) e células mesenquimais derivadas adiposas (ADMC). figura 9 também mostra Activina A e Folistatina altamente segregadas (ambas destas proteínas são bem conhecidas promover reparo e regeneração de tecido, angiogênese intensificada e mantêm cultura de células-tronco embrionárias, de forma que expressão dos respectivos genes é um sinal para as propriedades embrionárias e habilidade das células para diferenciar) detectadas através de ensaio de ELISA em sobrenadantes mesenquimais do cordão umbilical e cultura de células-tronco epiteliais comparadas com medula óssea, células-tronco derivadas adiposas, fibroblastos dérmicos huma-

nos e ceratinócitos epidérmicos. Também estes resultados indicam que as células da invenção são as candidatas promissoras na aplicação terapêutica destas áreas de células como medicina regenerativa, medicina de envelhecimento, reparo de tecido e engenharia de tecido.

[00082] Células mesenquimais foram também caracterizadas por análise de citocinas segregadas e fatores de crescimento comparadas com células-tronco mesenquimais de medula óssea humanas. As células-tronco epiteliais do cordão umbilical (UCEC) foram analisadas comparadas com ceratinócitos epidérmicos humanos. Esta análise foi realizada como segue: Brevemente, UMMC, UCEC, fibroblastos dérmicos, células mesenquimais de medula óssea, ceratinócitos epidérmicos foram cultivados em meios de crescimento até 100% de confluência (37°C, 5% de CO₂) e depois sincronizados em meio de inanição (DMEM livre de soro) durante 48 horas. No próximo dia, o meio foi substituído pelo próximo contra DMEM livre de soro fresco e as células foram depois cultivadas durante outras 48 horas. Os meios condicionados foram colhidos, concentrados e analisados usando um Arranjo de Citocina (RayBiotech, Inc, GA, USA).

[00083] Os resultados desta análise mostram que UCMC segregam Interleucina-6 (IL-6); (MCP1); fator de crescimento de hepatócito (HGF); Interleucina-8 (IL8); sTNFR1; GRO; TIMP1; TIMP2; TRAILR3; uPAR; ICAM1; IGFBP3; IGFBP6 (figura11), enquanto que UCEC segrega IGFBP-4; PARC; EGF; IGFBP-2; IL-6; Angiogenina; GCP-2; IL1R α ; MCP-1; RANTES; SCF; TNF β ; HGF; IL8; sTNFR; GRO; GRO- α ; Anfirregulina; IL-1R4/ST2; TIMP1; TIMP2; uPAR; VEGF (figura12).

[00084] Conseqüentemente, isto mostra que ambos os tipos de células segregam quantidades grandes de citocinas e fatores de crescimento que representam papéis importantes em biologia desenvolvendo, homeóstase de tecido, reparo de tecido e regeneração e angiogênese. Isto também demonstra a versatilidade das células da invenção

para o uso nas respectivas aplicações terapêuticas.

[00085] Além disso, as células da invenção foram também examinadas com respeito a seu perfil de segurança usando ensaio de formação de teratoma de camundongo como um indicador. Seis camundongos de SCID foram usados nestes experimentos. Uma suspensão de mais de 2 milhões de UCMC foi injetada com uma agulha estéril de 25G no músculo da coxa de cada camundongo de SCID. Os animais foram mantidos até 6 meses e formação de tumor foi avaliada. Nenhuma formação de tumor foi observada nestes camundongos (dados não mostrados). Isto indica que as células da invenção são seguras e não têm capacidade para formar tumores, benignos ou diferentes.

EXEMPLO 4: CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS EM MEIOS LIVRES DE SORO

[00086] Células de UCMC foram cultivadas em DMEM contendo 10 FCS e em meios livres de soros, PTT-1, PTT-2 e PTT-3. Os três meios PTT-1, PTT-2 e PTT-3 foram preparados por um dos inventores presentes, Dr Phan. Em resumo, estes 3 meios não contêm soro bovino fetal ou humano, mas contêm diferentes citocinas e fatores de crescimento como IGF, EGF, TGF-beta, Activina A, BMPs, PDGF, transferri-na e insulina. Os componentes de fator de crescimento variam entre os meios para avaliar as características de crescimento de diferencial. O cultivo foi realizado como segue: Proporções diferentes de fatores de crescimento e citocinas foram adicionadas em meios basais. UCMC foi descongelada e mantida nestes meios durante 10 dias. Proliferação de célula foi monitorada sob microscopia de luz.

[00087] Figura 13 mostra crescimento de UCMC bom nos 4 grupos de meios diferentes (figura 13-1 a figura13-5), em que a morfologia das células de UCMC é diferente dependendo da razão ou proporção das citocinas ou fatores de crescimento presentes nos respectivos meios. Em contraste, medula óssea e células mesenquimais derivadas

adiposas não cresceram bem nestes meios livre de soros (figura13-6 e figura13-7). Conseqüentemente, o bom crescimento da UCMC demonstra a robustez das células da invenção e sua viabilidade alta, indicando que suas características de crescimento são superiores às fontes convencionais de células-tronco mesenquimais como células mesenquimais derivadas da medula óssea e derivadas adiposas. Neste respeito, vale a pena observar que meio livre de soro (bovino) foi usado nestes experimentos e que a maior parte das células mesenquimais humanas não cresce bem em sistemas de meio livre de soros. Desse modo, usando as células da invenção com relação às tecnologias de meios livres de soro definidas são uma grande vantagem em terapia de célula como os riscos de usar soro bovino fetal para cultura de célula e expansão ser removida. (Embora o uso de soro bovino foi praticado por muito tempo e tipicamente otimiza o crescimento das células, preocupações de seu uso foram elevadas sobre a transmissão de zoonoses como Encefalopatia Espongiforme Bovina (Doença da Vaca Louca)).

EXEMPLO 5: CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENE DAS CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS OU MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL

[00088] O perfil de expressão de gene de células-tronco epiteliais e mesenquimais do cordão umbilical foi analisado usando um microarranjo de DNA. Para este propósito, UCMC e UCEC foram cultivados em meios de crescimento a 37°C, 5% de CO₂ até 100% de confluência. Células foram sincronizadas em meios basais durante 48 horas depois substituídas com meios basais frescos durante outras 48 horas. RNA total foi colhido e enviado para Silicon Genetics Microarray Service. Análise dos dados foi executada usando GeneSpring 7.2). figura 14 resume a expressão de gene global. UCEC expressou um total de 28055 genes e UCMC expressou um total de 34407 genes. Há 27308

genes de sobreposição que expressam em ambos os tipos de célula. 747 genes expressos foram únicos para UCEC e 7099 genes expressos foram único para a UCMC. Os genes selecionados de interesse são apresentados na figura 14.

[00089] Ambos os tipos de célula-tronco expressaram 140 genes relacionados às células-tronco embrionárias e desenvolvimento embrionário, suportando também que as células da invenção têm propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias: Nanog; Proteína alfa-fetal; Fator-3 de transcrição de leucemia de pré-célula B; Laminina alfa 5; Semelhante ao antígeno carcinoembriônico 1; contendo domínio de abidrolase 2; Semelhante a Delta 3 (Drosophila); Semelhante a Muscleblind (Drosophila); Complexo de locus GNAS; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriônico 3; Proteína de palmitoil tioesterase 2; Beta-1-glicoproteína 2 específica de gravidez; Semelhante ao antígeno carcinoembriônico 1; Desenvolvimento de ectoderma embrionário; Cinase de zíper de leucina embrionária materna; Hormônio de somatomatotropina coriônica 2; Caixa Forkhead D3; homólogo de franja radical (Drosophila); Membro da família de cinesina 1B; Miosina, polipeptídeo 3 pesado, músculo do esqueleto, embrionário; Malformação de mão/pé partidos (ectrodactilia) tipo 3; Membro da família de domínio de TEA 3; Laminina, alfa 1; Hormônio de somatomatotropina coriônica 1; lactogênio placentário; Receptor de hormônio de liberação de corticotropina 1; fator embrionário tirotrófico; Translocador nuclear de receptor de aril-hidrocarboneto 2; Proteína relacionada frisada da membrana; Colágeno de Neurregulina 1, tipo XVI, alfa 1; Neurregulina 1; Hormônio de somatomatotropina coriônica 1 (lactogênio placentário); Repetição em triplete de CUG, Proteína de ligação de RNA 1; Hormônio de somatomatotropina coriônica 1 (lactogênio placentário) Semelhante à Bistina; Inibidor da família de MyoD; Induzido por ácido retinóico 2; Complexo de locus GNAS; Fator

de transcrição de leucemia de pré-célula B 4; Laminina, alfa 2 (merosina, distrofia muscular congênita); SMAD, mães contra Homólogo de DPP 1 (Drosophila); Seqüência transcrita de Homo Sapiens com similaridade moderada para proteína pir:D28928 (H. sapiens) D28928 beta-1 glicoproteína gravidez-específica IB, abortiva - humana (fragmento); Membro da família de cinesina 1B; Semelhante a Bruno 4, proteína de ligação de RNA (Drosophila); Proteína específica para cérebro de embrião; Inibidor de crescimento induzido por gravidez; SMAD, mães contra homólogo de DPP 5 (Drosophila); Hormônio de somatomamotropina coriônica 2; Polipeptídeo de ativação de adenilato ciclase 1 (pituitária); Molécula de adesão de célula relacionada a antígeno carcinoembriônico; Laminina, alfa 3; Proteína O-fucosiltransferase 1; Dentado 1 (síndrome de Alagille); Homólogo de gastrulação torcido 1 (Drosophila); ELAV (visão letal, anormal embrionária, Drosophila) semelhante 3 (antígeno de Hu C); Fator embrionário tirotrófico; Família de portador soluto 43, membro 3; Inversina; nefronoftise 2 (infantil); inversão de giro embrionário; Inversina de Homo sapiens (INVS), variante de transcrição 2, mRNA; Seqüência transcrita de Homo Sapiens; Homeo box D8; Substrato Fyn-associado embrionário; ELAV (visão letal, anormal embrionária, Drosophila) semelhante 1 (antígeno de Hu R); Contendo domínio básico de hélice-alça-hélice, classe B, 2; Receptor de Oxitocina; Fator de crescimento derivado de teratocarcinoma 1; Tirosina cinase Fms-relacionada 1 (fator de crescimento endotelial vascular/receptor de receptor de fator de permeabilidade vascular); Adrenomedulina; Repetição em triplete de 6-CUG de coativador de receptor nuclear, Proteína de ligação de RNA 1; Homólogo de gastrulação torcido 1 (Drosophila); Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriônico 4; Proteína tirosina fosfatase, tipo de receptor, R; Ortólogo de região mínima de letalidade embrionária de Acrg (camundongo); Receptor de EPH A3; Semelhante a Delta 1 (Dro-

sophila); Fator de LHRH embrionário nasal; Semelhante a CP2 de fator de transcrição 1; Malformação de mão/pé partidos (ectrodactilia) tipo 3; Denteado 2; Seqüência transcrita de Homo Sapiens; Neurregulina 1; Malformação de mão/pé partidos (ectrodactilia) tipo 1; Família de portador soluto 43, membro 3; Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase/3-cetoacil-coenzima A tiolase/enoil-coenzima A hidratase (proteína trifuncional), subunidade alfa; Fucosiltransferase 10 (alfa (1,3) fucosiltransferase); Ortólogo de região mínima de letalidade embrionária de Acrg (camundongo); Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 7; Nucleofosmina/nucleoplasmina, 2; Fragmento de Fc de IgG, receptor, transportador, alfa; Homólogo de gastrulação torcido 1 (Drosophila); Homo Sapiens similar à classificação de proteína vacuolar 35; materno-embrionário 3 (LOC146485), mRNA; contendo domínio de abidrolase 2; T, homólogo de brachyury (camundongo); domínio de desintegrina A e metaloproteinase 10; Proteína ribossômica L29; Enzima de conversão de endotelina 2; ELAV (visão letal, anormal embrionária, Drosophila) semelhante 1 (antígeno de Hu R); Trofinina; Homeo box B6; Laminina, alfa 4; Homeo box B6; proteína hipotética FLJ13456; NACHT, contendo repetição rica em leucina e PYD 5; ELAV (visão letal, anormal embrionária, Drosophila) semelhante 1 (antígeno de Hu R); fator de transcrição de célula embrionária indiferenciada 1; Proteína A de plasma associada à gravidez, papalisina 1; Secretoglobina, família 1A, membro 1 (uteroglobina); Hormônio semelhante ao hormônio da paratireóide; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 1 (glicoproteína biliar); Laminina, alfa 1.

[00090] Ambos os tipos de célula-tronco também expressaram milhares de genes relacionados à biologia desenvolvendo, crescimento de célula e diferenciação, homeóstase de célula, reparo e regeneração de célula e de tecido. Exemplos de tais fatores de crescimento e seus

receptores são como segue: (G-CSF, FGFs, IGFs, KGF, NGF, VEGFs, PlGF, Angiopoietina, CTGF, PDGFs, HGF, EGF, HDGF, TGF-beta, Activinas e Inibinas, Folistatina, BMPs, SCF/c-kit, LIF, WNTs, SDFs, OncostatinaM, Interleucinas, Quimiocinas e muitos outros); MMPs, matrizes extracelulares de TIMPs (colágenos, lamininas, fibronectinas, vitronectinas, tenascinas, intergrinas, sindecanos, decorina, fibromoludina, proteoglicanos, esparco/osteonectina, mucina, netrina, glipicano, proteína associada à cartilagem, matriline, hialuronana, fibulina, ADAMTS, biglicano, discoidina, componentes de desmosoma, ICAMs, caderinas, cateninas e muitos outros); citoceratinas.

[00091] Há grupos de genes presentes apenas em UCMC. Estes genes são relacionados com os seguintes: Processos Fisiológicos Normais (Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Semelhante à insulina 4 (placenta); Relaxina 1; Plasminogênio; Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Semelhante à insulina 5; Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Fator de crescimento semelhante à insulina 2 (somatomedina A), Homeóstase (Semelhante a spokehead radial 1; Hemocromatose; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 5; Receptor A de interleucina 31; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 12 (fator derivado de célula estromal 1); subfamília de receptor nuclear 3, grupo C, membro 2; Hemocromatose; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 23; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 23; Ferritina mitocondrial; Receptor ativado proliferativo de peroxissoma, gama, coativador 1, alfa; Tensoativo, proteína D pulmonar-associada; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 11; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 3; homólogo nove de Egl 2 (C. elegans); Receptor ativado proliferativo de peroxissoma, gama, coativador 1, beta; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 1; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 12 (fator derivado de célula estromal 1); ATPase, transporte de Na⁺/K⁺, alfa 2 (+) polipeptídeo; Ligando de

quimiocina (motivo C) 2; Hemopexina; Receptor de rianodina 3), Morfogénia (Eespectrina, alfa, eritrocítica 1 (eliptocitose 2); Homeo box D3; Homólogo ausente dos olhos 1 (Drosophila); família de gene de homólogo de Ras, membro J; Transcrição específica de leucócito 1; Receptor de ectodisplasina A2; Glipicano 3; Gene de caixa emparelhada 7; Corina, serina protease; Desordenado, homólogo dsh 1 (Drosophila); família de gene de homólogo de Ras, membro J; Caixa T 3 (síndrome mamária ulnar); Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; SRY (região de determinação do sexo Y)-caixa 10; Miosina, polipeptídeo pesado 9, não-músculo; Receptor hormônio luteinizante/coriogonadotropina; homólogo de franja radical (Drosophila); Proteína relacionada frisada segregada 5; família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 11; Homólogo ausente dos olhos (Drosophila); semelhante a muscleblind (Drosophila); Caixa T 5; Semelhante a Mab-21 1 (C. elegans); Específico para captura de crescimento 2; Combinação sexual em homólogo de meia-perna 1 (Drosophila); Caixa T 6; proteína de LIM de ligação de Filamina 1; Molécula de adesão celular de melanoma; Homólogo de torção 1 (acrocefalosindactilia 3; Síndrome de Saethre-Chotzen) (Drosophila); Homeo box A11; Ceratocan; Fator de crescimento de fibroblasto 1 (acídico); Carboxipeptidase M; proteína efetora de CDC42 (ligação de Rho GTPase) 4; fator de transcrição de homeobox LIM 1, beta; Homólogo Denteado 1; Carboxipeptidase M; Fator de crescimento de fibroblasto 8 (induzido por andrógeno); Fator de crescimento de fibroblasto 18; Transcrição específica de leucócito 1; Endotelina 3; Semelhante ao fator de transcrição domínio homeo emparelhado 1), Desenvolvimento Embrionário (beta-1-glicoproteína específica de gravidez 3; Semelhante a ELAV (visão letal, anormal embrionária, Drosophila) 4 (antígeno de Hu D); receptor acoplado à proteína G 10; Receptor de A2 de ectodisplasina; Cassete de ligação

de ATP, subfamília B (MDR/TAP), membro 4; Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 11; Fator de LHRH embrionário nasal; Relaxina 1; Homólogo de Notch 4 (Drosophila); Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 6; pih-2P; Proteína relacionada à síndrome de hipertensão induzida por gravidez em Homo Sapiens (PIH2); Glicoproteína oviducal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); Proteína endometrial associada à progesterona; Miosina, polipeptídeo leve 4, álcali; atrial, embrionário; Prolactina; Homólogo de Notch 4 (Drosophila); Fator de transcrição de leucemia de pré-célula B 1; homólogo de franja radical (Drosophila); Hormônio de liberação de corticotropina; Subfamília de receptor nuclear 3, grupo C, membro 2; Neurregulina 2; Semelhante a Muscleblind (Drosophila); Miosina, polipeptídeo leve 4, álcali; atrial, embrionário; clone de FLJ27401 fis. de cDNA de Homo sapiens, WMC03071; Extra-embriônico, espermatogênese, semelhante a homeobox 1; Semelhante à insulina 4 (placenta); Gene de glicoproteína específico de pseudo-gravidez processado humano (PSG12), regiões não-transladadas de 3' contendo éxon B2C de 2 sítios de encaixe alternativos C1 e C2; Tiro-sina cinase Fms-relacionada 1 (receptor de fator de crescimento endotelial vascular/receptor de fator de permeabilidade vascular); Fator de transcrição de leucemia de pré-célula B 1; beta-1-glicoproteína específica de gravidez 3; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriônico 1 (glicoproteína biliar); Sulfatase de esteróide (microsomal), arilsulfatase C, isozima S; Homeobox B6; Proteína O-fucosiltransferase 1; fator de transcrição de homeobox de LIM 1, beta; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriônico 1 (glicoproteína biliar); Hormônio estimulante de folículo, polipeptídeo beta; Inibidor de angiotensinogênio proteinase (serina (ou cisteína), clade A (alfa-1 antiproteinase, antitripsina), membro 8); Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembriônico 6 (antígeno de reação cruzada não-específica); Proteína cinase C, proteína de li-

gação alfa; Membro da subfamília de colectina 10 (lectina do tipo C); Laminina, alfa 1), Espaço Extracelular (Carboxilesterase 1 (de monócito/macrófago serina esterase 1); Fator de crescimento de fibroblasto 5; Progastricsina (pepsinogeno C); Antígeno associado ao esperma 11; Proproteína convertase subtilisina/cexina tipo 2; Proteína de ligação de hialuronano 2; Domínio sema, domínio de imunoglobulina (Ig), domínio básico curto, segregado, (semaforina) 3F; Interleucina 2; Semelhante à quimiotripsina; Doença de Norrie (pseudoglioma); mucina 5, subtipos A e C, traqueobronquial/gástrico; Carboxipeptidase B2 (plasma, carboxipeptidase U); homólogo de franja radical (Drosophila); Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 11; Meprina A, alfa (hidrolase de peptídeo PABA); Taquicinina, precursor 1 (substância K, substância P, neuroquinina 1, neuroquinina 2, neuromedina L, neuroquinina alfa, neuropeptídeo K, neuropeptídeo gama); Fator de crescimento de fibroblasto 8 (induzido por andrógeno); Fator de crescimento de fibroblasto 13; Hemopexina; Câncer de mama 2, princípio precoce; Fator de crescimento de fibroblasto 14; Retinosquise (ligado a X, juvenil) 1; Semelhante à quitinase 3 1 (glicoproteína-39 de cartilagem); Distonina; Secretoglobina, família 1D, membro 2; Noggina; domínio de quatro núcleos de dissulfeto de WAP 2; Semelhante ao antígeno de CD5 (família rica em cisteína de receptor de descontaminante); Proteína responsiva a scrapie 1; Homólogo de grenlina 1, superfamília de nó de cisteína (*Xenopus laevis*); Interleucina 16 (fator quimioatraente de linfócito); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 26; Nucleobindina 1; Fator de crescimento de fibroblasto 18; Proteína de ligação de fator de crescimento semelhante à insulina 1; Tensoativo, proteína pulmonar-associada A1; Homólogo semelhante a delta 1 (*Drosophila*); Transcrição regulada por cocaína e anfetamina; Meprina A, beta; Interleucina 17F; Fator de complemento H; Proteína secretória rica em cisteína 2; Distonina; Domínio de quatro núcleos de dissulfeto de WAP 1; Prolac-

tina; Tensoativo, proteína pulmonar-associada B; Fator de crescimento de fibroblasto 5; Homólogo de dickkopf 2 (*Xenopus laevis*); Antígeno associado ao esperma 11; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 11; Meprina A, alfa (Hidrolase de peptídeo de PABA); Semelhante à quitinase 3 2; fator de crescimento induzido por C-fos (fator de crescimento endotelial vascular D); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 4; Receptor de Poliovírus; Hialuronoglucosaminidase 1; Glicoproteína oviductal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 9; Proteína relacionada frisada segregada 5; Amelogenina (amelogênese imperfeita 1, Ligado a X); Relaxina 1; Esparco/osteonectina, proteoglicano de domínios semelhantes de cwcw e kazal (testican); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 26; Fator de crescimento de fibroblasto 1 (ácido); Semelhante à angiopoietina 2; Tirosina cinase Fms-relacionada 1 (fator de crescimento endotelial vascular/receptor de fator de permeabilidade vascular); Distonina; Semelhante à insulina 4 (placenta); Transcobalamina II; anemia macrocítica; Ligando de quimiocina (motivo C-C); Proteína de ligação de fator de crescimento semelhante à insulina, subunidade lábil a ácido; Fator de complemento H; Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 6; Homólogo de prata (camundongo); Proteoglicano 4; Fator de crescimento de fibroblasto 16; Proteína semelhantes à citocina C17; Granulisina; Angiopoietina 2; Cromogranina B (secretogranina 1); Domínio de Sema, domínio de imunoglobulina (Ig), e Âncora de membrana de GPI, (semaforina) 7A; Pleiotrofina (fator de crescimento de ligação de heparina 8, fator de promoção de crescimento de neurite 1); Canal de cloreto, ativado com cálcio, membro da família 3; Secretoglobina, família 1D, membro 1; Fibulina 1; Receptor de fosfolipase A2 1, 180 kDa), e a Matriz Extracelular (semelhante a ADAMTS 1; Periostina, fator osteoblasto-específico; Glipicano 5; Repetição neuronal rica em leucina 3; Transglutaminase 2 (polipeptídeo C, proteína-glutamina-gama-

glutamyltransferase); Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 2; Proteína associada microfibrilar 4; Glipicano 3; Colágeno, tipo V, alfa 3; Inibidor de tecido de metaloprotease 2; Ceratocano; Proteína de matriz oligomérica de cartilagem; Lumicano; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 3; Estaterina; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 3; Espondina 1, proteína de matriz extracelular; Semelhante à quitinase 3 1 (glicoproteína-39 de cartilagem); Colágeno, tipo IV, alfa 3 (antígeno de Goodpasture); Família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 7B; Colágeno, tipo VI, alfa 2; Lipocalina 7; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 4; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 5 (agrecanase-2); Fibronectina 1; Matrilina 1, proteína de matriz de cartilagem; Proteína hipotética FLJ13710; Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; Metaloprotease de matriz 16 (inserida na membrana); Fator de von Willebrand; Colágeno, tipo VI, alfa 2; Protease de transmembrana, serina 6; Metaloprotease de matriz 23B; Metaloprotease de matriz 14 (inserida na membrana); Repetição neuronal rica em leucina 3; Semelhante a SPARC 1 (mast9, hevina); Esparco/osteonectina, proteoglicano de domínios semelhantes a cwcvc e kazal (testican) 3; Dermatopontina; colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); Amelogenina, Ligado a Y; Nidogen (enactina); Semelhante a ADAMTS 2; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 2; Colágeno, tipo XV, alfa 1; Glipicano 6; Metaloprotease de matriz 12 (elastase de macrófago); Amelogenina (amelogênese imperfeita 1, Ligado a X); Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 15; Protease de transmembrana, serina 6; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de

tipo de trombospondina 1, 16; Esparco/osteonectina, proteoglicano de domínios semelhantes a cwcv e kazal (testican); Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 20; Colágeno, tipo XI, alfa 1; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 1; Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; Asporina (LRR classe 1); Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, auto-sômica dominante); Fosfoproteína 1 segregada (osteopontina, sialoproteína de osso I, ativação precoce de linfócito T 1); Proteína de matriz Gla; Fibulina 5; colágeno, tipo XIV, alfa 1 (undulina); Inibidor de tecido de metaloproteínase 3 (distrofia de Sorsby fundus, pseudo-inflamatória); Colágeno, tipo XXV, alfa 1; Proteína de matriz oligomérica de cartilagem; Colágeno, tipo VI, alfa 1; Condroadarina; Colágeno, tipo XV, alfa 1; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 16; Colágeno, tipo IV, alfa 4; Fosfoproteína acídica de matriz de dentina; Colágeno, tipo IV, alfa 1; contendo repetição de trombospondina 1; Metaloproteínase de matriz 16 (inserida na membrana); Colágeno, tipo I, alfa 2; Fibulina 1; Tectorina beta; Glicosilfosfatidilinositol fosfolipase específica D1; Sobre regulados em gene de câncer colorretal 1). Citoesqueleto: (Filamina B, beta (proteína de ligação de actina 278); Centrina, proteína de mão de EF, 1; Contendo domínio de FERM 3; Integrador de ligação 3; Parvina, gama; Fator de permuta de nucleotídeo de guanina de Rho (GEF) 11; Tirosina cinase 2; Semelhante a Kelch 4 (Drosophila); Eespectrina, beta, eritrocítica (inclui esferocitose, tipo I clínico); Proteína de interação de Arg/Abl ArgBP2; Advilina; Contendo repetição de eespectrina, envelope nuclear 1; Catenina (proteína associada à caderina), delta 1; Semelhante à banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 5; Catenina (proteína associada à caderina), alfa 2; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 3; Sarcoglicano, gama (glicoproteína associada à distrofi-

na de 35 kDa); Nebulina; Timosina, beta, identificada em células de neuroblastoma; proteína cinase-1 dependente de 3-fosfoinosítídeo; proteína de interação de proteína de síndrome de Wiskott-Aldrich; Distonina; Proteína de interação de Huntingtin 1; produto de gene KIAA0316; Tropomodulina 4 (músculo); Deletado em câncer do fígado 1; Semelhante a Vilina; Sintrofina, beta 1 (proteína associada à distrofina A1, 59 kDa, componente básico 1); Proteína cinase, cGMP-dependente, tipo I; Homo Sapiens similar à ceratina 8; citoceratina 8; ceratina, tipo II citoesquelético 8 (LOC345751), mRNA; Aducina 1 (alfa); Proteína cinase C e substrato de caseína cinase em neurônios 3; Distonina; Grupo sanguíneo de Kell; Proteína de interação de Filamina A 1; Específico para captura de crescimento 2; Estrutura de leitura aberta de cromossomo 1 1; Semelhante à estatmina 2; Espectrina, alfa, eritrocítico 1 (eliptocitose 2); Gene de FKSG44; Membro da família de cinesina 1C; Tensina; Captina (proteína de ligação de actina); Neurofibromina 2 (neuroma acústico bilateral); Homologia de plecstrina, domínios de Sec7 e espiral enrolado 2 (citosina-2); Proteína relacionada à actina T1; semelhante à síndrome de Wiskott-Aldrich; semelhante à Kelch 4 (Drosophila); homólogo de Fascina 1, proteína de empacotamento de actina (Strongylocentrotus purpuratus); Anfifisina (síndrome de Stiff-Man com auto-antígeno de 128 kDa de câncer de mama); Semelhante à doença renal policística 2 1; Anquirina 2, neuronal; Proteína cinase de ligação de CDC42 alfa (Semelhante a DMPK); Proteína hipotética FLJ36144; Proteína de interação de Arg/Abl ArgBP2; semelhante à formina 3; Catenina (proteína associada à caderina), beta 1, 88 kDa; Profilina 2; semelhante à sinaptopodina 2; Sintrofina, gama 2; Fosfolipase D2; Engolfamento e motilidade da célula 2 (homólogo de ced-12, C. elegans); Neurofilamento, polipeptídeo leve 68 kDa; Distonina; Semelhante à actina 7B; Membro da família de cinesina 1C; Domínio de PDZ e LIM 3; Aducina 2 (beta); RhoGEF de

interação de obscurina, calmodulina citoesquelética e titina; Tubulina, parálogo de polipeptídeo beta; Proteína de interação de filamina A 1; Talina 1; Homo Sapiens similar a [Segmento 1 de 2] proteína de Piccolo (Aczonina) (LOC375597); proteína efetora de CDC42 (ligação de Rho GTPase) 4; Syndecan 1; Filamina A, alfa (proteína de ligação de actina 280); Profilina 2; fosfatase contendo domínio de C1 semelhante à tensina; Proteína hipotética MGC33407; Família de Rho GTPase 1; Oxidorreductase de Flavoproteína MICAL2; Ativador de secreção Ca^{2+} -dependente; Semelhante à rabfilina 3A (sem domínios de C2); Miosina XVA; Proteína cinase, cGMP-dependente, tipo I; Proteína de interação de cadeia leve reguladora de miosina; Membro da família de cinesina 13B; homólogo de oncogene de RAS muscular; Espectrina, beta, não-eritrocítico 1; TAO cinase 2; Filamina B, beta (proteína de ligação de actina 278); Neurofibromina 2 (neuroma acústico bilateral); Catenina (proteína associada à caderina), alfa 3; interagindo com obscurina, calmodulina citoesquelética e titina de RhoGEF; Coronina, proteína de ligação de actina, 1A; semelhante à banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 1; Espectrina, beta, não-eritrocítico 4; Timosina, beta 4, Ligado a Y; Tectina 2 (testicular); família de gene de homólogo de Ras, membro J; Serina/treonina cinase com domínios de Dbl e de homologia de plecstrina; Distrobrevina, beta; Actina, gama 2, músculo liso, entérico; proteína semelhante a Tara; Caspase 8, protease de cisteína apoptose-relacionada; contendo domínio de repetição de Kelch e BTB (POZ) 10; Mucina 1, transmembrana; proteína de tau associada ao microtúbulo; Tensina; Família de gene de homólogo de Ras, membro F (em filopodia); Aducina 1 (alfa); Actinina, alfa 4; Banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 (eliptocitose 1, Ligado a RH); Homólogo bicaudal D 2 (Drosophila); Anquirina 3, nó de Ranvier (Anquirina G); Miosina VIIA (síndrome de Usher 1B (autossômico recessivo, severo)); Catenina (proteína associada à caderina),

alfa 2; Homo Sapiens similar à ceratina 8, tipo II citoesquelético-humano (LOC285233); homólogo à fascina 3, proteína de empacotamento de actina, testicular; Família de gene de homólogo de Ras, membro J; Proteína estrutural de filamento com contatos 2, faquinina; Desmina; Miosina X; Gene associado à proliferação induzida por sinal; Escinderina; semelhante à coactosina 1 (Dictiostélio); Engolfamento e motilidade de célula 2 (homólogo de ced-12, C. elegans); Tubulina, beta 4; ativador de secreção Ca^{2+} -dependente; contendo domínio de FERM 4A; Actina, alfa 1, músculo do esqueleto; Talina 1; Caldesmon 1; proteína de LIM 1 de ligação de filamina; proteína tau associada ao microtúbulo; Sintrofina, alfa 1 (proteína associada à distrofina A1, 59 kDa, componente ácido); Aducina 2 (beta); proteína de interação de filamina A 1; domínio de PDZ e LIM 3; banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 como 4B; proteína de ligação de FYN (FYB-120/130); Integrador de ligação 3). Extracelular: (Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotina) com motivo do tipo de trombospondina 1, 20; Semelhante a SPARC 1 (mst9, hevina); inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade G (inibidor de C1), membro 1, (angioedema, hereditário); Urocortina; Semelhante à quimiotripsina; polipeptídeo beta de fator de crescimento derivado de plaqueta (homólogo de oncogene viral de sarcoma de símio (v-sis)); Proteína de precursor de regulador endotelial ligação de BMP; Fator de complemento H; semelhante ao hormônio de somatomamotropina crônica 1; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 18 (pulmonar e regulado por ativação); Fibronectina 1; beta-1-glicoproteína 3 específica de gravidez; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotina) com motivo do tipo de trombospondina 1, 3; CocoaCrisp; Semelhante à insulina 4 (placenta); Família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 11; Proteína de matriz oligomérica de cartilagem; Protease de transmembrana, serina 6; Fator de crescimento induzido

por C-fos (fator de crescimento endotelial vascular D); Família com similaridade de seqüência 12, membro B (epididimal); Proteína fosfatase 1, subunidade reguladora 9B, espinofilina; Transcobalamina II; anemia macrocítica; Fator de coagulação V (proacelerina, fator lábil); Fosfolipase A2, grupo IID; Fator de necrose tumoral, proteína alfa-induzida 6; Colágeno, Tipo XV, alfa 1; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 3; colágeno, Tipo XIV, alfa 1 (undulina); Interleucina 19; Inibidor de protease 15; Receptor colinérgico, polipeptídeo 1 nicotínico, beta (músculo); semelhante à lisil Oxidase 3; Semelhante à proteína de ligação de fator de crescimento de insulina 5; Hormônio de crescimento 1; Beta caseína; Semelhante a NEL 2 (galinha); fator I (complemento); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 23; Interferona, alfa 2; Metaloproteinase de matriz 16 (inserida na membrana); Metaloproteinase de matriz 12 (elastase de macrófago); Glipicano 5; Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 3; Fator de crescimento de fibroblasto 6; Homólogo de grenlina 1, superfamília de nó de cisteína (*Xenopus laevis*); Proteína S (alfa); Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; específico de glicosilfosfatidilinositol fosfolipase D1; Fator de crescimento de fibroblasto 1 (ácido); Espondina 1, proteína de matriz extracelular; proteína morfogenética de osso 1; Tensoativo, proteína pulmonar-associada B; fosfoproteína ácida de matriz de dentina; Lipoproteína, Lp(a); Mucina 1, transmembrana; Protease de lectina serina de ligação de Mannan 1 (componente de ativação de C4/C2 de fator reativo de Ra); Meprina A, beta; Secretoglobina, família 1D, membro 1; Asporina (LRR classe 1); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 25; Proteína semelhantes à citocina C17; Semelhante à insulina 5; Meprina A, alfa (Hidrolase de peptídeo de PABA); Proteína responsiva a Scrapie 1; Fator de crescimento de fibroblasto 18; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 9; Inibina, B beta (polipeptídeo beta de activina AB); Fator de crescimento de fibroblasto 8 (induzido por andrógeno);

Granulisina; Transcrição regulada por cocaína e anfetamina; Colágeno, tipo I, alfa 2; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 17; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 23; Esparco/osteonectina, proteoglicano de domínios semelhantes a cwcv e kazal (testican) 3; receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) A, beta 3; Defensina, alfa 4, corticostatina; Repetição neuronal rica em leucina 3; Glipicano 6; Proteína cinase cinase ativada por mitógeno 2; fator de coagulação XI (antecedente de tromboplastina de plasma); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 5; Distonina; Proteína relacionada frisada; Fator de coagulação XIII, polipeptídeo A1; Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Proteína hipotética MGC45438; Antígeno associado ao esperma 11; Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Periostina, fator osteoblasto-específico; Alfa-2-macroglobulina; Receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) A, alfa 5; Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade A (alfa-1 antiproteinase, antitripsina), membro 3; Homólogo de prata (camundongo); Proteína relacionada frisada; Condroadarina; Condroitina beta1,4 N-acetilgalactosaminiltransferase; receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 3, membro da família C; Colágeno, tipo VI, alfa 2; Receptor semelhante a toll 9; Amelogenina, Ligado a Y; Fator de crescimento endotelial vascular B; Semelhante a spokehead radial 1; Tirosina cinase Fms-relacionada 1 (fator de crescimento endotelial vascular/receptor de fator de permeabilidade vascular); Inibidor de protease 16; Interleucina 2; Clusterina (inibidor de lise de complemento, SP-40,40, glicoproteína sulfatada 2, mensagem de próstata reprimida por testosterona 2, apolipoproteína J); Hormônio estimulante de folículo, polipeptídeo beta; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo do tipo de trombospondina 1, 16; Lisozima (amiloidose renal); homólogo de franja radical (Drosophila); Semelhante à proteína de ligação de fator de crescimento de insulina 5; Taxilina;

Apolipoproteína A-V; Fator de crescimento derivado de plaqueta C; Semelhante ao Ligando de quimiocina (motivo C-C) 3 1; Fator de crescimento de fibroblasto 16; Colágeno, tipo VI, alfa 2; Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade C (antithrombin), membro 1; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 11; Colágeno, tipo IV, alfa 4; Tirosina cinase de agammaglobulinemia de Bruton; Fator de crescimento semelhante à insulina 2 (somatomedina A); Domínio inibidor de serina protease do tipo kazal 1; Fibrinogênio, polipeptídeo A alfa; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 1; Inibina, E. beta; globulina de ligação de hormônio de sexo; Colágeno, tipo IV, alfa 1; Aciltransferase de lecitina-colesterol; Proteína secretória rica em cisteína 2; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 1; Precursor de peptídeo natriurético C; Ribonuclease, família AA de RNase, k6; Fator de crescimento de fibroblasto 14; semelhante a ADAMTS 2; Colágeno, tipo IV, alfa 3 (antígeno de Goodpasture); Angiopietina 2; Apolipoproteína L, 3; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 12 (fator derivado de célula estromal 1); proteína de ligação hialuronano 2; Fator de Coagulação VII (acelerador de conversão de protrombina de soro); colágeno, Tipo XIV, alfa 1 (undulina); glicoproteína ovidutal 1, 120 kDa (mucina 9, oviductina); Matrilina 1, proteína de matriz de cartilagem; mucina 5, subtipos A e C, traqueobronquial/gástrico; Superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11b (osteoprotegerina); Transglutaminase 2 (polipeptídeo C, proteína-glutamina-gama-glutamiltransferase); Ceratocano; Colágeno, tipo V, alfa 3; Domínio de quatro núcleos de dissulfeto de WAP 2; Ligando de quimiocina (motivo C-X3-C) 1; Inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade D (co-fator de heparina), membro 1; Proteína secretória LOC348174; Fator de Coagulação X; Interleucina 16 (fator quimioatraente de linfócito); Proteína 2 relacionada à lipase pancreática; HtrA peptidase serina 3; Receptor de glicina, alfa 3; semelhante a antígeno de CD5 (família rica em cisteína de receptor de

descontaminante); Proteína hipotética MGC39497; Fator de coagulação VIII, componente de pró-coagulante (hemofilia A); Dermatopontina; Noggina; contendo domínio de LY6/PLAUR segregado 1; semelhante a ADAMTS 1; Alfa-1-B glicoproteína; estrutura de leitura aberta de cromossomo 20 175; Família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 8B; Fibulina 1; Fibulina 5; Catepsina S; Nidogen (enactina); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 26; Molécula específica para célula endotelial 1; semelhante à quitinase 3 1 (glicoproteína-39 de cartilagem); Receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) A, beta 1; Secretoglobina, família 1D, membro 2; Serina protease de lectina de ligação de Mannan 1 (Componente de ativação de C4/C2 de fator reativo de Ra); Semelhante a ADAMTS 1; Domínio de Sema, domínio de imunoglobulina (Ig) e Âncora de membrana de GPI, (semaforina) 7A; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 15; Proproteína convertase subtilisina/quexina tipo 2; Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C); Retinosquise (Ligado a X, juvenil) 1; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 16; Ligando de quimiocina (motivo C) 2; Fator de crescimento de fibroblasto 5; Antígeno associado ao esperma 11; Proteína associada microfibrilar 4; Receptor de Poliovírus; Cinase regulada por sinal extracelular 8; Protease de transmembrana, serina 6; Proteína cinase C, alfa; semelhante à Quitinase 3 2; Interleucina 9; Apolipoproteína L, 6; Tensoativo, proteína pulmonar-associada A1; Colágeno, tipo VI, alfa 1; Apolipoproteína L, 6; Proteína hipotética FLJ13710; Carboxipeptidase B2 (plasma, carboxipeptidase U); semelhante à bactericida/proteína de aumento de permeabilidade 2; Fator de crescimento de fibroblasto 5; Fosfoproteína segregada 1 (osteopontina, sialoproteína de osso I, Ativação precoce de linfócito T 1); HtrA peptidase serina 3; Deletado em câncer do fígado 1; Molécula

específica de célula endotelial 1; Fator de von Willebrand; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotisina) com motivo de tipo de trombospondina 1, 5 (agrecanase-2); Domínio de Sema, domínio de imunoglobulina (Ig), domínio básico curto, segregado, (semaforina) 3A; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 12 (fator derivado de célula estromal 1); Estaterina; Cinase regulada por sinal extracelular 8; Inibidor de tecido de metaloproteinase 3 (Distrofia de Sorsby fundus, pseudo-inflamatório); Fator de plaqueta 4 (ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 4); Tensoativo, proteína pulmonar-associada D; Fator de complemento H; Semelhante ao homólogo delta 1 (Drosophila); Domínio de quatro núcleos de dissulfeto de WAP 1; Semelhante à proteína de ligação de fator de crescimento de insulina, subunidade lábil em ácido; Câncer de mama 2, princípio precoce; Linfócito de gene pré-B 1; Hormônio de liberação de corticotrpina; Proteína hipotética DKFZp434B044; Proteína induzida por prolactina; Proteína de liberação de guanila de Ras 4; Progastricsina (pepsinógeno C); Domínio de Sema, domínio de imunoglobulina (Ig), domínio básico curto, segregado, (semaforina) 3F; Sobre-regulado em gene de câncer colorretal 1; Proteoglicano 4; Receptor colinérgico, nicotínico, polipeptídeo delta; Proteína de matriz oligomérica de cartilagem; Grupo sanguíneo ABO (transferase A, alfa 1-3-N-acetilgalactosaminiltransferase; transferase B, alfa 1-3-galactosiltransferase); Interleucina 12A (fator estimulador de célula assassina natural 1, fator de maturação de linfócito citotóxico 1, p35); Fator de crescimento de fibroblasto 7 (fator de crescimento de ceratinócito); semelhante à família de IRRE 3 (Drosophila); Receptor colinérgico, nicotínico, alfa polipeptídeo 2 (neuronal); Carcinoma associado ao palato, pulmão e epitélio nasal; Colágeno, Tipo XV, alfa 1; Pleiotrofina (fator de crescimento de ligação de heparina 8, fator de promoção de crescimento de neurite 1); Semelhante à angiopoietina 2; Doença de Norrie (pseudoglioma); Ligando de quimiocina (motivo C-C)

3; Semelhante à quitinase 3 1 (cartilagem glicoproteína-39); inibidor inter-alfa (globulina) H3; Amelogenina (amelogênese imperfeita 1, Ligado a X); Fator de crescimento epidérmico (beta-urogastrona); Fator de crescimento de fibroblasto 13; Família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 7B; Receptor colinérgico, nicotínico, polipeptídeo gama; Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 6; Metaloproteinase de matriz 14 (inserida na membrana); Ligando de quimiocina (motivo C-C) 26; Interferona, alfa 6; Taquicinina, precursor 1 (substância K, substância P, neuroquinina 1, neuroquinina 2, neuro-medina L, neuroquinina alfa, neuropeptídeo K, neuropeptídeo gama); Proteína relacionada frizada segregada 5; Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 4; Componente de complemento 4B; Metaloproteinase de matriz 16 (inserida na membrana); Fator de crescimento de fibroblasto 7 (fator de crescimento de ceratinócito); Apolipoproteína C-II; Canal de cloreto, ativado com cálcio, membro da família 3; Tetra-nectina (proteína de ligação de plasminogênio); Colágeno, tipo III, alfa 1 (síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV, auto-sômico dominante); Proteína de KIAA0556; Ligando de quimiocina (motivo C-C) 4; Hemopexina; inibidor inter-alfa (globulina) H1; Relaxina 1; Proteína de Gla de matriz; Semelhante à Desintegrina A e metaloprotease (tipo de reprotina) com motivo do tipo de trombospondina 1, 2; receptor de interferona (alfa, beta e omega) 2; Fosfatase ácida, próstata; Proteína de ligação de nucleotídeo de guanina (G proteína), gama 8; Metaloproteinase de matriz 23B; Meprina A, alfa (Hidrolase de peptídeo de PABA); Hialuronoglucosaminidase 1; Angiotensinogeno (inibidor de serina (ou cisteína) proteinase, clade A (antiproteinase alfa-1, antitripsina), membro 8); proteína de camada intermediária de cartilagem, pirofosfoidrolase de nucleotídeo; Receptor purinérgico P2X, canal de íon com porta de ligando, 7; Glipicano 3; Tectorina beta; Interferona, alfa 5; Lipocalina 7; variante 4 de fator de plaqueta 1; Nucleobindina 1; Colágeno, tipo XI,

alfa 1; Polipeptídeo inibidor gástrico; Contendo repetição de trombopondina 1; membro da família D de receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 3; Colágeno, tipo XXV, alfa 1; Diferenciação de fator de crescimento 9; Proteína hipotética DKFZp434B044; Endotelina 3; Ligando de quimiocina (motivo C) 2; Prokineticina 2; Superfamília de receptor de fator de necrose tumoral, membro 11b (osteoprotegerina); Inibidor de tecido de metaloproteinase 2; Distonina; Cromogranina B (secretogranina 1); Proteína de ligação de hialuronano e proteoglicano 2; Repetição neuronal rica em leucina 3; Lumicano; Matrilina 1, proteína de matriz de cartilagem; Fosfolipase A2, grupo IIA (plaquetas, fluido sinovial); Carboxilesterase 1 (esterase serina de monócito/macrófago 1); Esparco/osteonectina, proteoglicano de domínios semelhantes a cwcv e kazal (testican); Homólogo de dickkopf 2 (*Xenopus laevis*); Receptor de ácido gama-aminobutírico (GABA) A, alfa 3; Beta-1-glicoproteína específica de gravidez 11; Semelhante à proteína de ligação de fator de crescimento de insulina 1; Defensina, beta 106; Interleucina 17F; Subunidade de canal de íon com porta de ligando; receptor de fosfolipase A2 1, 180 kDa; fator I (complemento); Distonina; homólogo de garantia de longevidade de LAG1 1 (*S. cerevisiae*); Prolactina; sequência expressa dos testículos 264; domínio de Sema, imunoglobulina de domínio (Ig), domínio básico curto, segregado, (semaforina) 3D; proteína relacionada frisada segregada 2; proteína relacionada frisada segregada 4).

[00092] Há grupos de genes presentes apenas em UCEC. Estes genes são relacionados com os seguintes: Homeóstase (Albumina; Receptor de sensibilização de cálcio; Aquaporina 9; Lactotransferrina. Morfogenia: Homeo box HB9; Antígeno semelhante a V epitelial 1). Desenvolvimento Embrionário (Relaxina 2; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8; Indoleamina-pirrol 2,3 dioxigenase; receptor de EPH A3; Fator embrionário tirotrófico; beta-1-

glicoproteína específica para gravidez 1; Laminina, alfa 3), o Espaço Extracelular (Tensoativo, proteína pulmonar-associada A1; beta-1-glicoproteína específica para gravidez 1; Lactotransferrina; TGF-alfa; Albumina; FGF-23; proteína de ligação de cálcio de S100 A9 (calgranulina B)), a Matriz Extracelular (Laminina, beta 4; Laminina, alfa 3; glicoproteína de zona pelúcida 4. Atividade de molécula estrutural: estrutura de leitura aberta do cromossomo 21 29; Laminina, alfa 3; Proteína 2 associada ao microtúbulo; Laminina, beta 4; Queratina 6B; Ladinina 1; Queratina 6A; Occludina; Loricrina; Banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 (eliptocitose 1, Ligado a RH); Cristalina, A2 beta; proteína estrutural da lente do olho; semelhante à proteína associada à contactina 4; Claudina 19; Proteína hipotética LOC144501; Queratina 6E; Queratina 6L; proteína intrínseca da membrana da lente 2, 19 kDa), o Citoesqueleto (Proteína associada ao microtúbulo 2; semelhante à banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 5; Homo sapiens tricoialina (THH); Queratina 6B; Queratina 6A; Semelhante ao antígeno epitelial V 1; Homólogo de Hook 1 (Drosophila); Loricrina; Banda de proteína de membrana de eritrócito 4.1 (eliptocitose 1, Ligado a RH); Tropomodulina 1; MAP/cinase de regulação de afinidade de microtúbulo 1; Queratina 6E; família de proteína de LIM de ligação de actina, membro 2), Moléculas de Adesão de Célula (Caderina 19, tipo 2; leucemia mielóide/linfóide ou de linhagem misturada; estrutura de leitura aberta de cromossomo 21 29; semelhante à família de IRRE 2; Laminina, alfa 3; Sialoadesina; Antígeno de CD84 (antígeno de leucócito); Lectina, de ligação de galactosídeo, solúvel, 2 (galectina 2); Antígeno semelhante epitelial V 1; Antígeno de CD96; Antígeno de nefrite tubulointerstitial; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8; IL-18; Superfamília de imunoglobulina, membro 1; Integrina, beta 8; Ornitina carbamoiltransferase; Integrina, beta 6; semelhante à proteína associada à contactina 4; Colágeno, tipo XVII,

alfa 1; semelhante à caderina 26; semelhante à mucina e caderina),
 proteínas de diferenciação de célula (proteína tirosina fosfatase, tipo
 receptor, Z polipeptídeo 1; Laminina, alfa 3; Antígeno de CD84 (anti-
 geno de leucócito); EDRF2; fator relacionado à diferenciação de eri-
 tróide de Homo sapiens 2; semelhante à proteína de tumor p73; prote-
 ína relacionada à Apoptose de NB4/diferenciação de NB4; PNAS-133
 de Homo Sapiens; Similar a sete no absentismo 2; Interleucina 24;
 Queratina 6B; Queratina 6A; membro de desidrogenase/reductase
 (família de SDR) 9; Proteína de junção de Gab, beta 5 (conexina 31.1);
 proteína de homeobox de iroquois 4; Homeobox anterior ventral 2; Li-
 gando de quimiocina (motivo C-X-C) 10; Superfamília de receptor de
 fator de necrose tumoral, membro 17; Canal de cálcio, dependente de
 voltagem, subunidade beta 2; Doença de Parkinson (auto-sômica re-
 cessiva, juvenil) 2, parquina; Calicreína 7 (quimiotríptico, estrato cór-
 neo); homólogo perdido de células gliais 2; AP-2 alfa; Proteína tirosina
 fosfatase, tipo receptor, Z polipeptídeo 1; Troponina T1; Escielina; Glu-
 cosaminila (N-acetil) transferase 2, enzima de ramificação I; Colágeno,
 tipo XVII, alfa 1; Supressor de sinalização de citocina 2; Homeo box
 menos distal 1; captura de zigoto 1; Interleucina 20; Diferenciação de
 fator de crescimento 3; FGF-23; família de sítio de integração MMTV
 do tipo sem asas, membro 8A. Extracelular: Estrutura de leitura aberta
 do cromossomo 21 29; Laminina, alfa 3; Laminina, beta 4; Interleucina
 24; beta-1-glicoproteína 1 específica para gravidez; Ligando de quimi-
 ocina (motivo C-X-C) 11; Tensoativo, proteína pulmonar-associada A1;
 Prepronociceptina; Receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 3B;
 Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário
 8; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 10; IL-18 (fator indutor de in-
 terferona gama); Lactotransferrina; Albumina; Ligando de Fas (super-
 família de TNF, membro 6); Receptor colinérgico, polipeptídeo nicotíni-
 co 4, beta; Peptídeo antimicrobiano de catelicidina; protease seme-

lhante à tripsina das vias aéreas; proteína de ligação de cálcio S100 A9 (calgranulina B); TGF-alfa; Calicreína 10; Inibidor de protease de serina, tipo Kunitz 1; proteína da via de sinalização induzível por WNT1 3; Relaxina 2; Interferona, capa; Defensina, beta 103A; IL-20; Glicoproteína de Zona Pelúcida 4; Diferenciação de fator de crescimento 3; FGF-23; Família de sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 8A; Fator de complemento H-relacionado 5), Proteínas desenvolvintes (receptor de EPH A3; cinase 2 relacionada a NIMA (nunca em gene de mitose a); proteína de dedo de zinco 282; Cinase 1 de ligação de TANK; homólogo A de recombinação meiótica de MRE11 11; Fator de transcrição de E2F 2; Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, Z polipeptídeo 1; mRNA expresso de mama de clone de Homo Sapiens 161455 do cromossomo X; Laminina, alfa 3; semelhante ao homólogo de oncogene viral de mieloblastose de v-myb (aviário) 1; Regulador de proteína de sinalização G 11; Proteína 2 associada ao microtúbulo; Proteína de transmembrana 16A; Polipose de adenomatose coli 2; Homeo box HB9; Proteína de centrômero F, 350/400ka (mitosina); Antígeno de CD84 (antígeno de leucócito); EDRF2; fator relacionado à diferenciação de eritróide 2; semelhante à proteína p73 tumoral; proteína relacionada à apoptose/diferenciação de NB4; PNAS-133 de Homo Sapiens; Caixa Forkhead P2; proteína diferencialmente expressa associada gástrica de Homo Sapiens YA61P (YA61); Tenascina N; estrutura de leitura aberta de Cromossomo 6 49; proteína de dedo de zinco 462; proteína de dedo de zinco 71 (Cos26); caixa de SRY 7 (região de determinação do sexo Y); Semelhante ao receptor desencadeador expresso em células mielóides 4; Interleucina 24; beta-1-glicoproteína 1 específica por gravidez; Proteoglicano de sulfato de condroitina 5 (neuroglicano C); Queratina 6B; Queratina 6A; membro de desidrogenase/reductase (família de SDR) 9; Antígeno semelhante a V epitelial 1; Proteína de junção de Gap, beta 5 (conexinz 31.1); re-

ceptor acoplado à proteína G 51; fator regulador de interferona 6; Neurotrofina 5 (neurotrofina 4/5); Antígeno de CD96; Proteína de homeobox de Iroquois 4; Semelhante ao receptor de interleucina 1 1; expresso de fase G-2 e S 1; Subfamília de receptor nuclear 2, grupo E, membro 3; Homeobox 2 anterior ventral; Proteína de dedo de zinco 215; Segmento de DNA no cromossomo 4 (único) sequência expressa 234; Molécula de adesão celular relacionada ao antígeno carcinoembrionário 8; Ligando de quimiocina (motivo C-X-C) 10; IL-18; Indoleamina-pirrol 2,3 desoxigenase; Albumina; Receptor de sensibilização de cálcio (hipercalcemia hipocalciúrica 1, hiperparatireoidismo neonatal severo); Ligando de Fas (superfamília de TNF, membro 6); Superfamília de TNFR, membro 17; Canal de cálcio, dependente da voltagem, subunidade beta 2; Doença de Parkinson (auto-sômica recessiva, juvenil) 2, parquina; calicreína 7 (quimiotróptica, estrato córneo); Homólogo perdido de células gliais 2; TGF-alfa; Fator embrionário tirotrófico; Alfa AP-2 (proteína de ligação intensificadora de ativação 2 alfa); calicreína 10; Regulador de sinalização de proteína G 7; Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, Z polipeptídeo 1; Inibidor de serina protease, Kunitz tipo 1; proteína da via de sinalização induzível por WNT1 3; membro da família de Zic 3 heterotaxia 1 (homólogo de par ímpar, Drosophila); TTK proteína cinase; Troponina T1, de esqueleto, lento; Escielina; Semelhante ao fator induzido por TGFB 2, Ligado a X; calicreína 8 (neuropsina/ovasina); Glucosaminil (N-acetil) transferase 2, enzima de ramificação I; domínio de repetição de anquirina 30A; Relaxina 2; Colágeno, tipo XVII, alfa 1; Gene diferencialmente expresso em próstata; Regulador de fosfatase e actina 3; Supressor de sinalização de citocina 2; Subfamília de receptor nuclear 4, grupo A, membro 3; enzima de conversão de angiotensina I (peptidil-dipeptidase A) 1; Proteína hipotética MGC17986; Homeo box menos distal 1; homólogo de garantia de longevidade de LAG1 3 (*S. cerevisiae*); captura de Zigoto 1; Interfero-

na, capa; IL-20; inibidor de caspase-1 de ICEBERG; Fator de diferenciação de crescimento 3; FGF-23; sequência expressa dos testículos 15; Família do sítio de integração de MMTV do tipo sem asas, membro 8A; caixa de SRY (região de determinação do sexo Y) 7; associado à deficiência de carnitina, expressou no ventrículo 1; Prokineticina 1; semelhante à proteína de ligação de elemento responsivo a CAMP 3 3; uma família de domínio de recrutamento de Caspase, membro 15; proteína FLJ23311).

EXEMPLO 6: DIFERENCIAÇÃO DIRETA DAS CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS DO CORDÃO UMBILICAL (UCEC) EM CERATINÓCITOS EPIDÉRMICOS DA PELE

[00093] Para diferenciação em ceratinócitos epidérmicos da pele, células-tronco epiteliais do cordão umbilical, células de UCEC, foram cultivadas de acordo com um protocolo padrão para o cultivo de ceratinócitos. Técnicas de isolamento de célula foram como descritas acima. UCEC é depois cultivado em meios de crescimento de ceratinócitos livre de soro, KGM, KGM-2 (Cambrex), EpiLife (Cascade Biologics) ou em meio Green na presença de camada alimentadora embrionária de camundongo 3T3 irradiada ou tratada com Mitomicina-C a 37°C, 5% de CO₂). Morfologia das células UCEC desse modo diferenciou os ceratinócitos epidérmicos humanos semelhantes. Células epiteliais têm morfologia similar sob microscópio de luz e podem ser facilmente transformadas em fibroblastos usando meios convencionais e comercialmente disponíveis (cf., Figura 2).

[00094] Análise imunofluorescente mostra que a UCEC cultivada também expressa marcadores moleculares de ceratinócito epidérmico como queratinas, desmosoma, hemidesmosoma e componentes de membrana basal (ver também figura 10 que aquele mostra que as UCEC são qualificadas para ser células epiteliais em geral expressando marcadores de célula epiteliais para uma variedade destes). Con-

seqüentemente, estes resultados mostram que as células progenitoras/tronco epiteliais do cordão umbilical da presente invenção podem ser diferenciadas em células de pele como ceratinócitos epidérmicos que podem ser usadas para cura de ferida e têm grande potencial para o desenvolvimento de equivalentes de pele cultivados.

EXEMPLO 7: EXPANSÃO DAS CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS OU MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL USANDO EXPLANTES DE TECIDO REPETITIVOS DOS TECIDOS DE MEMBRANA DE REVESTIMENTO DO CORDÃO UMBILICAL

[00095] Células-tronco epiteliais e mesenquimais do cordão umbilical da invenção se expandiram usando explantes repetitivos do tecido de membrana amniótica do cordão umbilical como segue. Brevemente, no dia 1 do processo, explantes de tecido foram banhados sobre discos de cultura de tecido em meios de crescimento (DMEM/10% de FCS, EpiLife, KGM, KGM-2 ou M171) a 37°C, 5% de CO₂; os meios foram alterados a cada 2 ou 3 dias. Desenvolvimentos das células iniciaram e continuaram migrando dos explantes durante 7 dias. Após isso, explantes de tecido foram transferidos para outros discos para também permitir o desenvolvimento das células. Este processo foi continuado até que os explantes tinham diminuído em tamanho, impedindo outra explantação. Nesta conexão é observado que os explantes se encolhem progressivamente em tamanho até que eles fiquem muito pequenos para também explantar do tecido uma vez que durante o processo de desenvolvimento das células e migração dos explantes de tecido, as células produzem proteases para digerir e fragmentar o tecido. figura 16 esquematicamente ilustra o processo de expansão rápido e robusto das células-tronco epiteliais ou mesenquimais do cordão umbilical usadas alcançaram usando este protocolo. Desse modo, este estudo demonstra que o rendimento alto de células de UCMC e de UMEC pode ser obtido desta fonte, refletindo também na viabilidade

alta e características da pró-crescimento destas células comparadas com outras fontes de células como células-tronco derivadas da medula óssea ou adiposas. Além disso, sendo um tecido sólido, a técnica de explante repetitiva aqui usada com sucesso demonstra que as células da invenção podem ser uniformemente extraídas do tecido inteiro em vez de apenas certas porções. Isto permite o número máximo de células que podem ser derivadas a uma baixa passagem em vez de passar as células através de muitas gerações causando deterioração das células.

EXEMPLO 8: DIFERENCIAÇÃO DIRETA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL (UCMC) EM FIBROBLASTOS DÉRMICOS DA PELE

[00096] Para diferenciação em fibroblastos dérmicos da pele, células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, células de UCMC foram cultivadas de acordo com um protocolo padrão para o cultivo de fibroblastos. Técnicas de isolamento de célula foram como descritas acima no Exemplo 6. UCMC é depois cultivada em DMEM ou meios de crescimento de fibroblasto comercialmente disponíveis (FGM). Morfologia de célula de UCMC desse modo diferenciada assemelha-se aos fibroblastos dérmicos humanos. Células mesenquimais têm morfologia similar sob microscópio de luz e podem ser facilmente transformadas em fibroblastos usando meios convencionais e comercialmente disponíveis (cf., Figura 3).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para isolar células-tronco mesenquimais/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*;

(b) cultivar o tecido de membrana amniótica obtido na etapa (a) como explante de tecido ou cultivar células da membrana amniótica separadas do tecido da membrana amniótica obtido na etapa (a) em um meio de cultura sob condições que permitem proliferação de célula sem diferenciação das células-tronco mesenquimais/progenitoras; e

(c) isolar as células-tronco mesenquimais/progenitoras, em que as células-tronco mesenquimais/progenitoras apresentam uma forma de fuso, expressam o gene POU5f1 que codifica o fator de transcrição Octâmero-4 (Oct-4) e secretam Activina A e Follistatina.

2. Método para isolar células-tronco epiteliais/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) separar a membrana amniótica dos outros componentes do cordão umbilical *in vitro*;

(b) cultivar o tecido da membrana amniótica obtido na etapa (a) como explante de tecido ou cultivar células da membrana amniótica separadas do tecido da membrana amniótica obtido na etapa (a) sob condições que permitem a proliferação celular de células-tronco epiteliais/progenitoras sem diferenciação das células-tronco epiteliais/progenitoras, em que as referidas condições para a cultura de células da membrana amniótica separadas do tecido da membrana amniótica compreendem o fator de crescimento semelhante à insulina-1, o fator de crescimento derivado de plaquetas-BB, o fator de crescimento transformador- β 1 e insulina; e

(c) isolar as células-tronco epiteliais/progenitoras, em que as células-tronco epiteliais/progenitoras apresentam uma forma poliédrica, expressam o gene POU5f1 que codifica o fator de transcrição Octamer-4 (Oct-4) e secretam Activina A e Follistatina.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

(a") separar as células-tronco epiteliais ou mesenquimais do tecido de membrana amniótica antes do cultivo através de separação enzimática.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

cultivar as células-tronco epiteliais/progenitoras em um meio de cultura sob condições que permitem a diferenciação das referidas células em células epiteliais; e

isolar as células diferenciadas, em que as células epiteliais são células epiteliais da pele.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

cultivar as células-tronco mesenquimais/progenitoras em um meio de cultura sob condições que permitem a diferenciação das referidas células em células mesenquimais; e

isolar as células diferenciadas, em que as células mesenquimais são fibroblastos da pele.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que compreende ainda:

conservar as células-tronco/progenitoras isoladas para uso posterior.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a conservação é realizada através do uso de criopreservação.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende uma célula-tronco/progenitora isolada pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, 6 e 7 juntamente com um veículo terapeuticamente aceitável adequado, exceto água, tampões ou outros compostos destinados a nada além de diluir o composto ativo da referida composição.

9. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que é adaptada para aplicação sistêmica ou tópica.

10. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizada pelo fato de que a composição farmacêutica adaptada para aplicação tópica é selecionada dentre o grupo que consiste em um unguento, um creme e uma loção.

11. Uso de uma célula-tronco/progenitora isolada pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, 6 e 7, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para tratar um indivíduo tendo um distúrbio, em que o distúrbio é uma ferida.

12. Uso de uma célula-tronco/progenitora epitelial ou mesenquimal isolada pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, 6 e 7, caracterizado pelo fato de que é para a produção de moléculas biológicas, em que as moléculas biológicas são citocinas e fatores de crescimento produzidos naturalmente e estão presentes na forma de um sobrenadante no qual as células-tronco epiteliais ou mesenquimais/progenitoras secretam os fatores de crescimento e peptídeos.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco mesenquimal secreta Interleucina-6 (IL-6); (MCP1); fator de crescimento de hepatócitos (HGF); Interleucina-8 (IL8); sTNFR1; GRO; TIMP1; TIMP2; TRAILR3; uPAR; ICAM1;

IGFBP3 e IGFBP6.

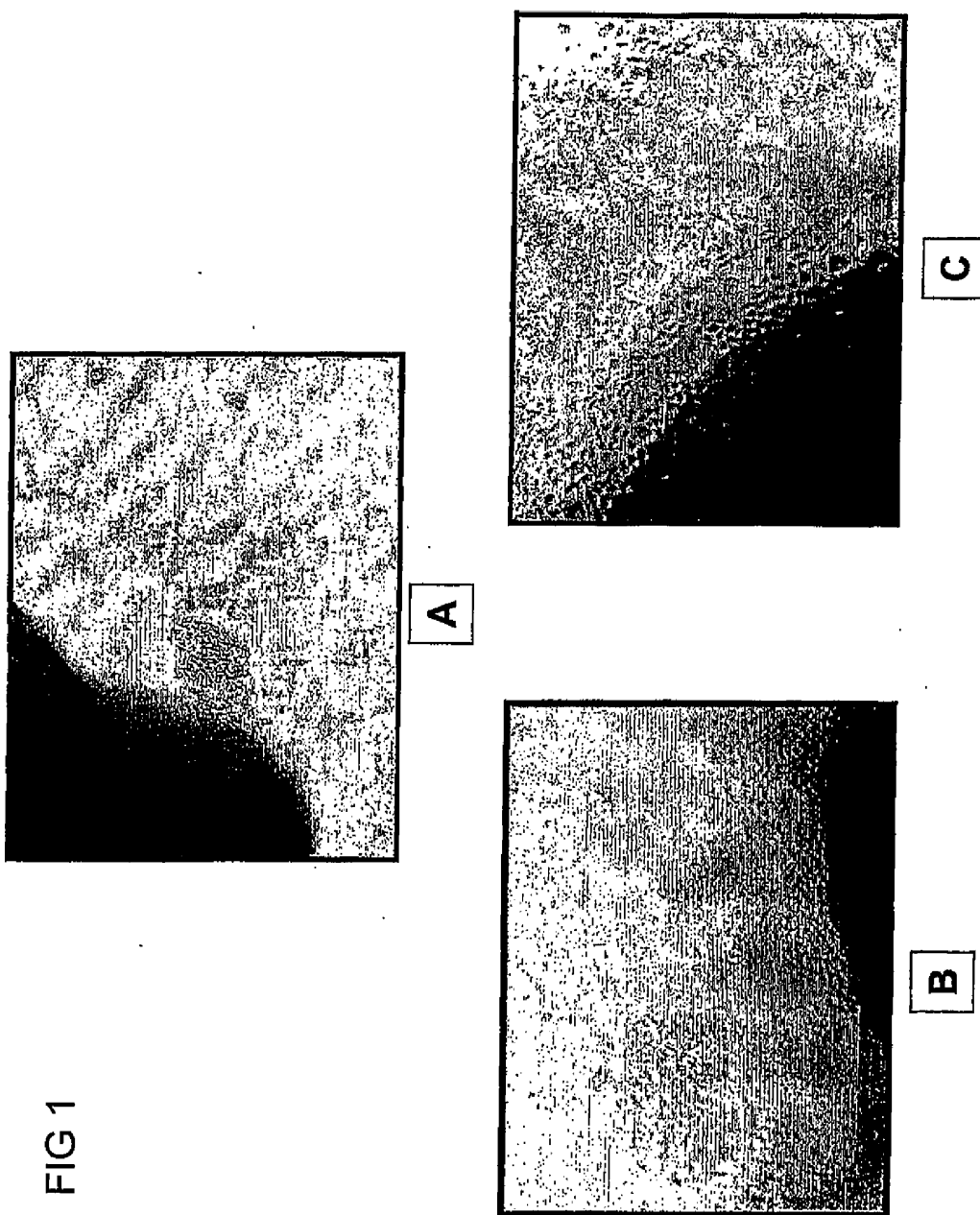
14. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a célula-tronco epitelial secreta IGFBP-4; PARC; EGF; IGFBP-2; IL-6; Angiogenina; GCP-2; IL1R α ; MCP-1; RANTES; SCF; TNF β ; HGF; IL-8; sTNFR; GRO; GRO- α ; Anfiregulina; IL-1R4/ST2; TIMP1; TIMP2; uPAR e VEGF.

15. Método *in vitro* para cultivar células-tronco mesenquimais/progenitoras da membrana amniótica do cordão umbilical, em que as células-tronco mesenquimais/progenitoras apresentam uma forma de fuso, expressam o gene POU5f1 que codifica o fator de transcrição Octâmero-4 (Oct-4) e secretam Activina A e Follistatina, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) obter um explante de tecido da membrana amniótica isolada do cordão umbilical;

(ii) cultivar o explante de tecido em meios de cultivo e condições de cultivo adequados para permitir a proliferação celular sem diferenciação das células-tronco mesenquimais/progenitoras por um período adequado de tempo.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que compreende ainda expor o explante de tecido a meios de cultivo frescos e continuar o cultivo sob condições adequadas por um período adequado de tempo.



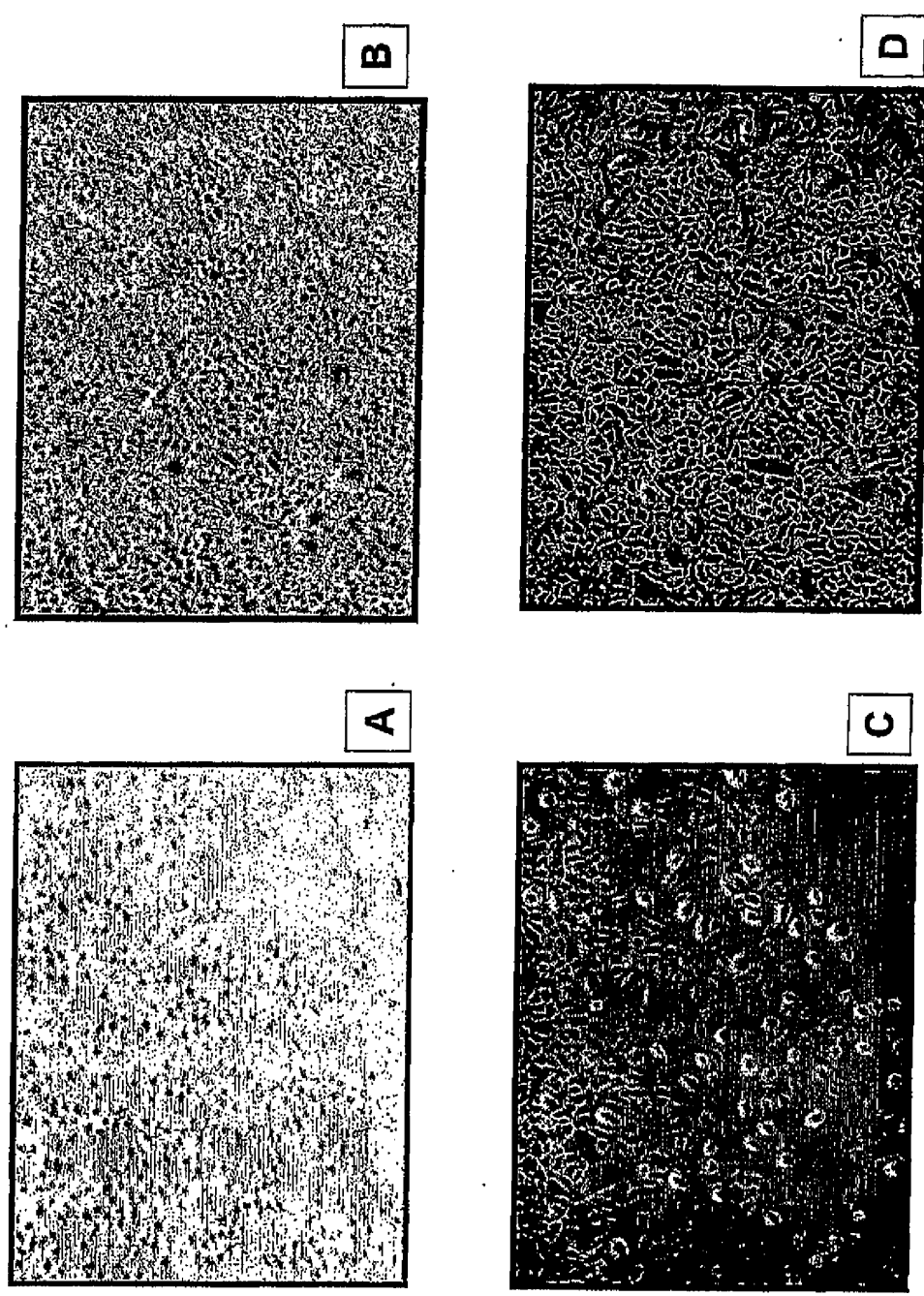


FIG 2

3/65

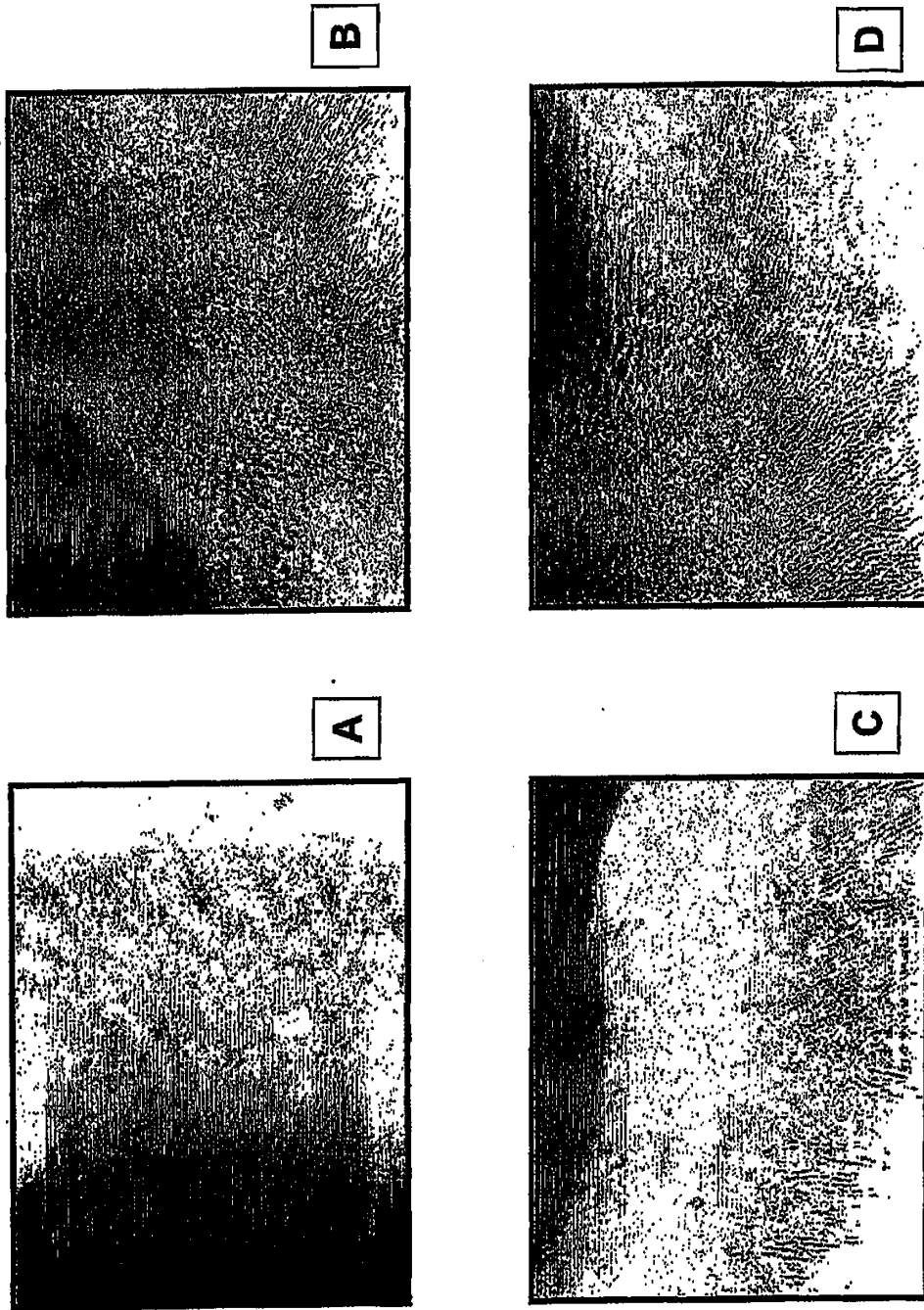


FIG 3

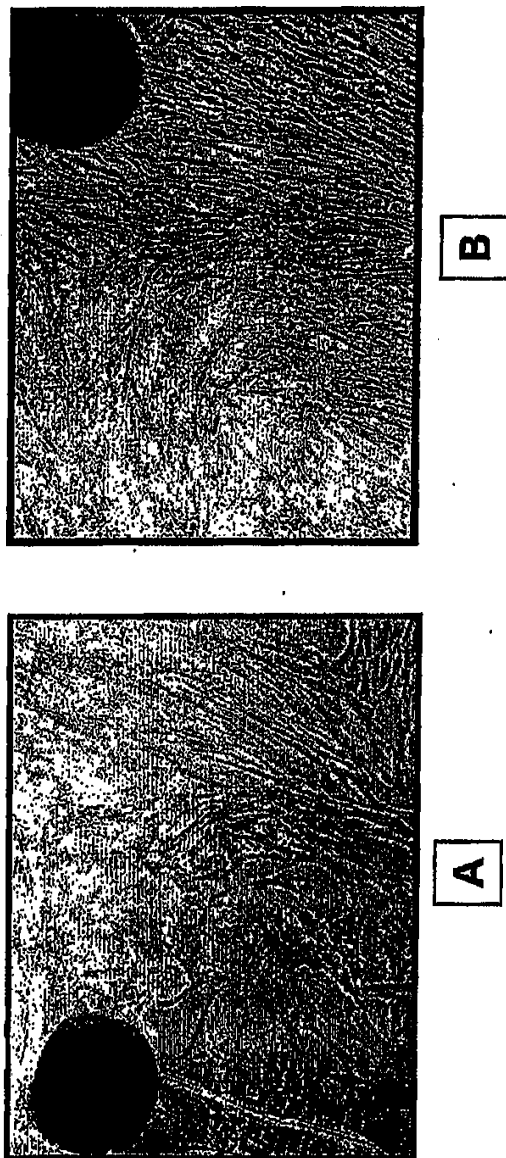


FIG 4

FIG 5: Morfologia de fibroblastos dérmicos normais (NF) e células mesenquimais derivadas adiposas (ADMC) ou células-tronco mesenquimais do cordão umbilical (UCMC) em meio livre de soro (DMEM) e de soro (DMEM/10 % FCS)

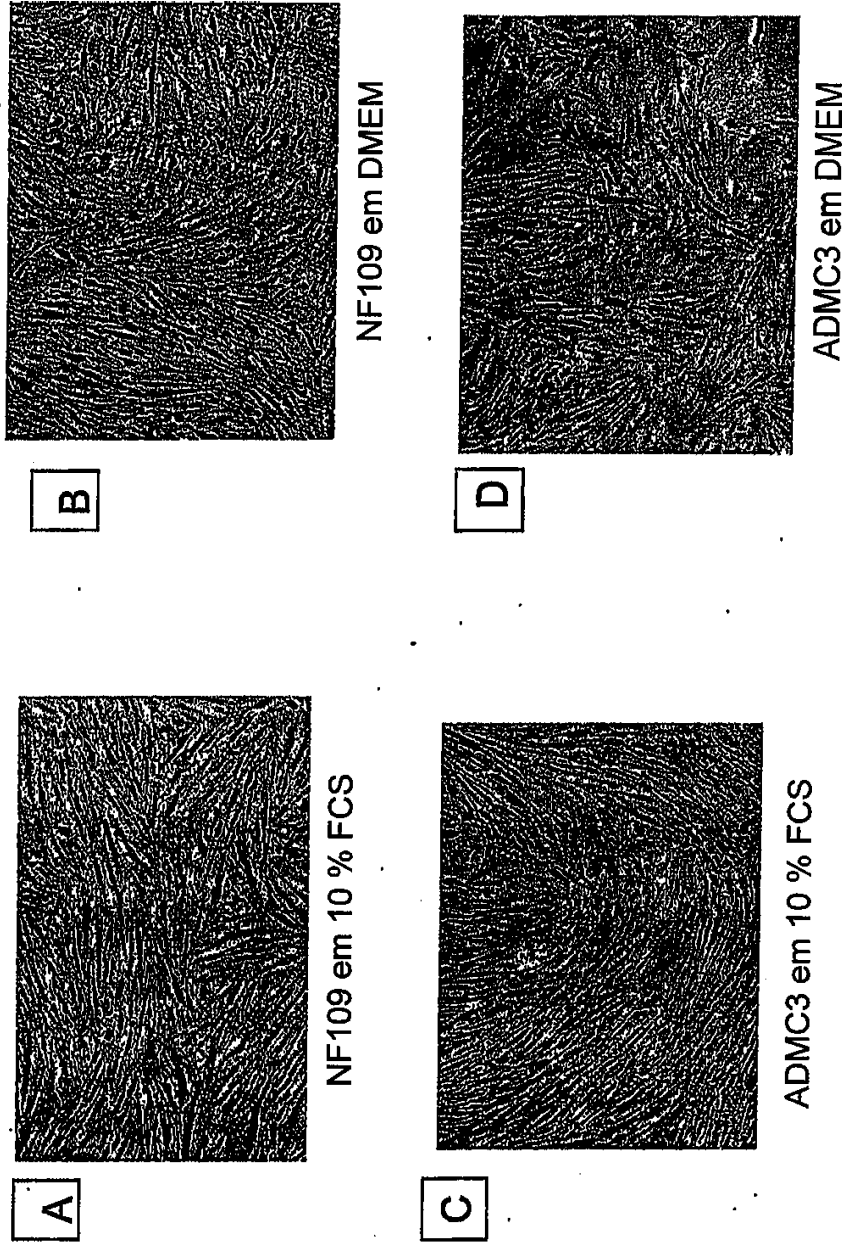


FIG 5 continuação ...

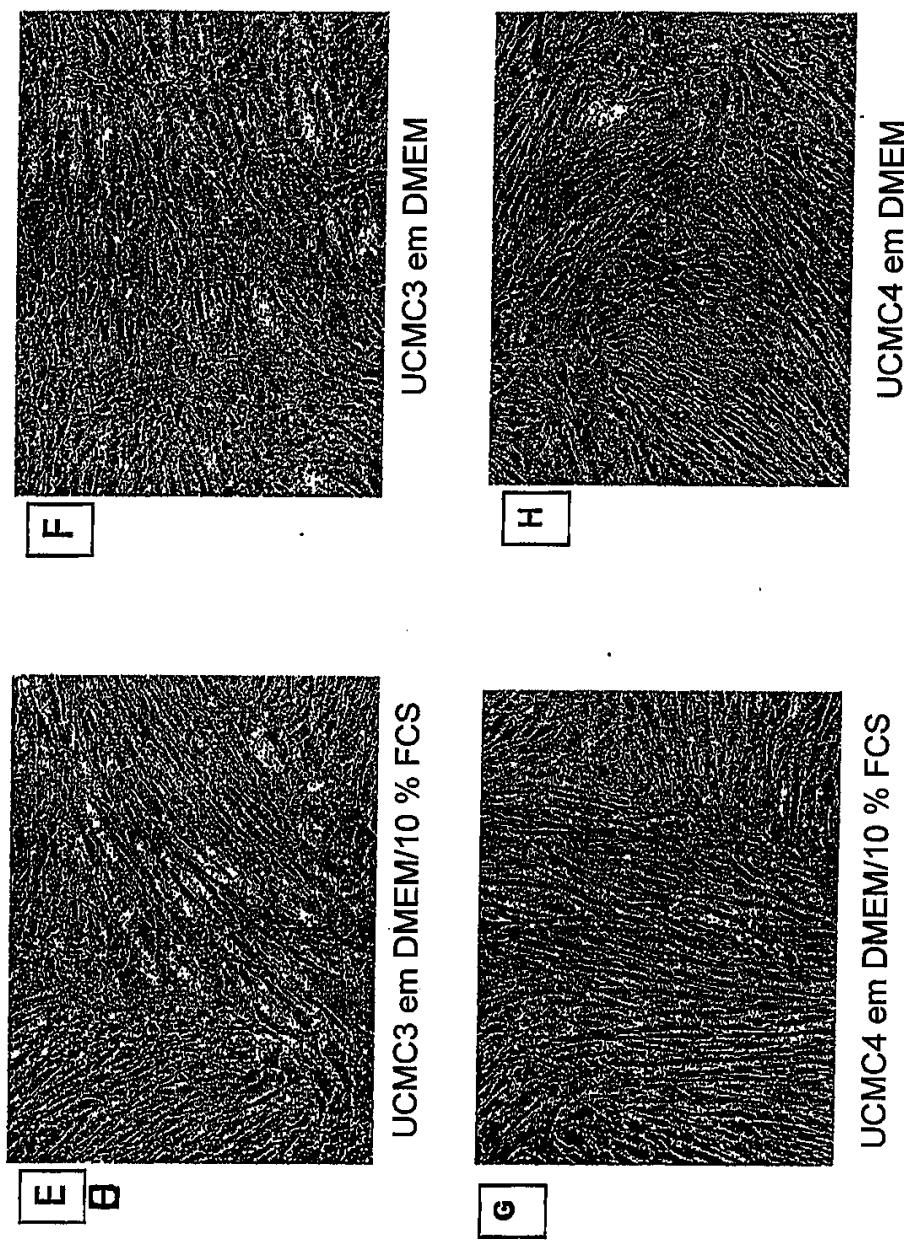
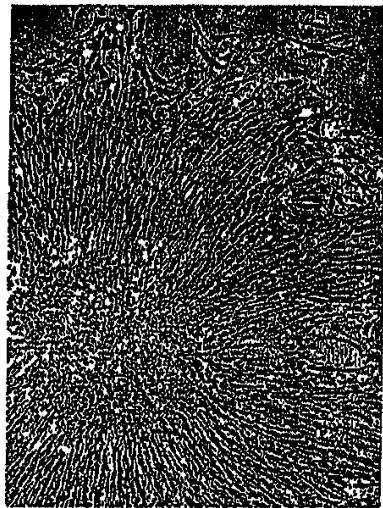
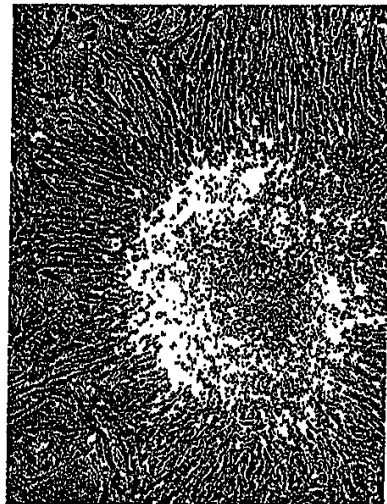


FIG 6: Formação de colônia de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical cultivadas em condição de camada não-alimentadora em DMEM/10 % FCS



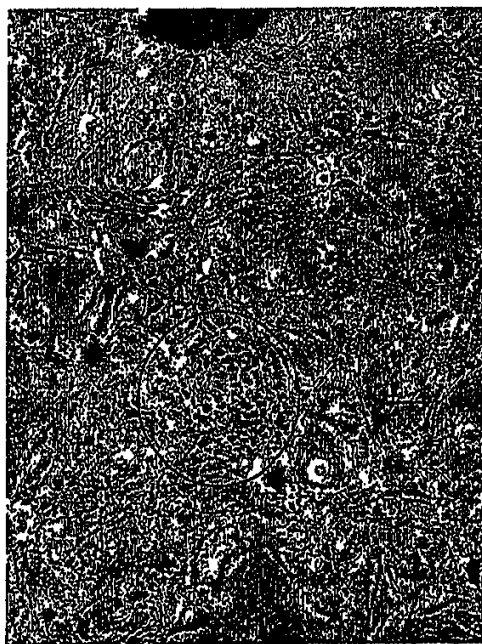
Dia 3



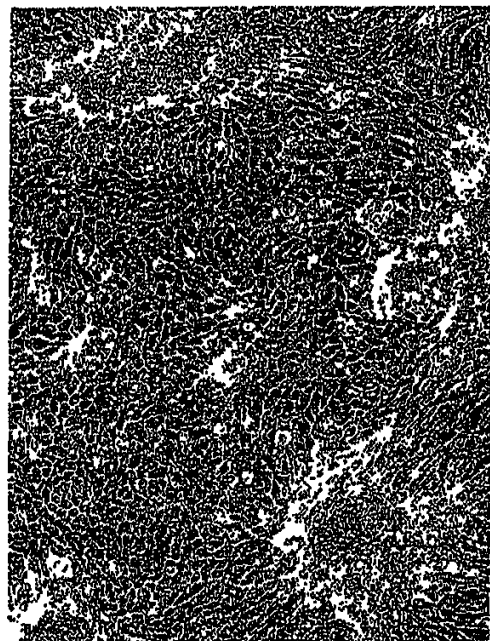
Dia 7

8/65

FIG 7: Formação de colônia de células-tronco epiteliais do cordão umbilical cultivadas em condição de camada alimentadora em meio de Green

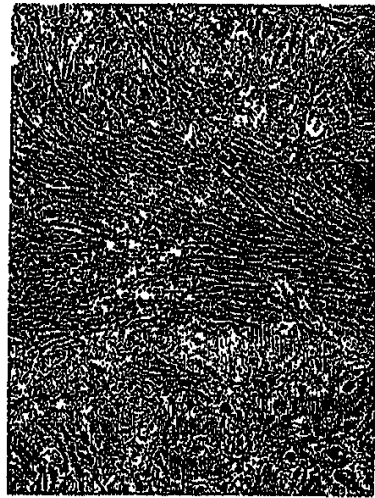


Dia 3

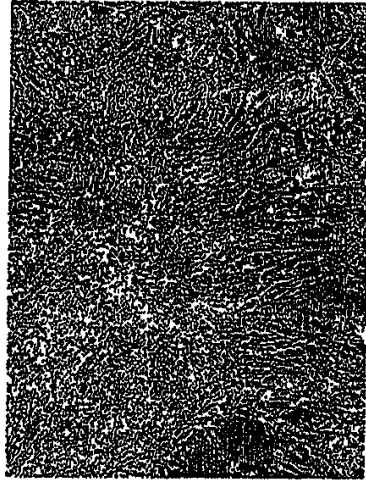


Dia 7

FIG 8: Formação de colônia de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical cultivadas em condição de camada alimentadora em meio de Green

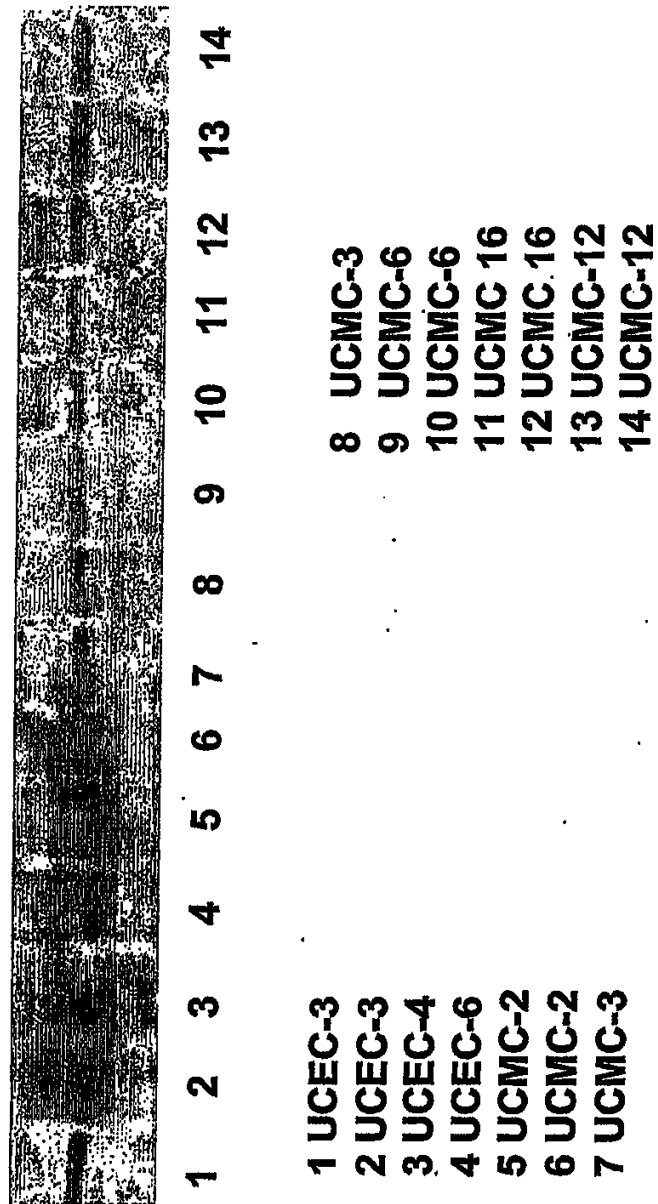


Dia 3



Dia 7

FIG 9-1: Expressão de Oct-4 em Células Epiteliais e Células Mesenquimais do Cordão Umbilical



11/65

FIG 9-2: Expressão de STAT3 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

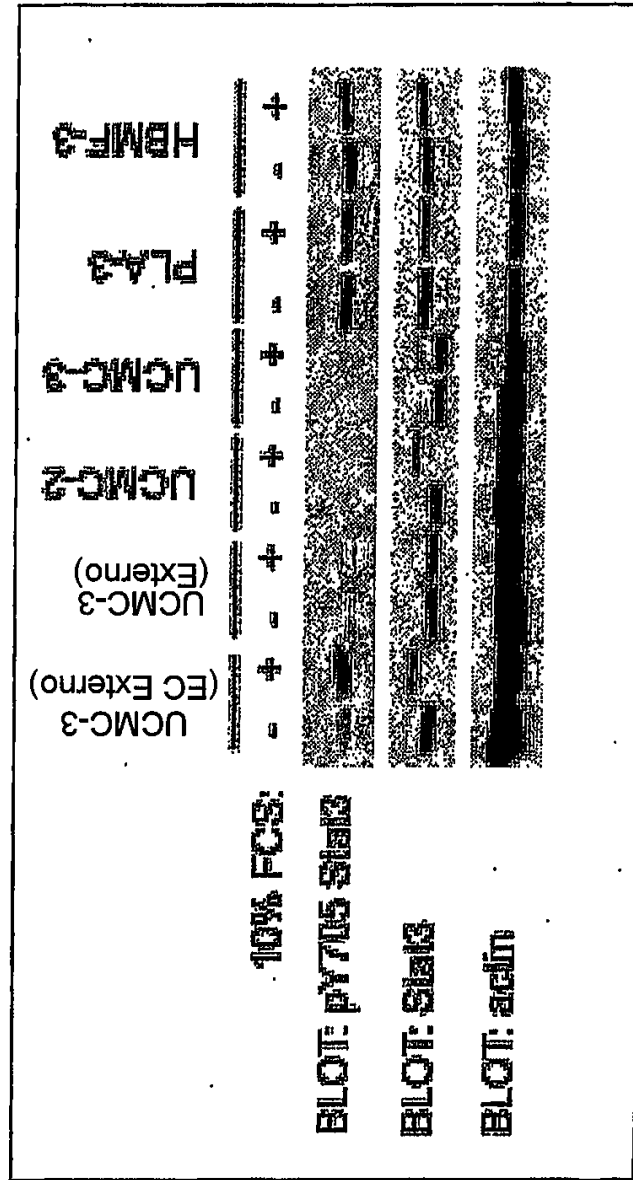


FIG 9-3: Expressão de STAT3 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

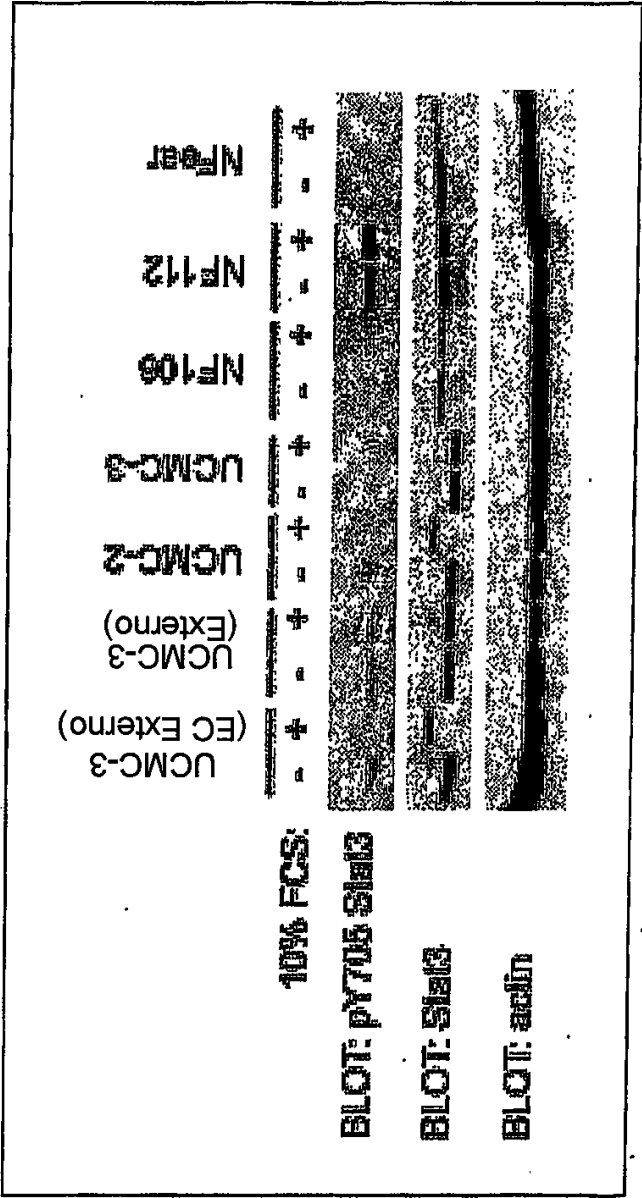


FIG 9-4: Expressão de Fator de Crescimento Placentário (PLGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

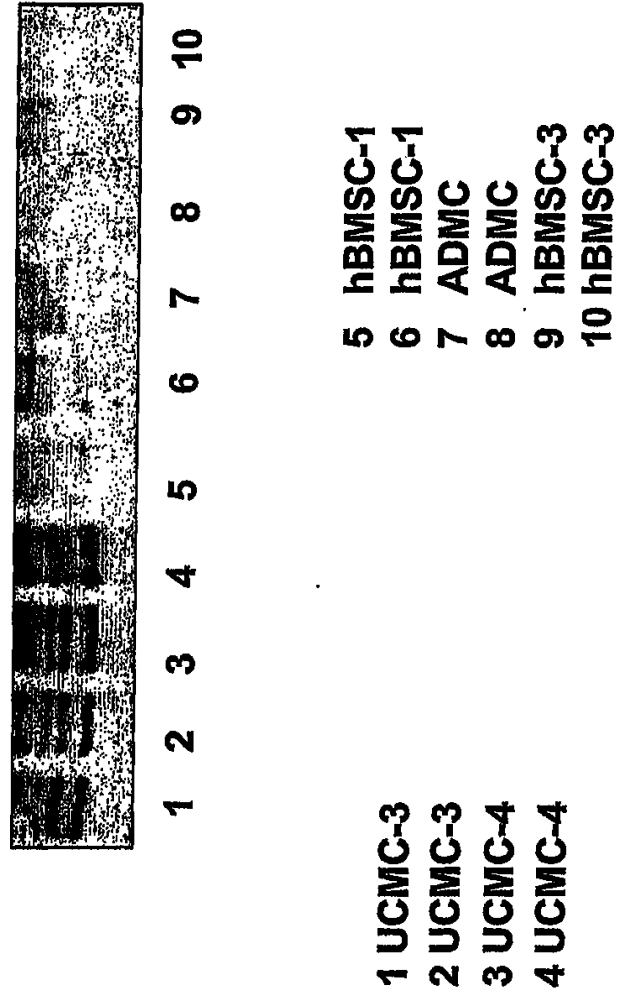


FIG 9-5: Expressão de Fator de Crescimento Placentário (PLGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 UCMC-3
2 UCMC-3
3 UCMC-2
4 UCMC-2
5 UCMC-3
6 UCMC-3

7 UCMC-4
8 UCMC-4
9 NF 111
10 NF 111
11 NF 113
12 NF 113

FIG 9-6: Expressão de Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo (CTGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1 UCMC-3
2 UCMC-3
3 UCMC-4
4 UCMC-4

5 NF 106
6 NF 106
7 NF 112
8 NF 112
9 NF 101
10 NF 101

FIG 9-7: Expressão de Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo (CTGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

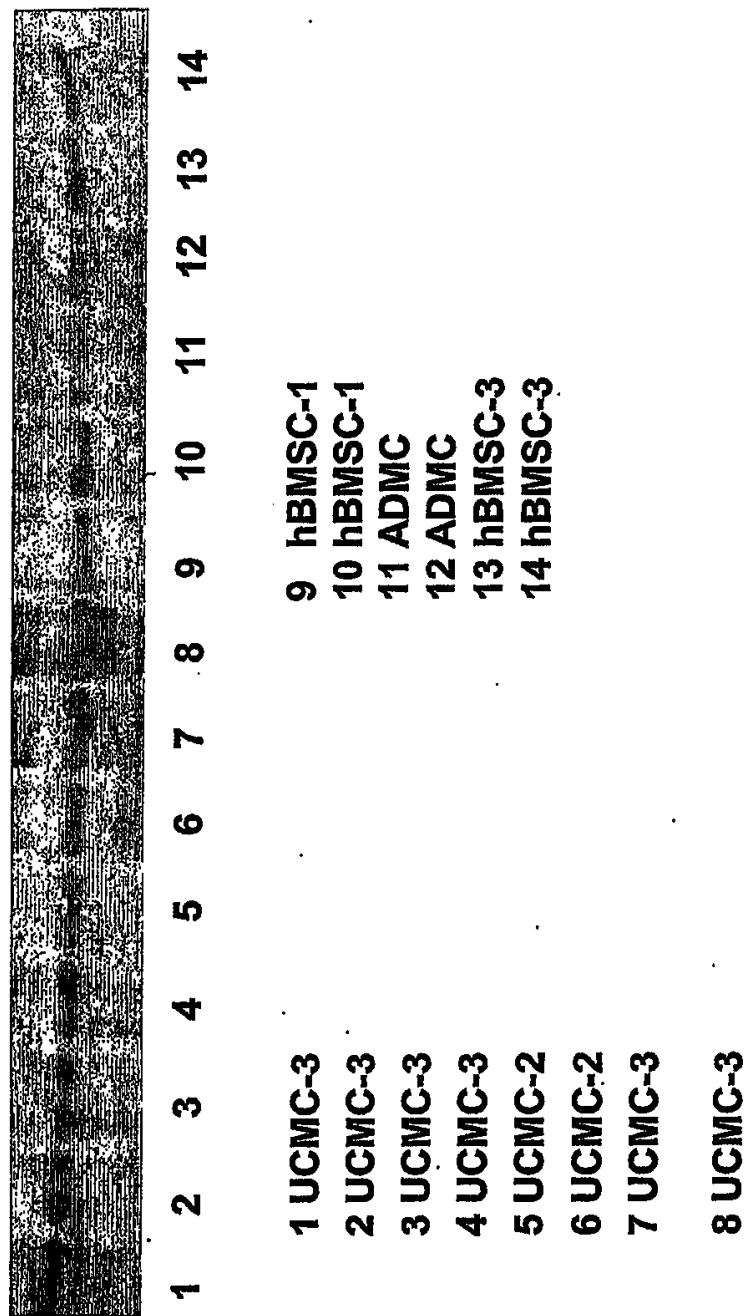


FIG 9-8: Expressão de Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

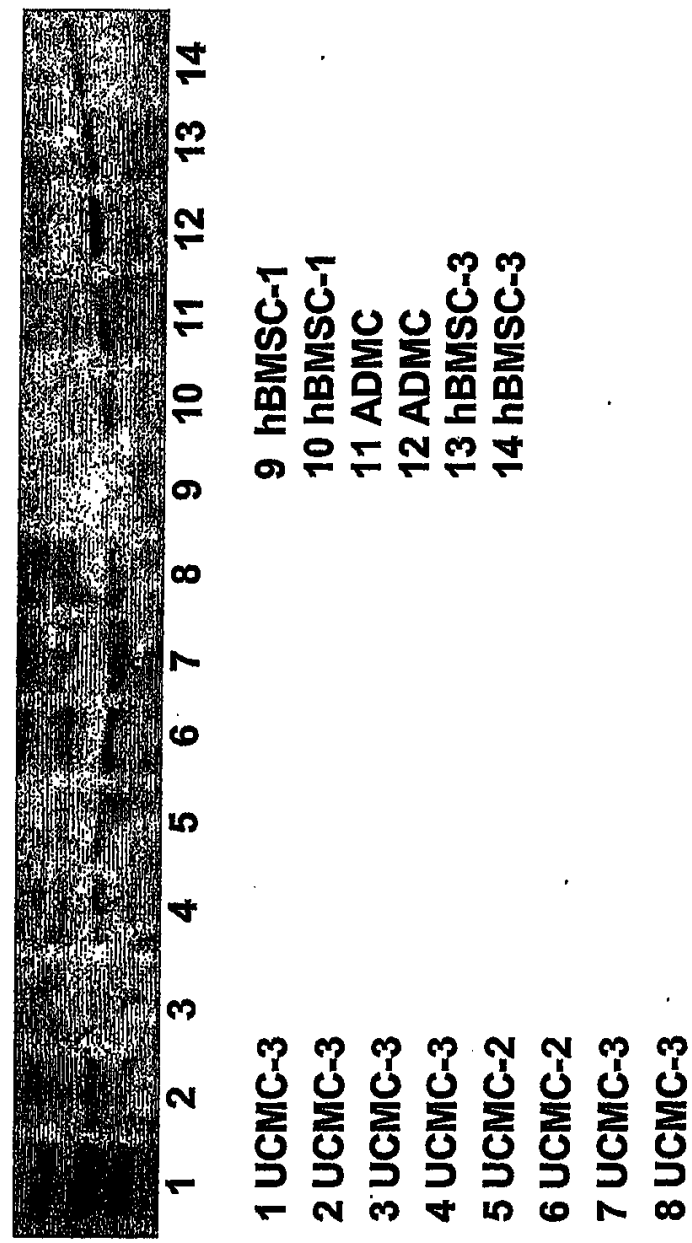
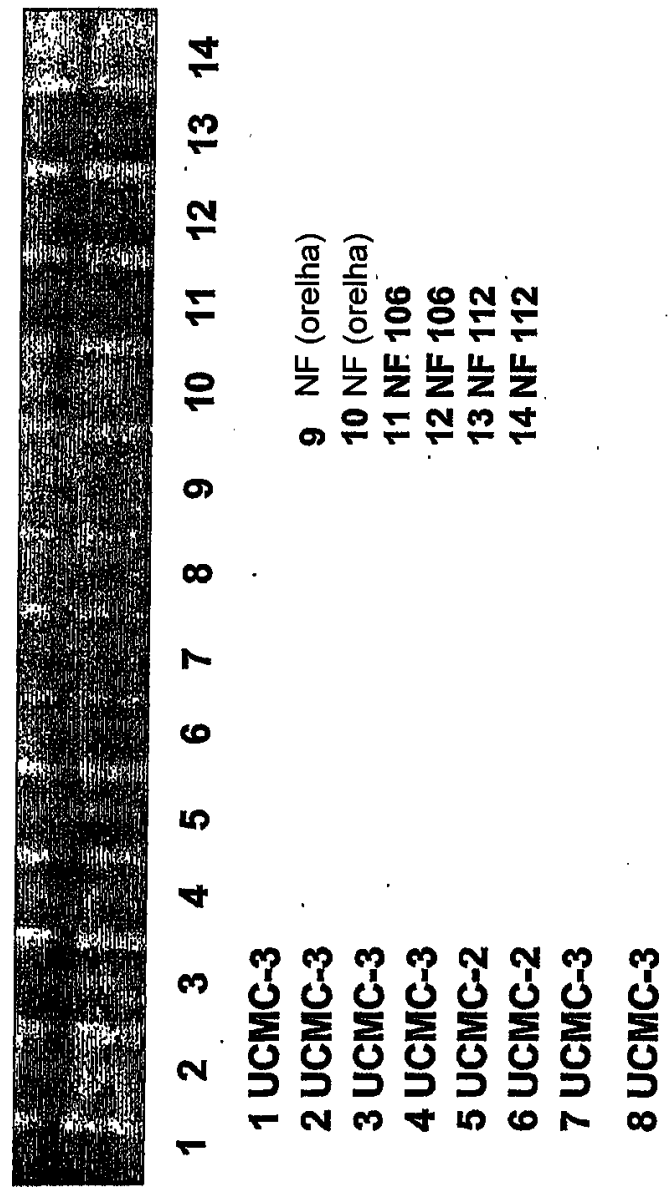


FIG 9-9: Expressão de Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta (PDGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1 UCMC-3
2 UCMC-3
3 UCMC-2
4 UCMC-2
5 UCMC-3
6 UCMC-3

7 NF (orelha)
8 NF (orelha)
9 NF **106**
10 NF **106**
11 NF **112**
12 NF **112**

FIG 9-11: Expressão de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

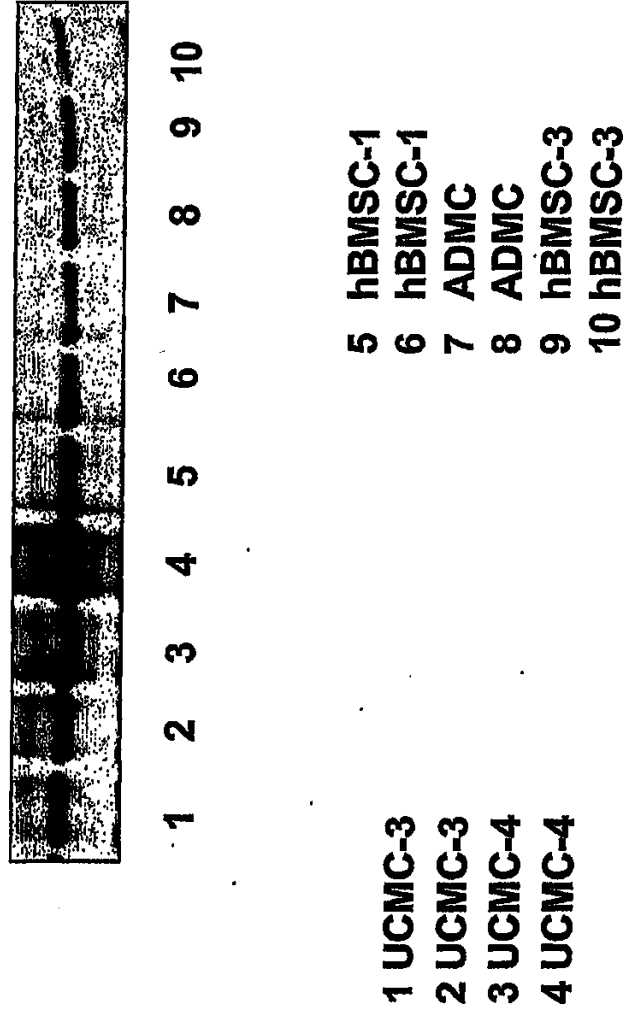


FIG 9-12: Expressão de Fator-2 de Crescimento de Fibroblasto (FGF-2) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

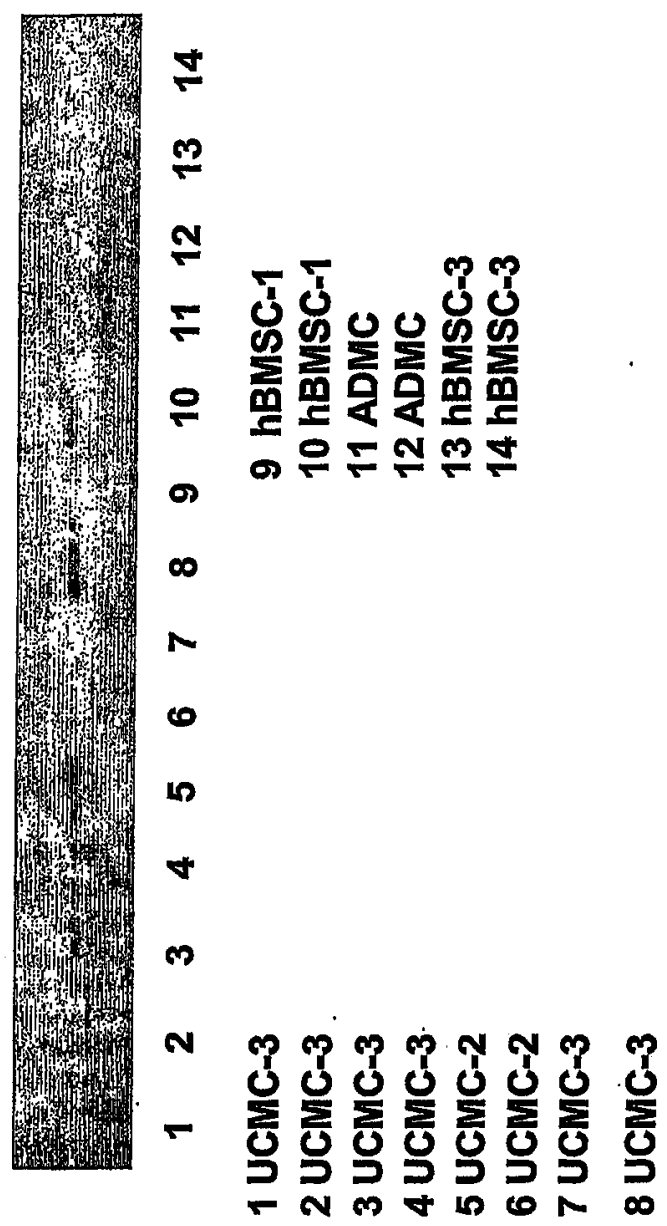


FIG 9-13: Expressão de Fator-2 de Crescimento de Fibroblasto (FGF-2) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC) - NF (orelha)

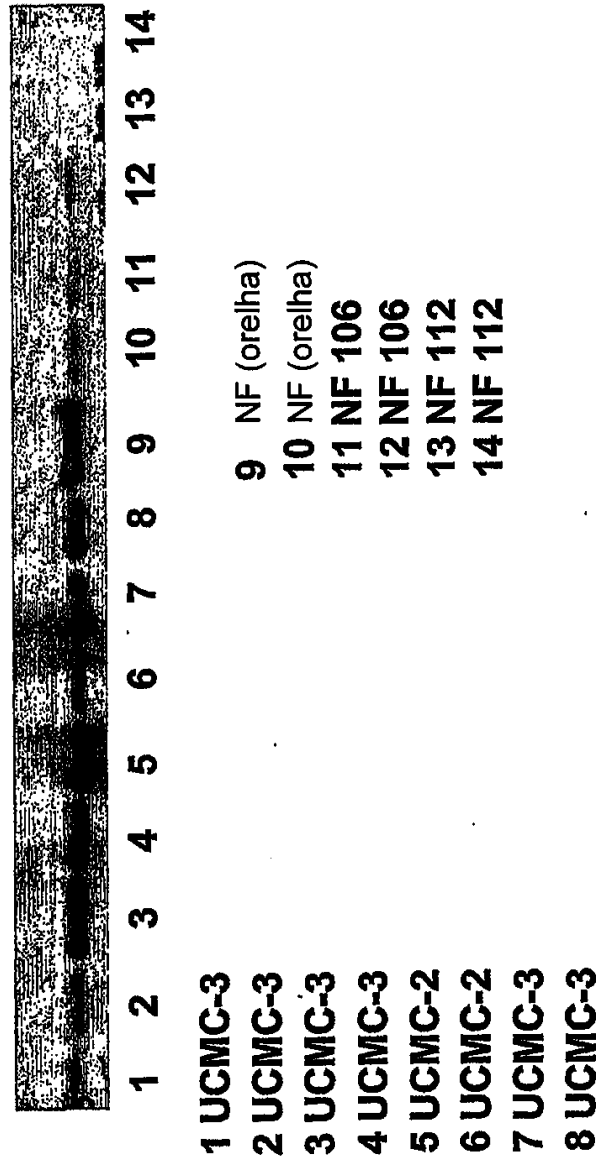
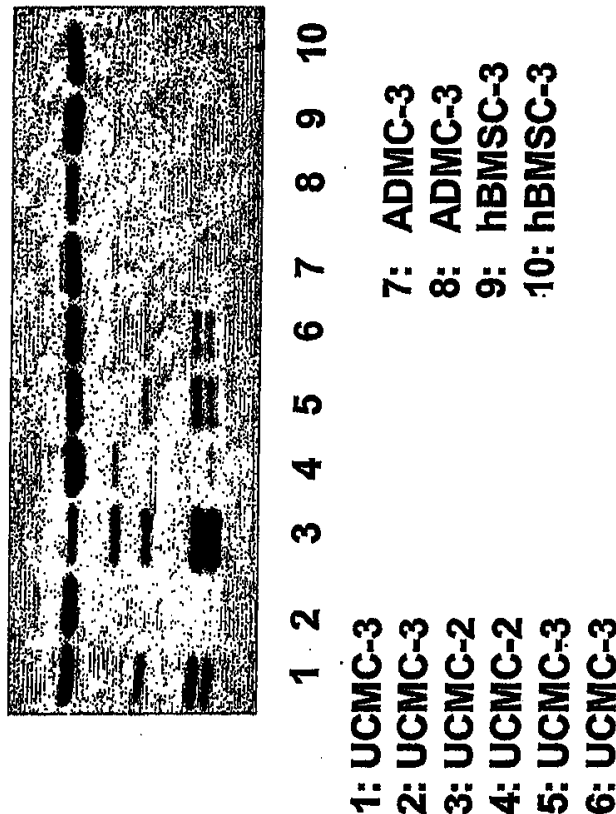


FIG 9-14: Expressão de Fator de Crescimento Derivado de Hepatoma (HDGF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



**FIG 9-15: Expressão de Fator de Crescimento Derivado de Hepatoma (HDGF)
Em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)**

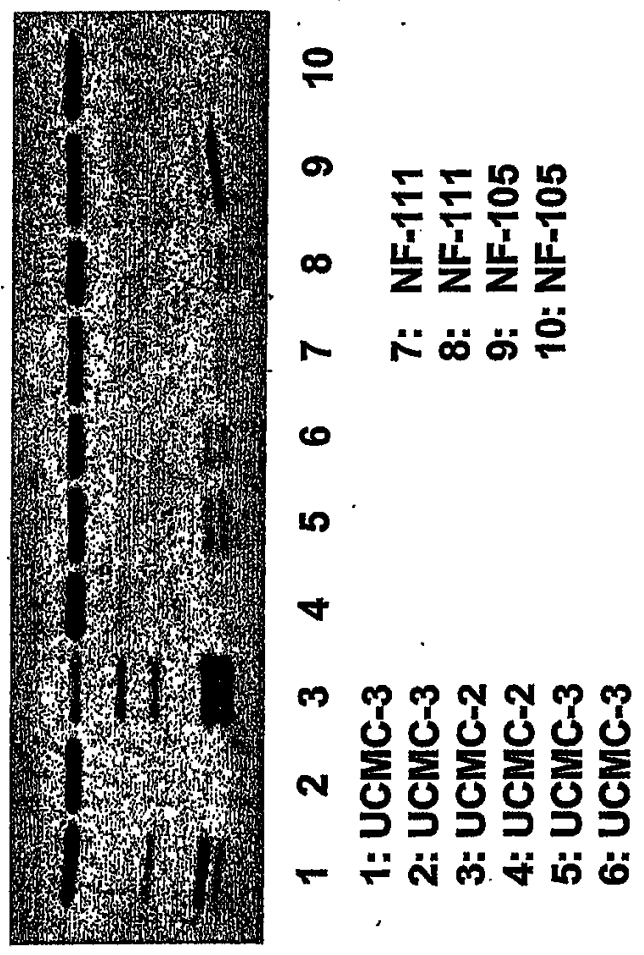


FIG 9-16: Expressão de Fator de Crescimento de Célula tronco (SCF) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

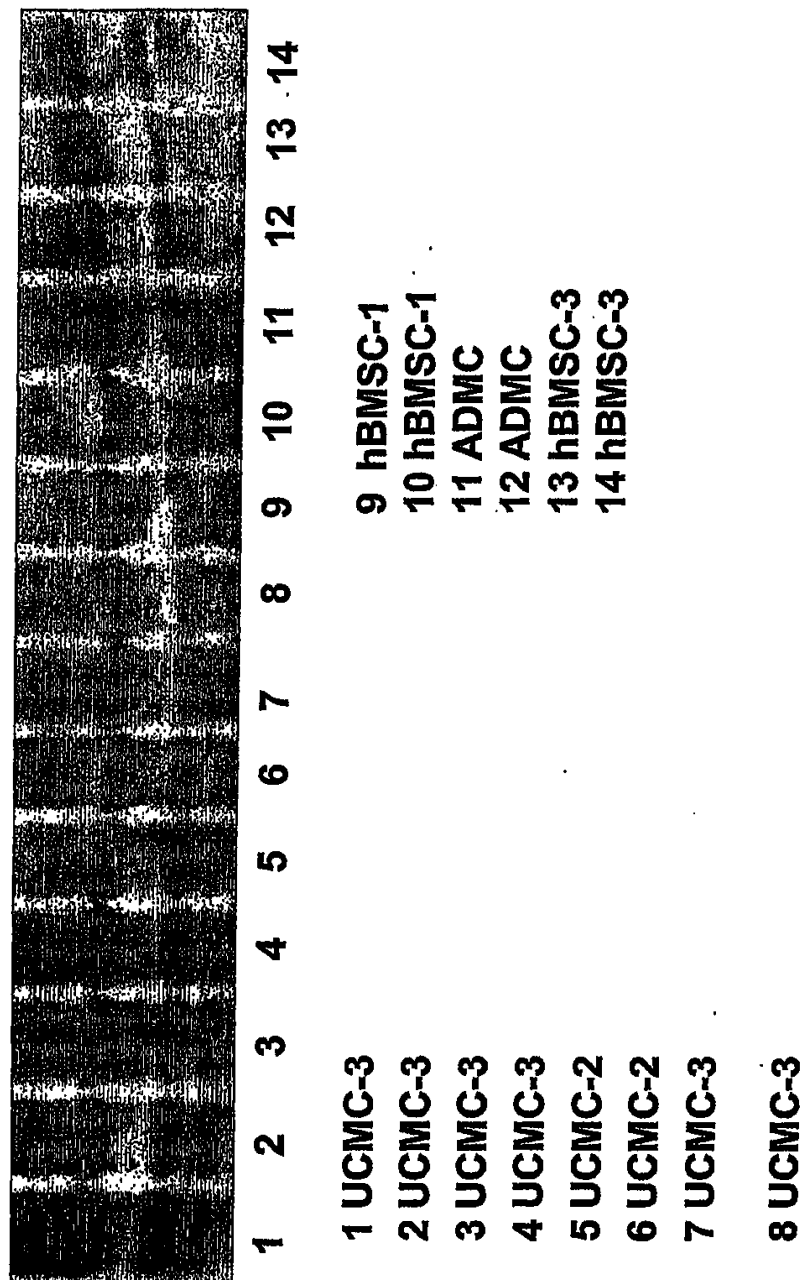
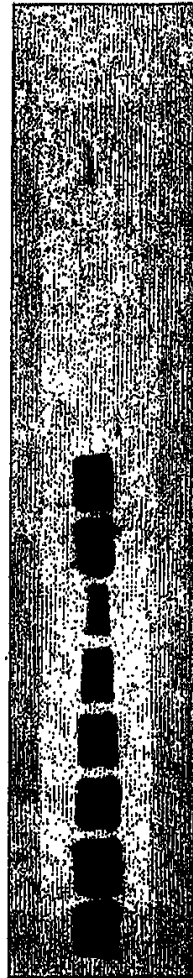


FIG 9-17: Expressão de Actina de Músculo Liso-alfa (α -SMA) em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

- 1. UCMC4
- 2. UCMC4
- 3. UCMC7
- 4. UCMC7
- 5. CBMC4
- 6. CBMC4
- 7. CBMC12
- 8. CBMC12

- 9. UCEC10
- 10. NK(ar)
- 11. Mistura de NF
- 12. Mistura de NF
- 13. NF6
- 14. NF6

FIG 9-18: Expressão de Fibronectina em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

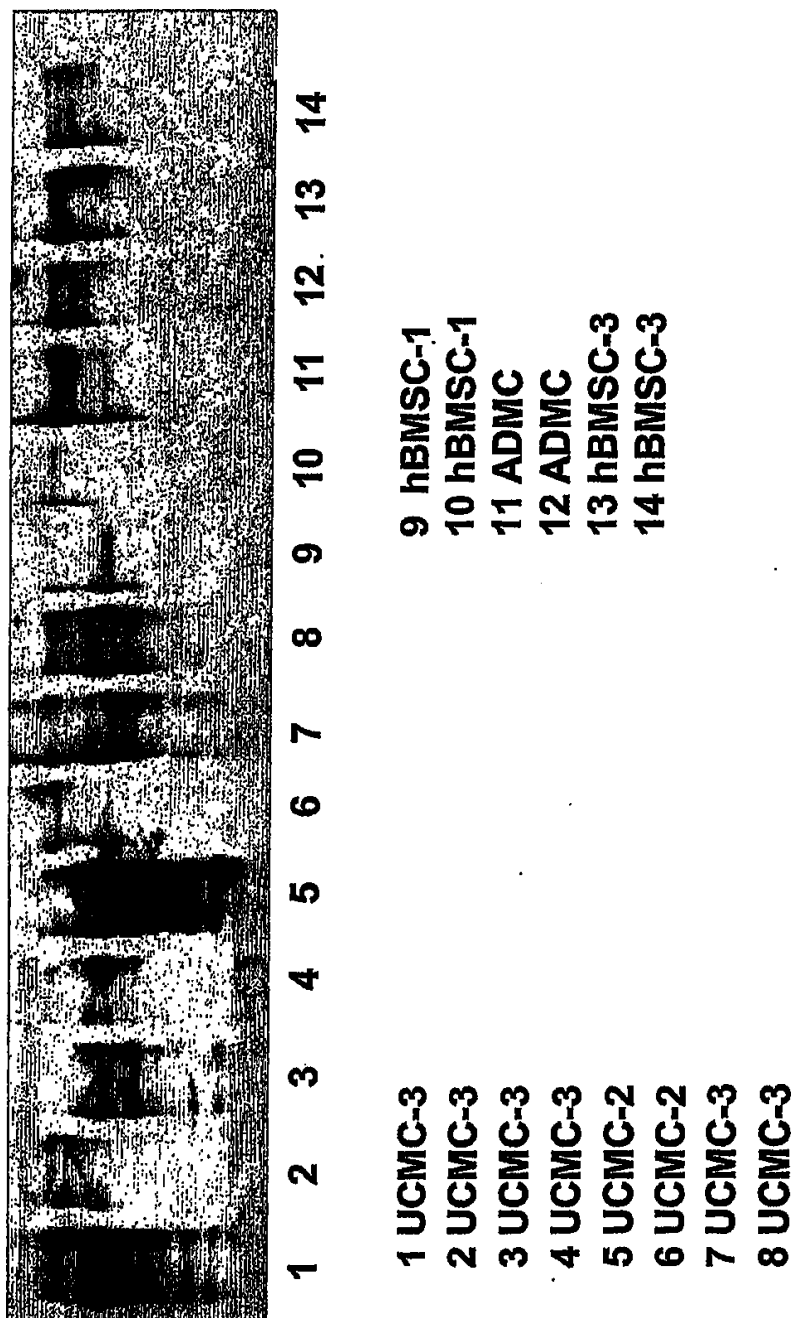


FIG 9-19: Expressão de Fibronectina em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

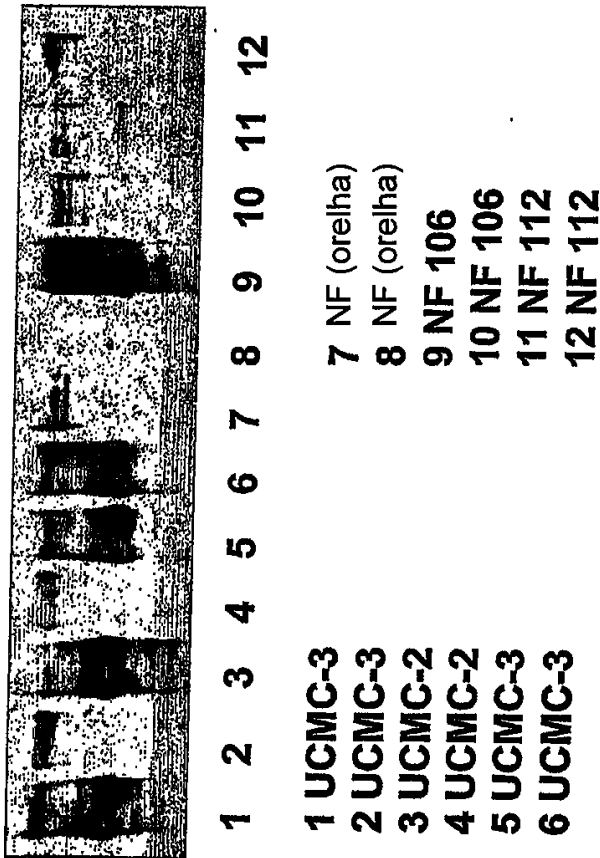


FIG 9-20: Expressão de Decorina em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

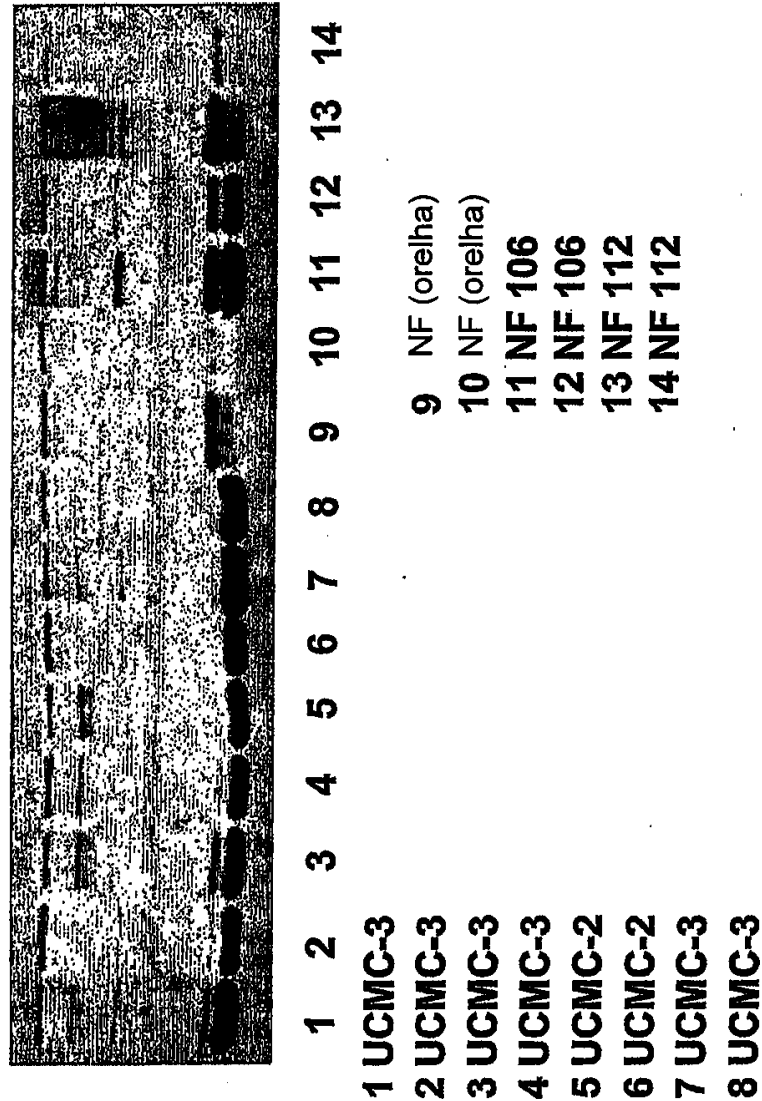


FIG 9-21: Expressão de Syndecan-1 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

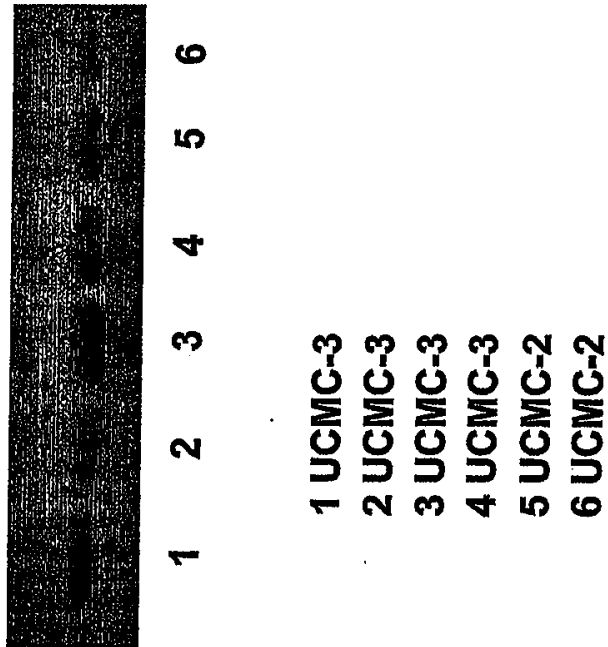


FIG 9-22: Expressão de Sindecán-2 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

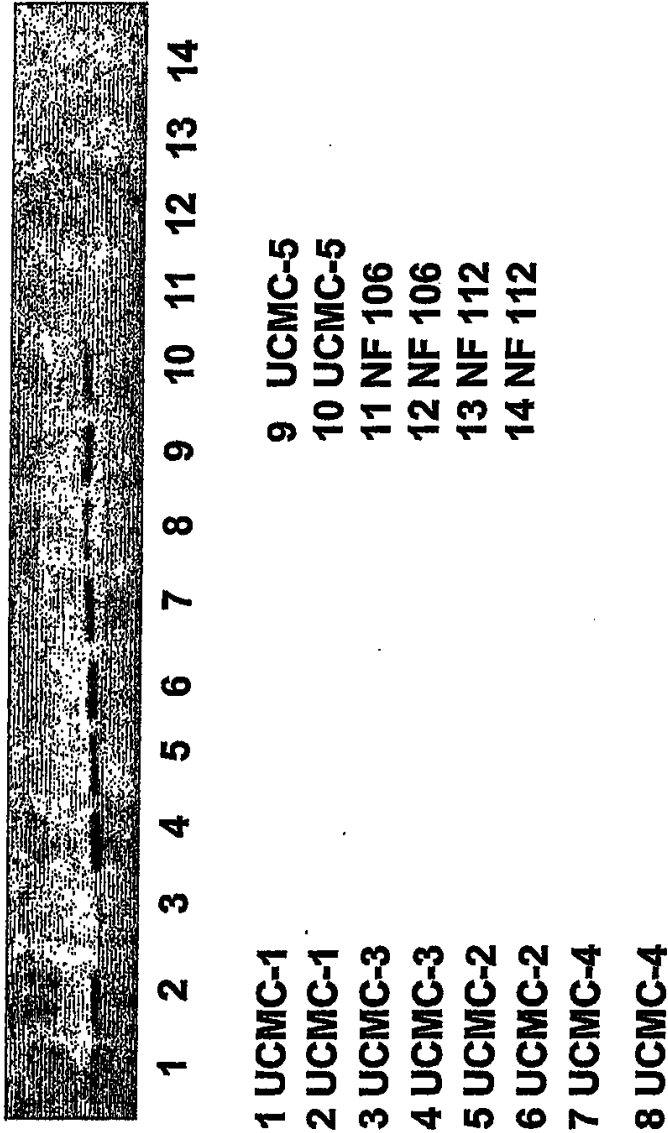


FIG 9-23: Expressão de Syndecan-2 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-1
2 UCMC-1
3 UCMC-3
4 UCMC-3
5 UCMC-2
6 UCMC-2
7 UCMC-4
8 UCMC-4

9 UCMC-5
10 UCMC-5
11 NF 106
12 NF 106
13 NF 112
14 NF 112

FIG 9-24: Expressão de Syndecan-3 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

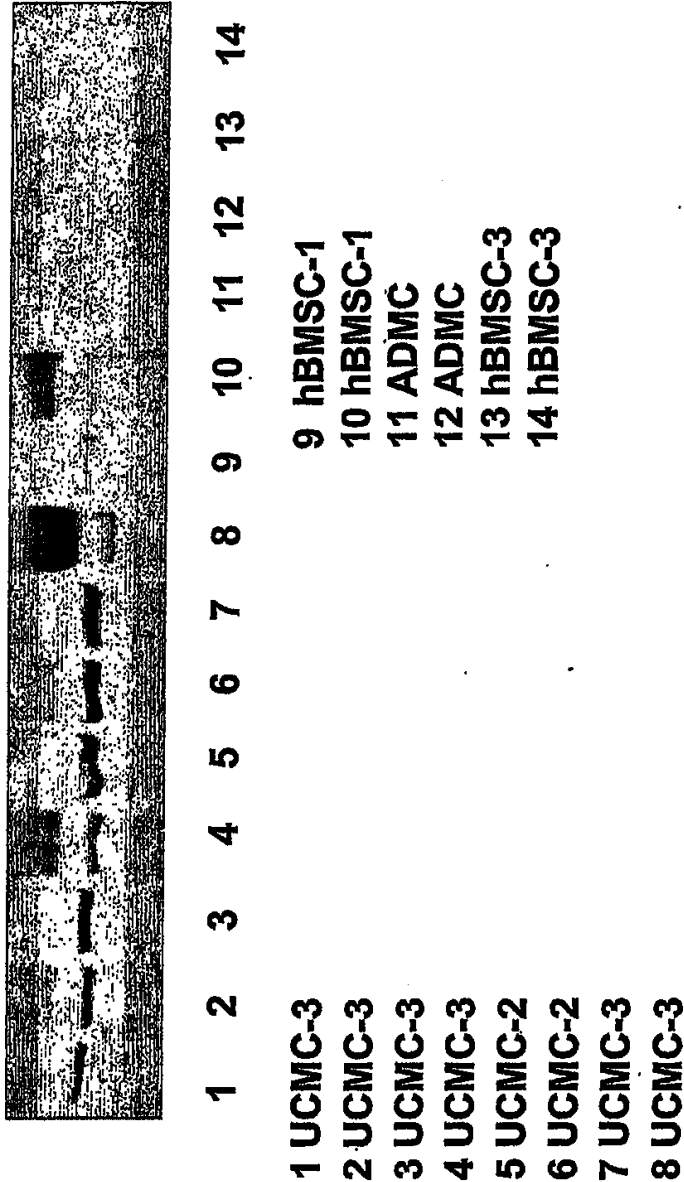
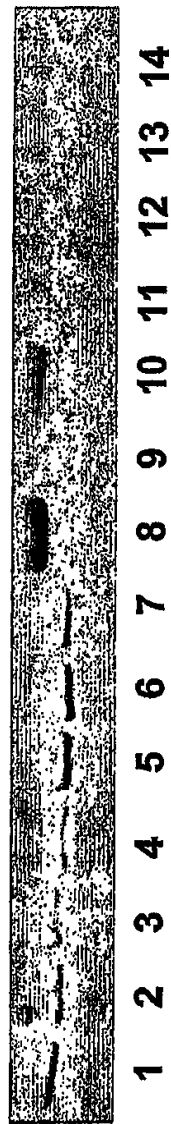


FIG 9-25: Expressão de Sindecán-3 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)



1 UCMC-3
2 UCMC-3
3 UCMC-3
4 UCMC-3
5 UCMC-2
6 UCMC-2
7 UCMC-3
8 UCMC-3

9 NF (orelha)
10 NF (orelha)
11 NF 106
12 NF 106
13 NF 112
14 NF 112

FIG 9-26: Expressão de Sindecán-4 em Células-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC)

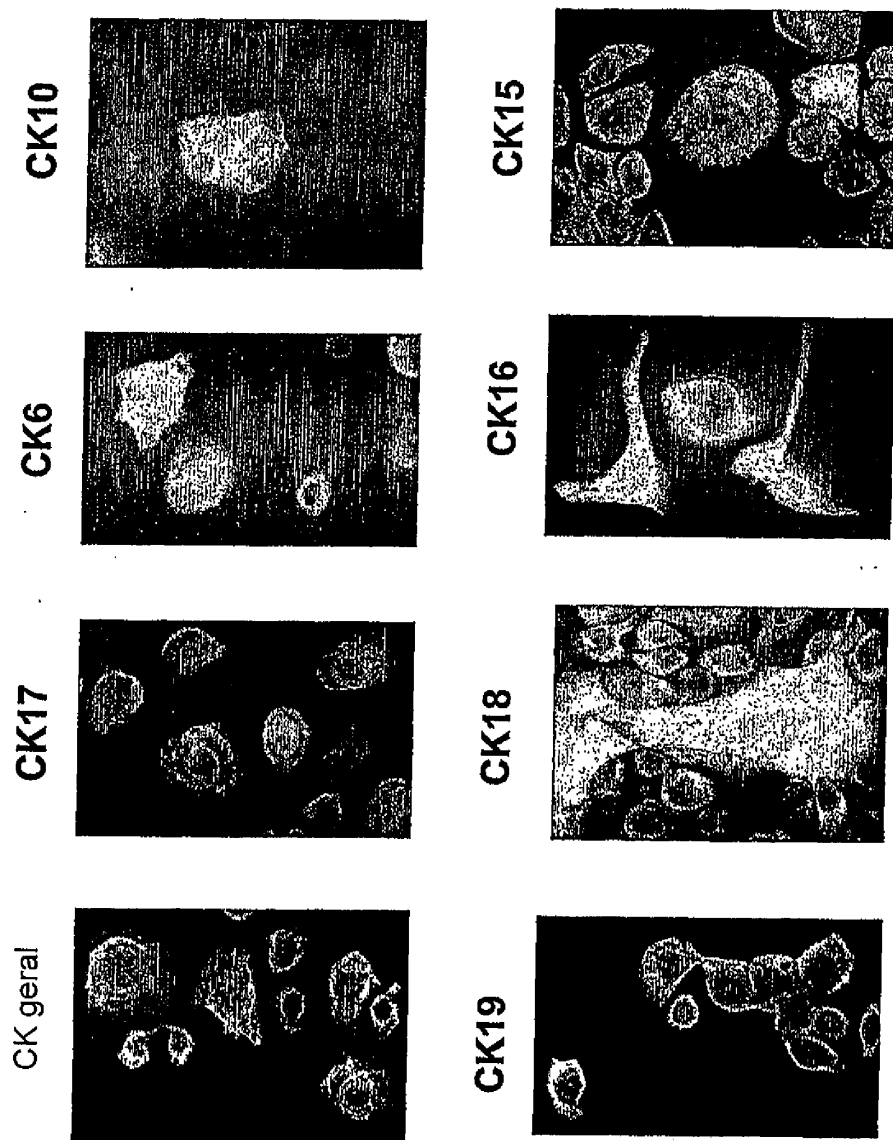


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

1 UCMC-1
2 UCMC-1
3 UCMC-3
4 UCMC-3
5 UCMC-2
6 UCMC-2
7 UCMC-4
8 UCMC-4

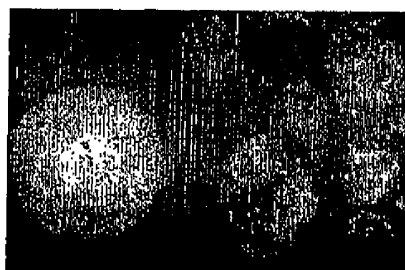
9 UCMC-5
10 UCMC-5
11 NF 106
12 NF 106
13 NF 112
14 NF 112

FIG 10-1: Expressão de Citoqueratinas em Células Epiteliais do Cordão Umbilical



37/65

FIG 10-2: Expressão de Hemidesmosomo e
Desmosomo em Células Epiteliais do Cordão Umbilical

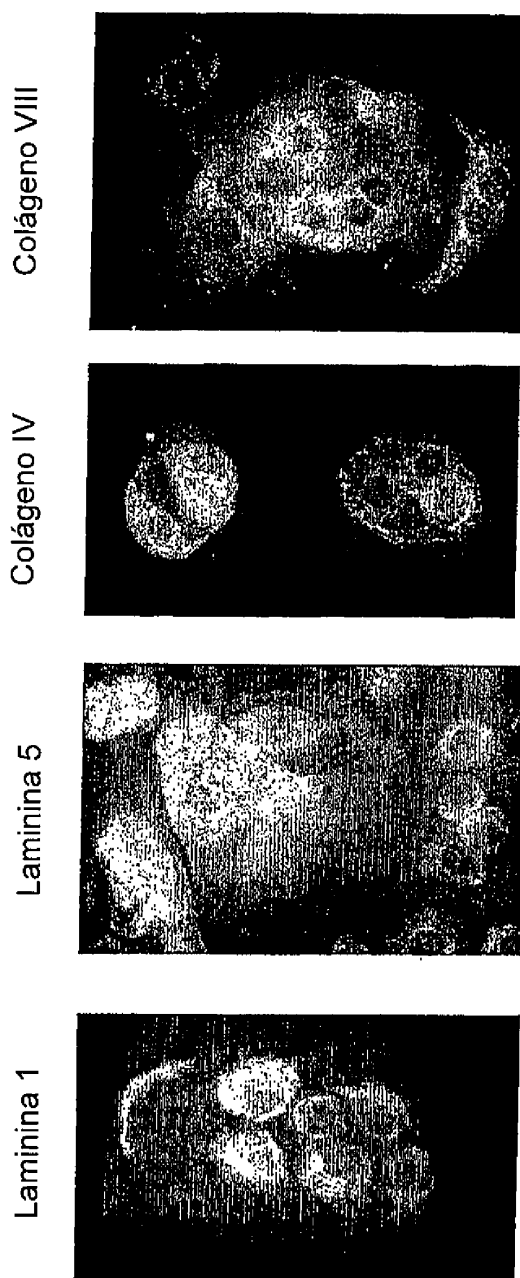
Integrina $\alpha 6$ Integrina $\beta 4$ 

Desmosomo



38/65

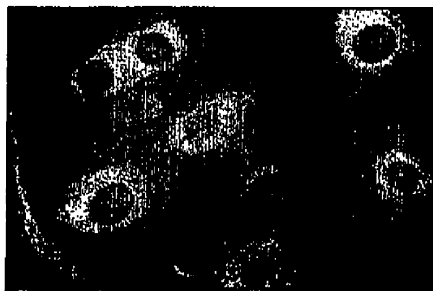
FIG 10-3: Expressão de Proteínas de Membrana de Base em Células Epiteliais do Cordão Umbilical



39/65

FIG 10-4: Expressão de Integrina- $\beta 1$ e Fibronectina
em Células Epiteliais do Cordão Umbilical

Integrina $\beta 1$



Fibronectina

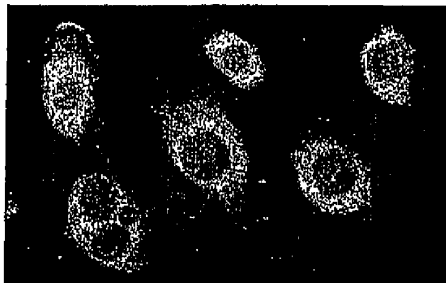


FIG 11: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Mesenquimais do Cordão Umbilical

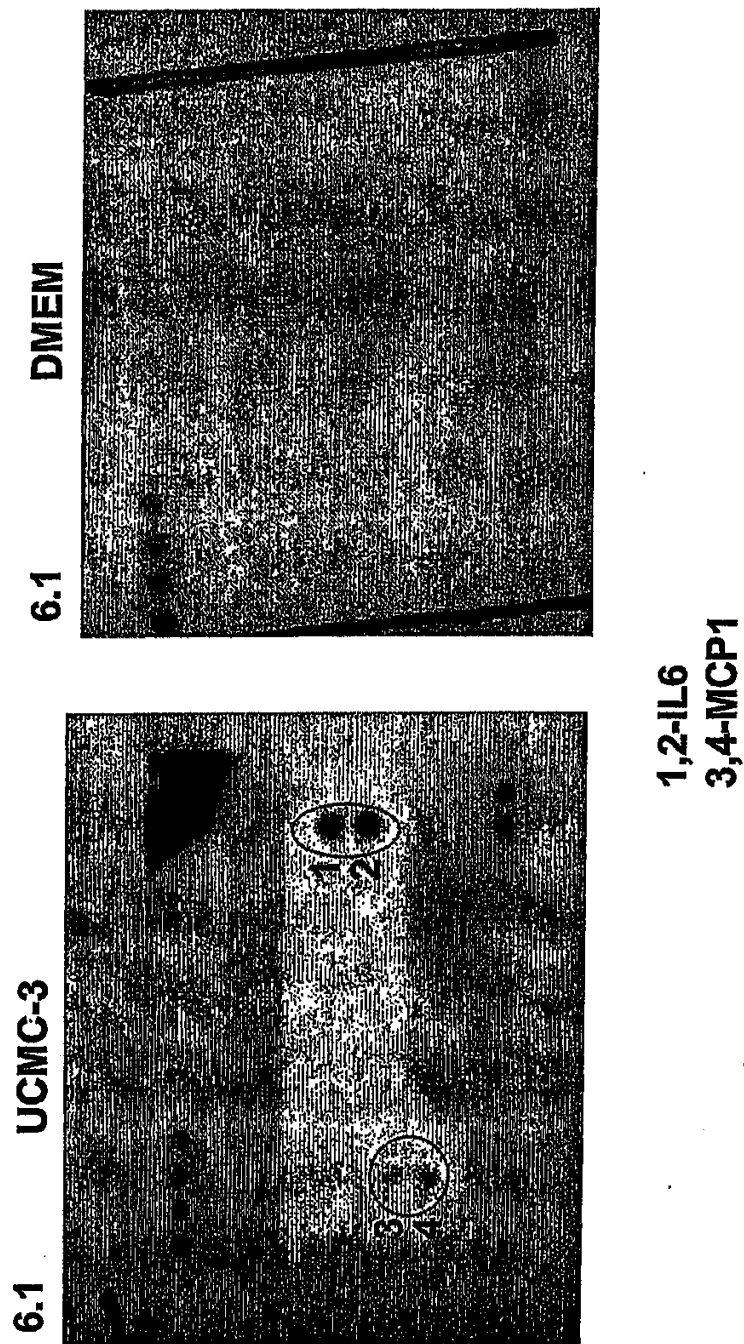


FIG 11: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Mesenquimais do Cordão Umbilical

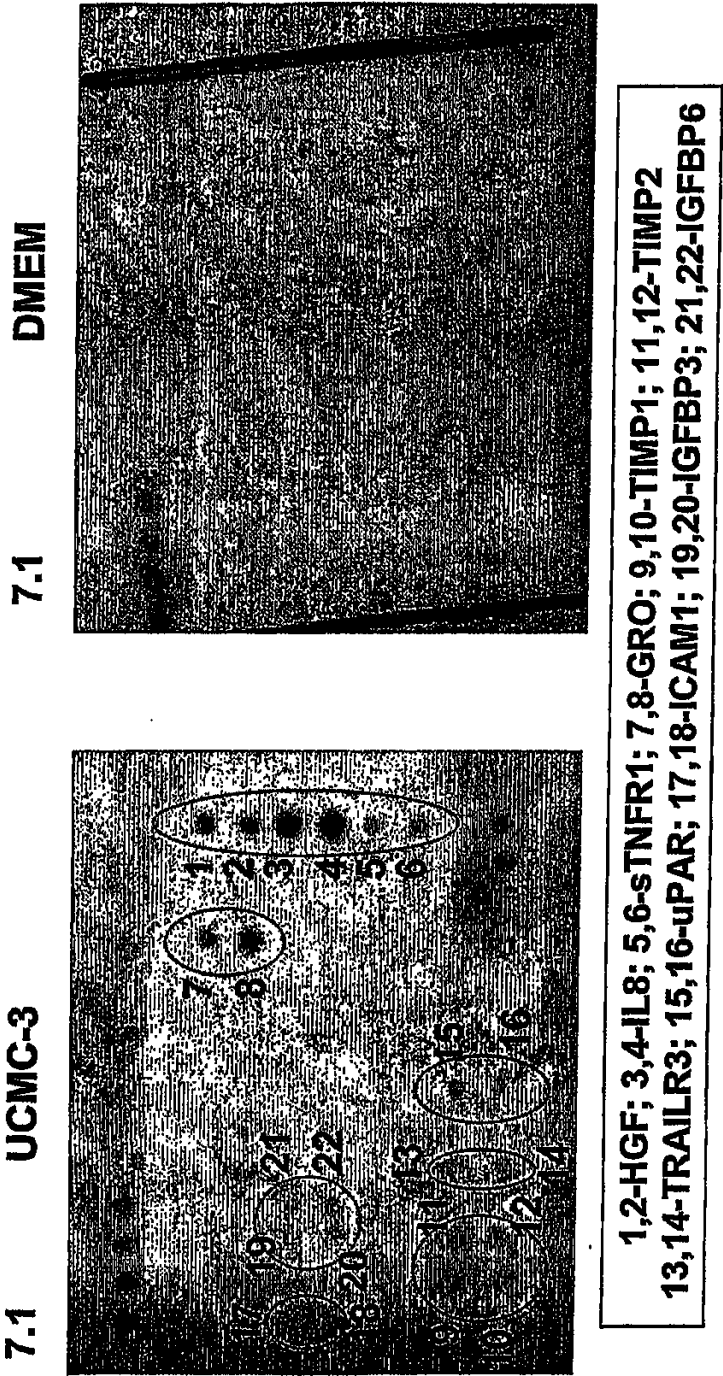
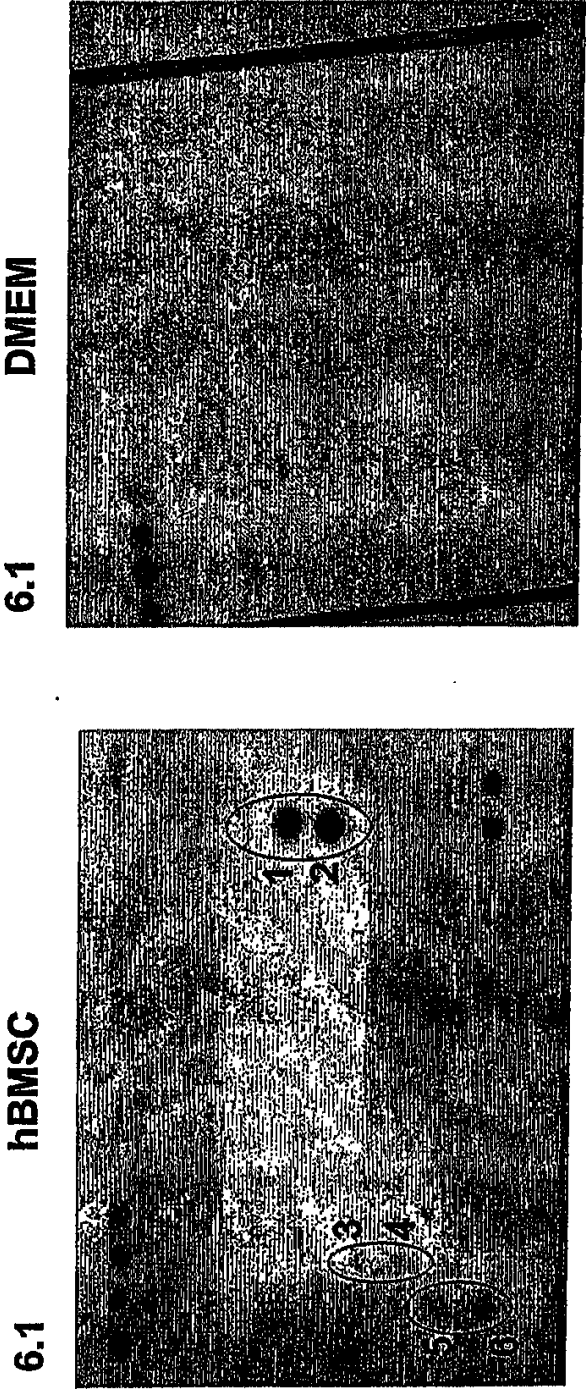
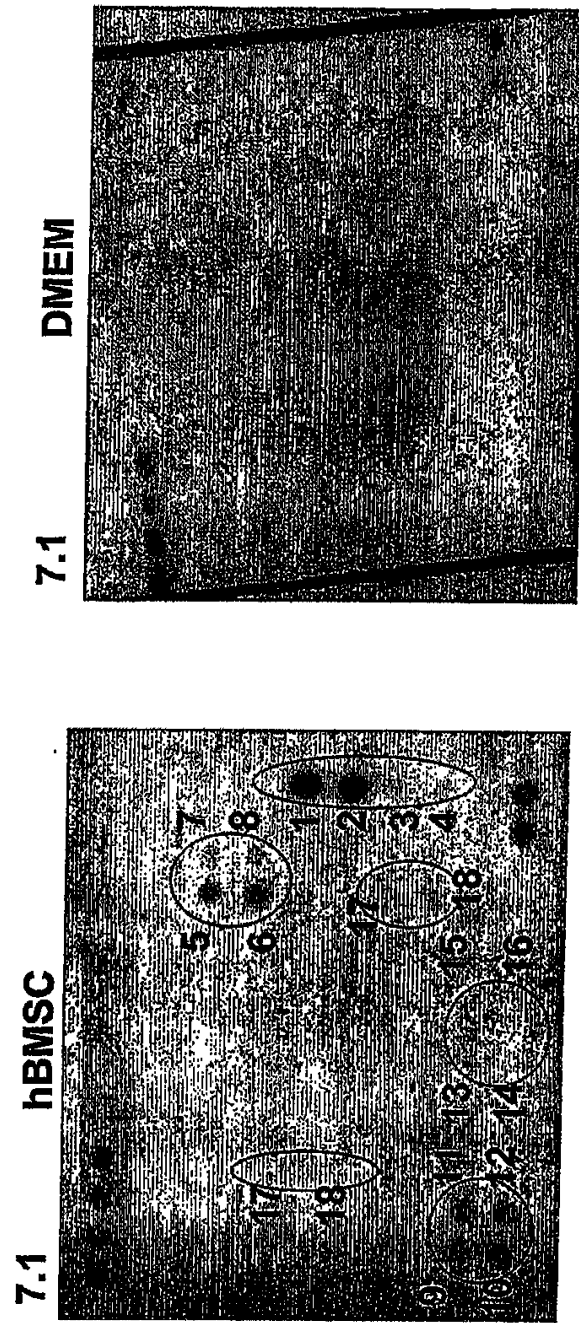


FIG 11: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Mesenquimais da Medula Óssea



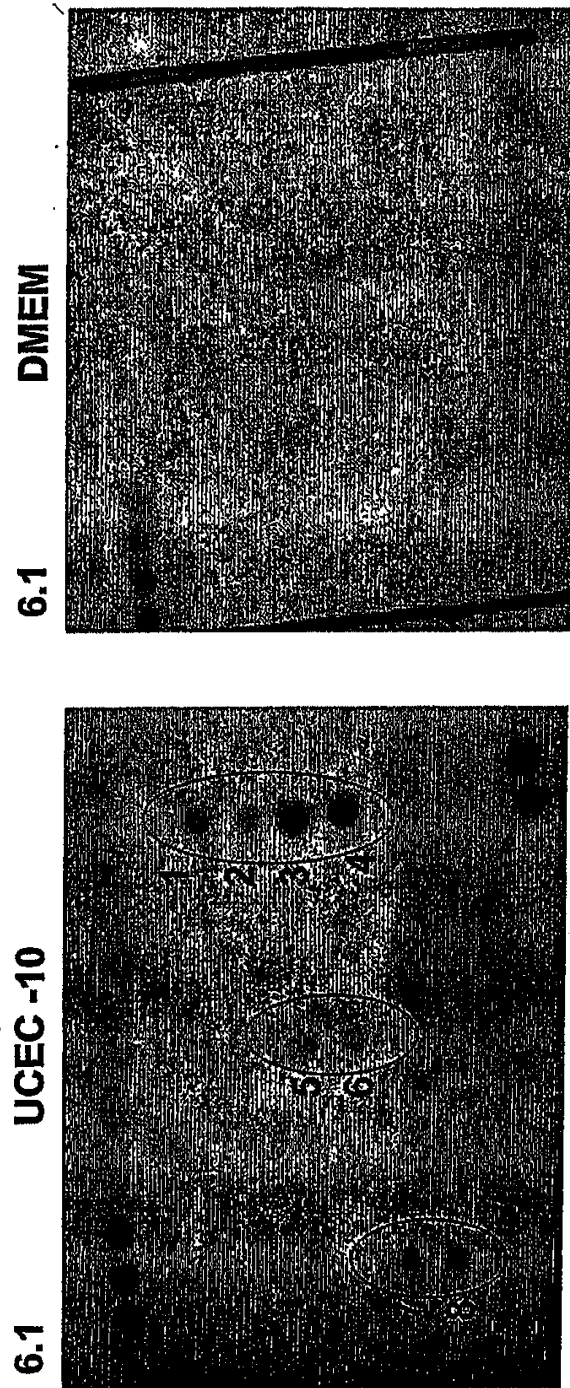
1,2-IL6; 3,4-MCP1; 5,6-RANTES

FIG 11: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Mesenquimais da Medula Óssea



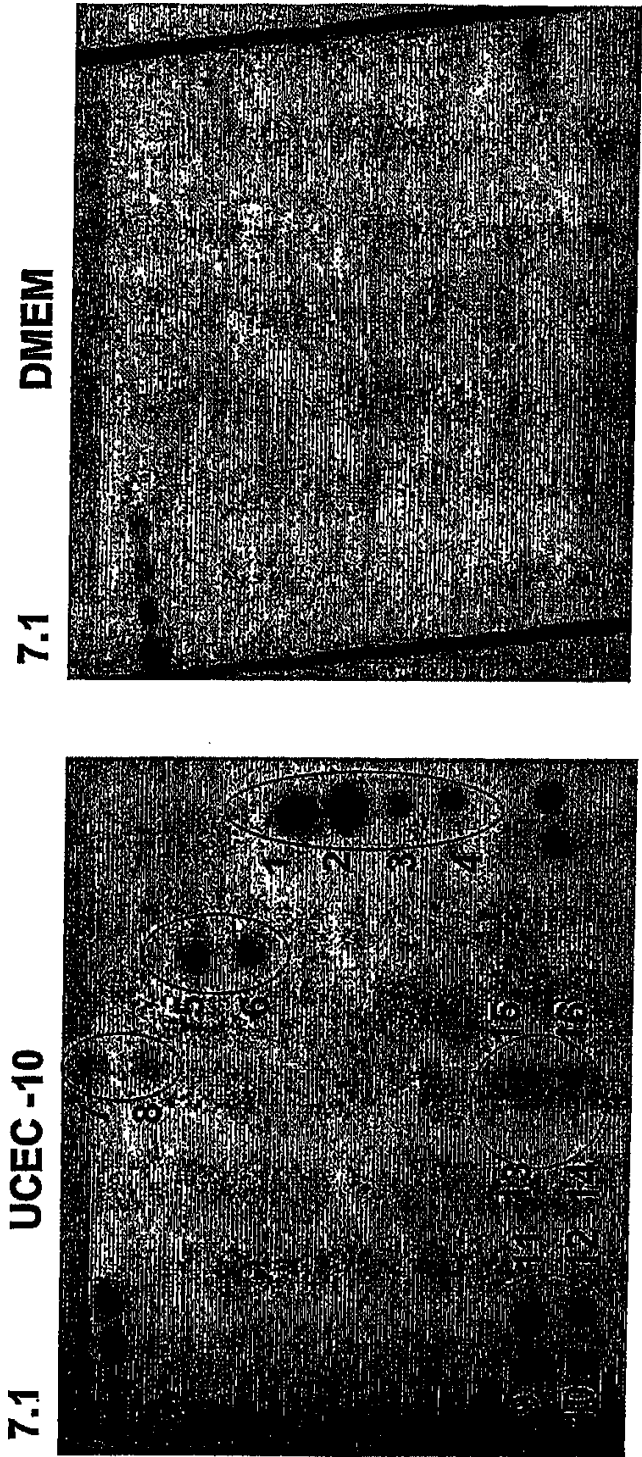
1,2-IL8; 3,4-sTNFR1; 5,6-GRO; 7,8-GRO-a; 9,10-TIMP1; 11,12-TIMP2
13,14-uPAR; 15,16-VEGF; 17,18-PIGF

FIG 12: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Epiteliais do Cordão Umbilical



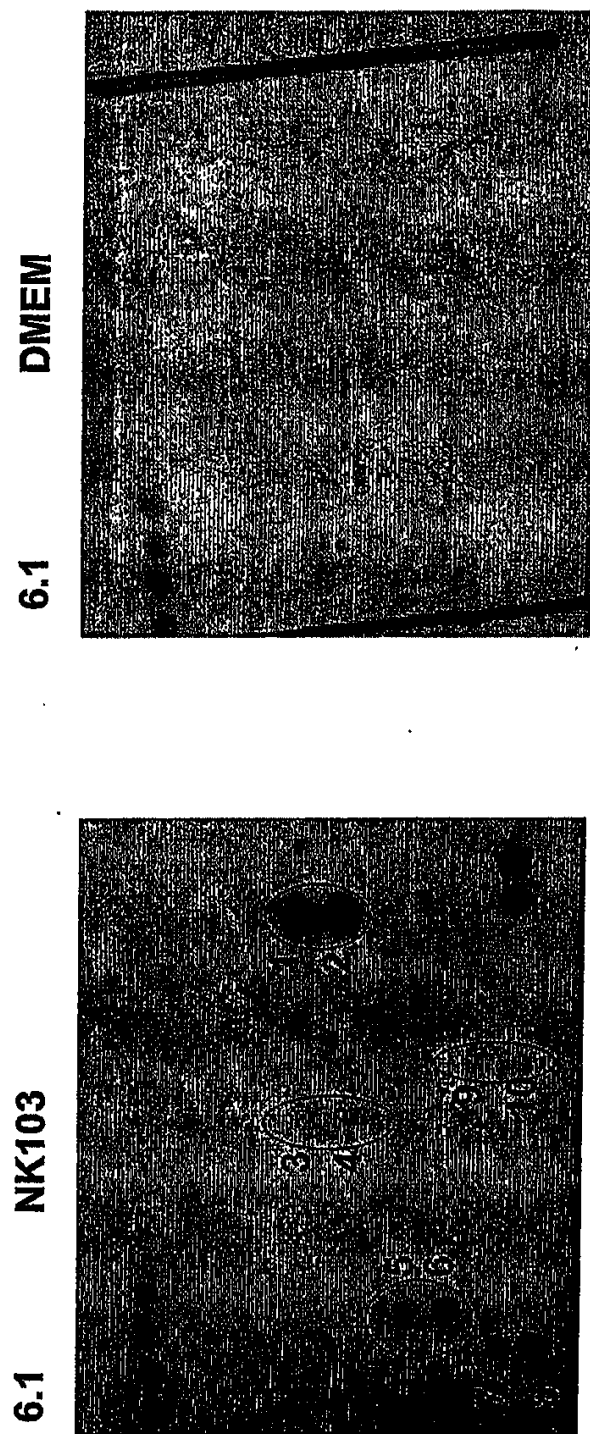
1,2-IGFBP-2; 3,4-IL6; 5,6-IL1R α ; 7,8-MCP-1

FIG 12: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Epiteliais do Cordão Umbilical



1,2-IL8; 3,4-sTNFR; 5,6-GRO; 7,8-Anfirregulina; 9,10-TIMP1;
11,12-TIMP2; 13,14-uPAR; 15,16-VEGF

FIG 12; Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento por Ceratinócitos Epidérmicos Humanos



1,2-IL6; 3,4-IL1 α ; 5,6-MCP-1; 7,8-RANTES; 9,10-TNF β

FIG 12; Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento por Ceratinócitos Epidérmicos Humanos

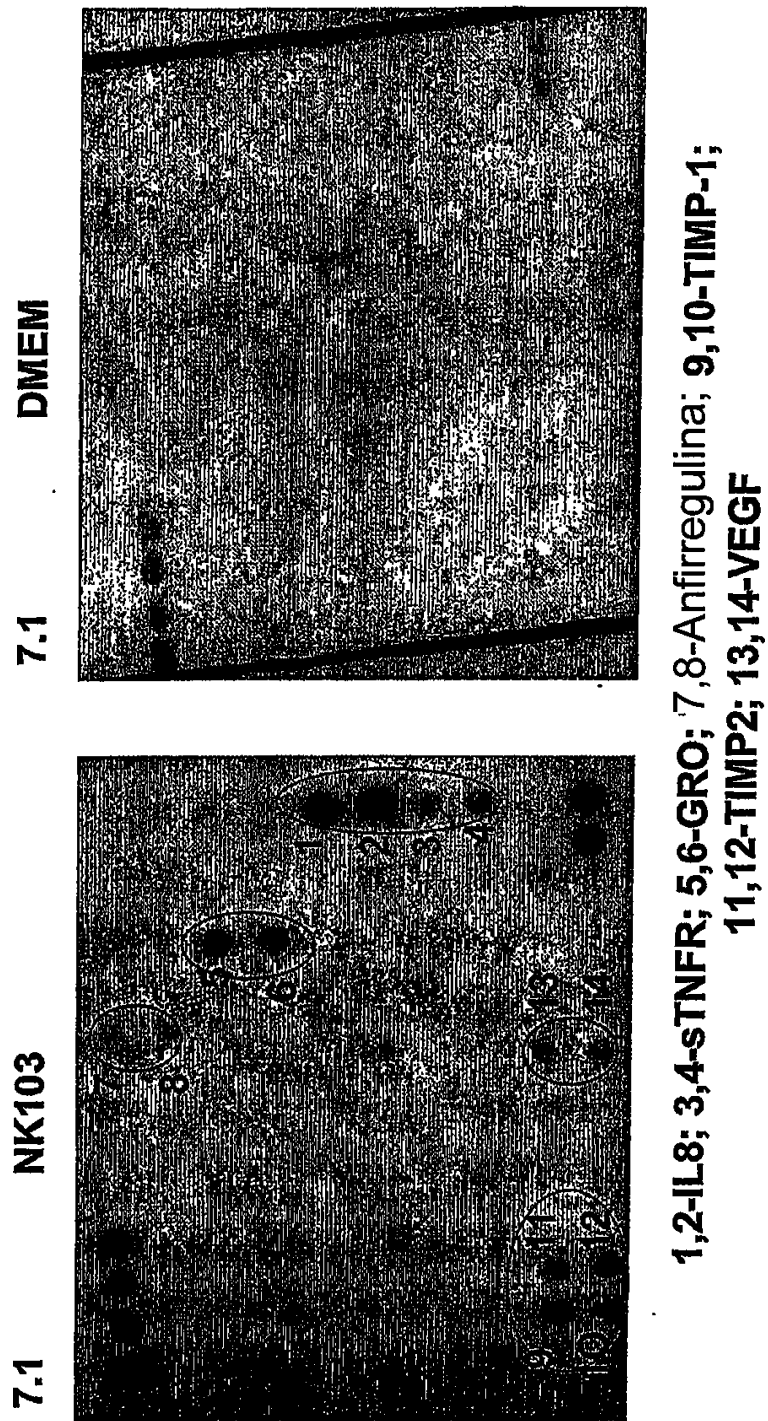


FIG 12: Perfil de Expressão de Citocinas Segregadas e Fatores de Crescimento através de Células Epiteliais do Cordão Umbilical

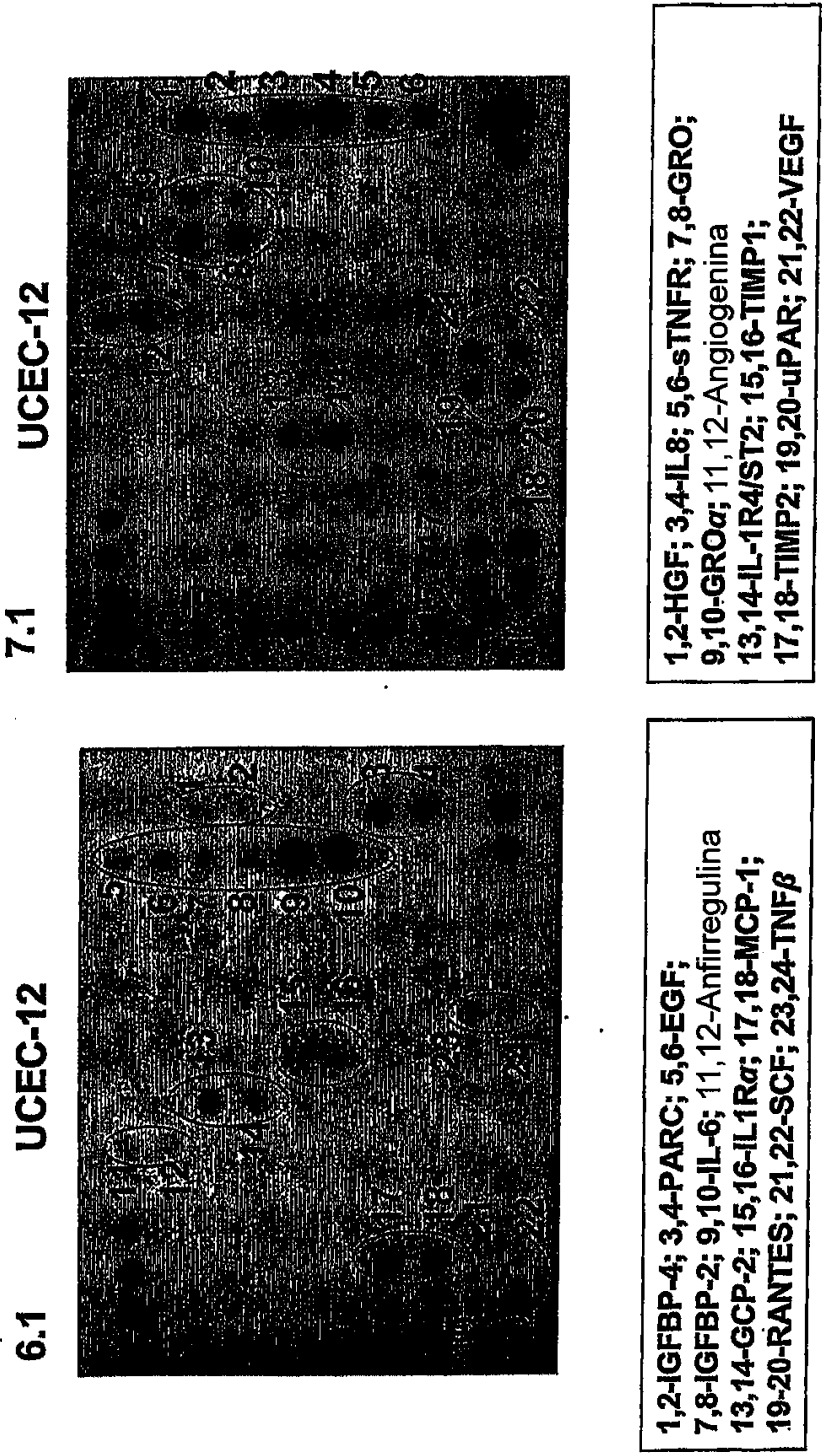


FIG.12 - Tingimento de Fatia usada para Arranjo de Citocina (6.1) -

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	PO S	PO S	Amostra	Angiogenina	BDN F	BLC	BMP 4	BMP -6	CK b 8-1	CNT F	EGF	Eotaxina
2	NEG	NEG	NE G	NE G	Amostra	Angiogenina	BDN F	BLC	BMP 4	BMP -6	CK b 8-1	CNT F	EGF	Eotaxina
3	Eotaxina -2	Eotaxina -3	FGF -6	FGF -7	Ligando de Fit-3	Fractalina	GCP -2	GD NF	GM- CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
4	Eotaxina -2	Eotaxina -3	FGF -6	FGF -7	Ligando de Fit-3	Fractalina	GCP -2	GD NF	GM- CSF	I-309	IFN-g	IGFB P-1	IGFB P-2	IGFB P-4
5	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
6	IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1a	IL-1b	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
7	Leptina T	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP- 1d	MIP- 3a	NAP- 2	NT-3	PAR C
8	Leptina T	LIGH T	MC P-1	MC P-2	MCP-3	MCP-4	M- CSF	MD C	MIG	MIP- 1d	MIP- 3a	NAP- 2	NT-3	PAR C
9	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF b	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra
10	PDGF -BB	RANT ES	SCF	SDF -1	TARC	TGF- b1	TGF- b3	TNF -a	TNF b	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra

FIG.12 - Tingimento de Fatia usada para Arranjo de Citocina (7.1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	POS	POS	POS	POS	Amostra	Acp30	AgR P	Eotaxina -2	Anfiteguina	Axl	bF GF	b- NGF	BTC	CCL-28
2	NEG	NEG	NEG	NEG	Amostra	Acp30	AgR P	Eotaxina -2	Anfiteguina	Axl	bF GF	b- NGF	BTC	CCL-28
3	CTA CK	Dik	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	Ligando de GITR	GITR	GR O	GR O-a	HCC-4	HGF
4	CTA CK	Dik	EGF-R	ENA-78	Fas	FGF-4	FGF -9	GCSF	Ligando de GITR	GITR	GR O	GR O-a	HCC-4	HGF
5	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
6	ICA M-1	ICAM-3	IGFB P-3	IGFBP-6	IGF-I SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 RI	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 Ra	IL-6 R	IL-8
7	I- TAC	Linfotactina	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	Osteopontina	Oncostina M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
8	I- TAC	Linfotactina	MIF	MIP-1a	MIP-1 b	MIP-3b	MS P-a	NT-4	Osteopontina	Oncostina M	PIG F	sgp1 30	sTNF RII	sTNF -RI
9	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	Trombo-poietina	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	Amostra	Amos -tra	Amos -tra	Amostra	Amostra
10	TEC K	TIMP-1	TIMP -2	Trombo-poietina	TRAIL R3	TRAIL R4	uPA R	VEGF	VEGF-D	Amostra	Amos -tra	Amos -tra	POS	POS

FIG 13-1: UCMC-16 cultivada em DMEM/10 % FCS, no dia 10

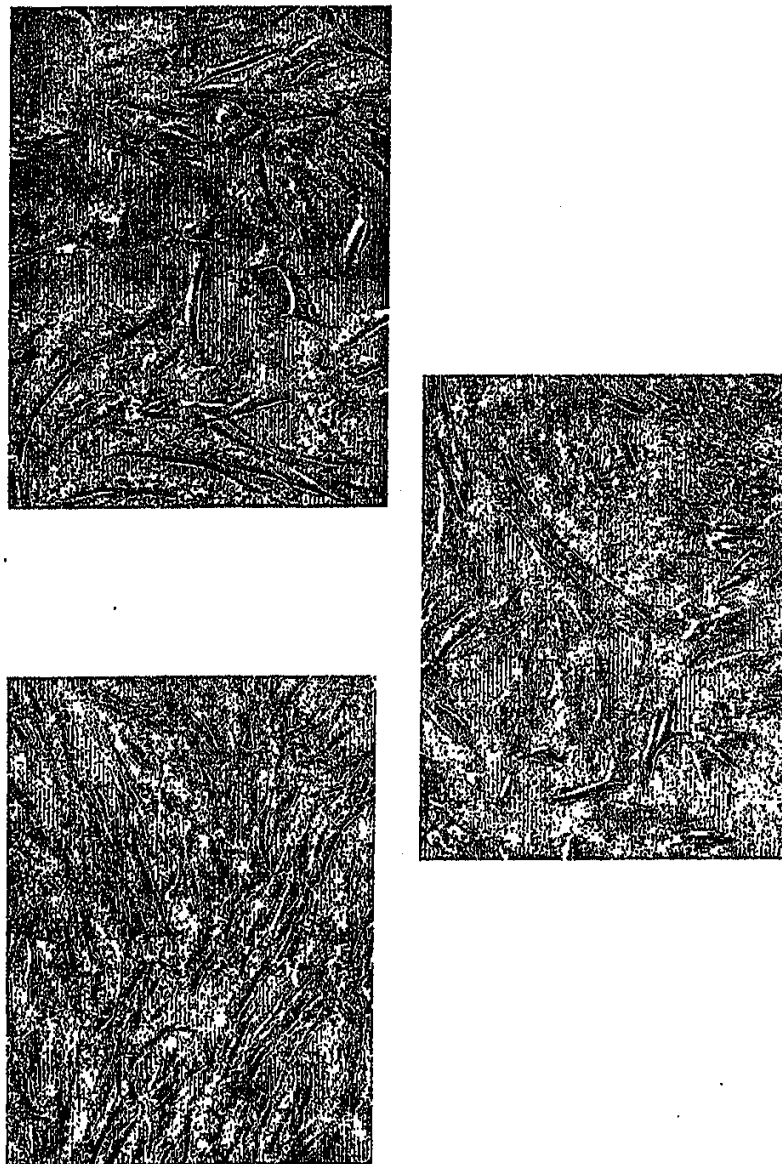


FIG 13-2: UCMC-15 cultivada em meio de PTT-1, dia 4

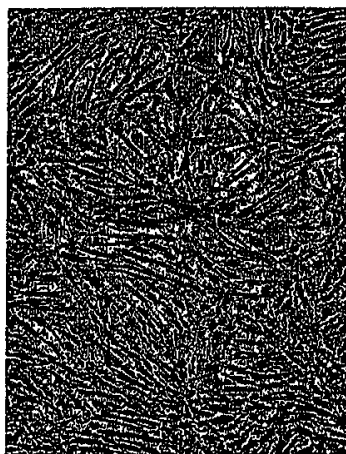
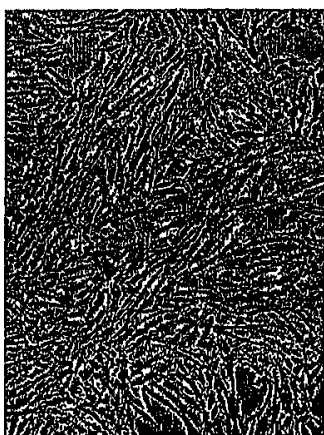
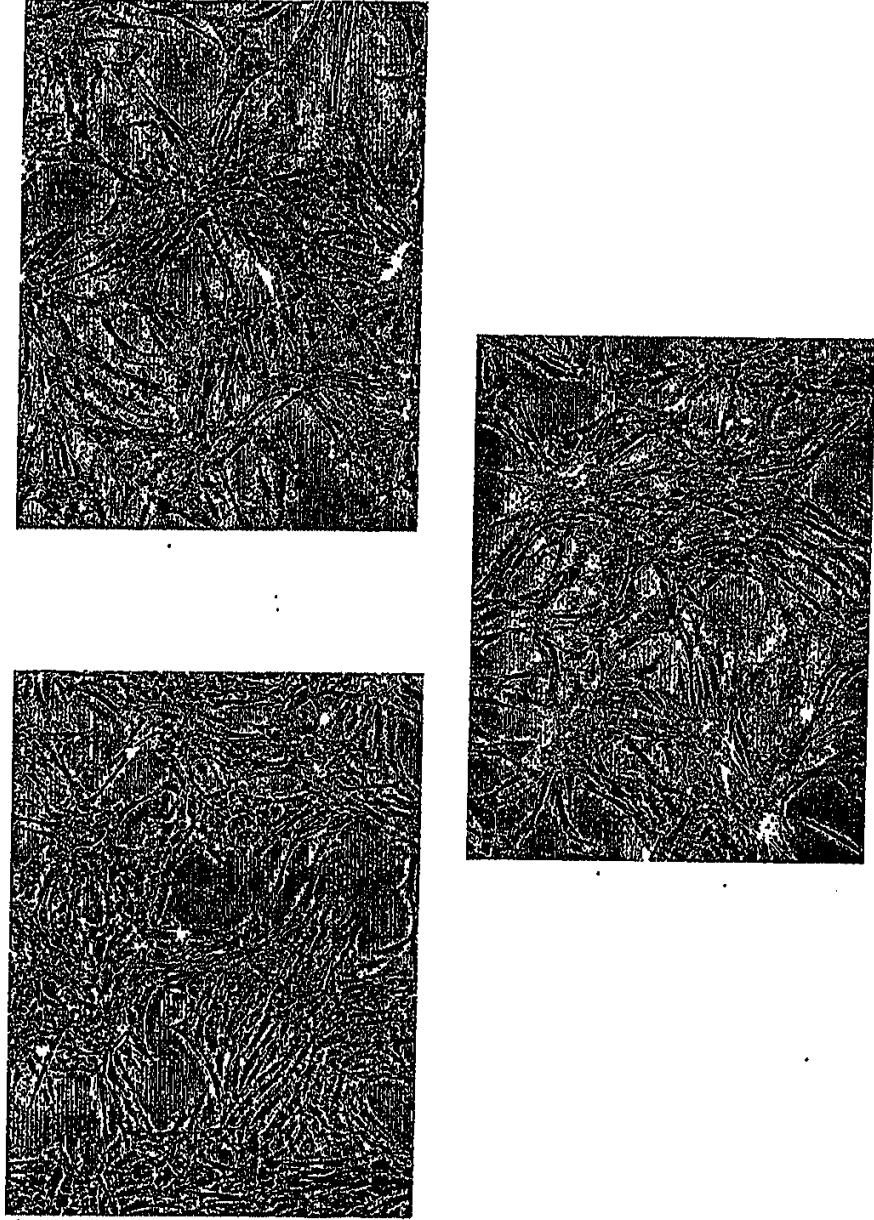


FIG 13-3: UCMC-16 cultivada em PTT-1 no dia 10



54/65

FIG 13-4: UCMC-16 cultivada em PTT-2 no dia 10

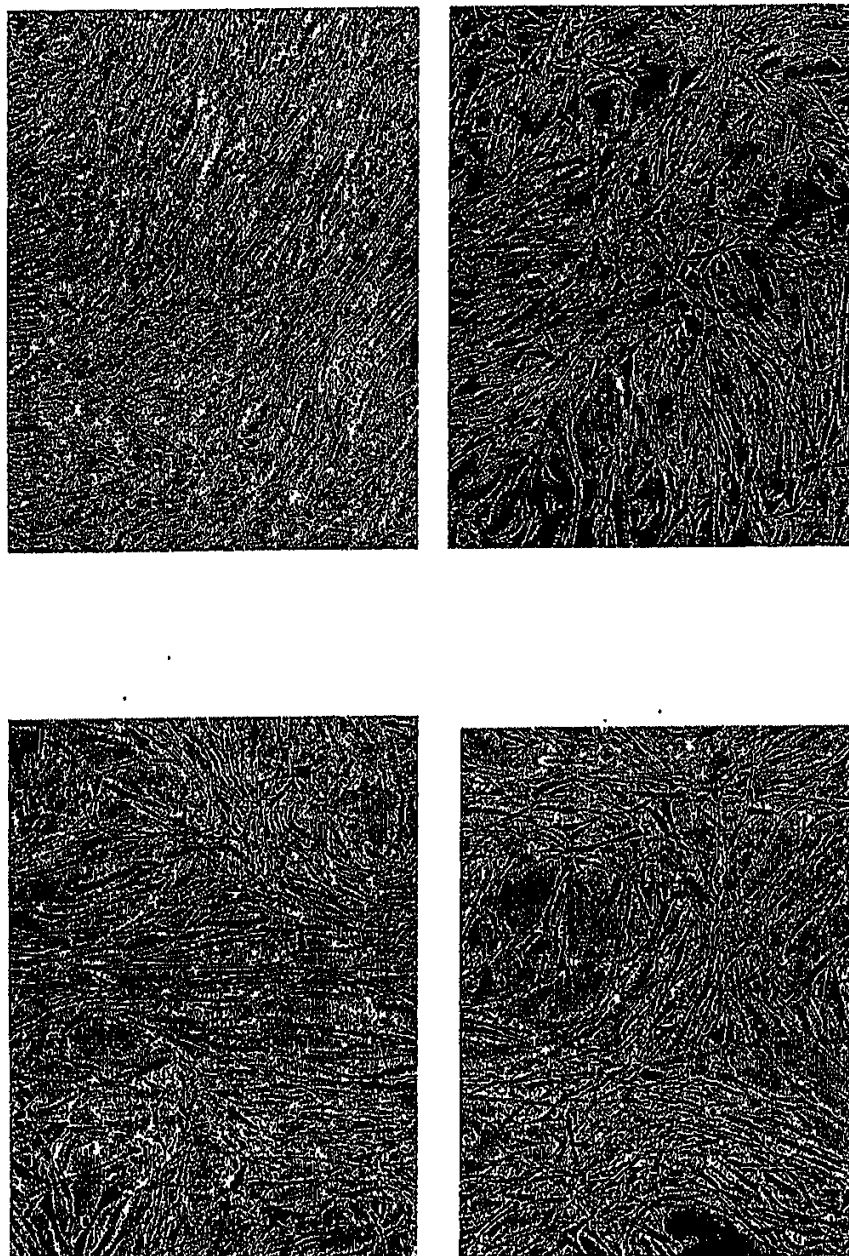


FIG 13-5: UCMC-16 cultivada em PTT-3 no dia 10

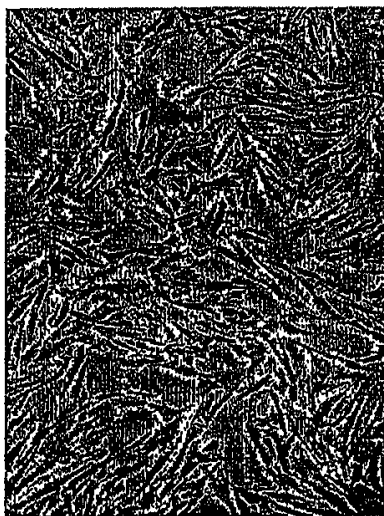
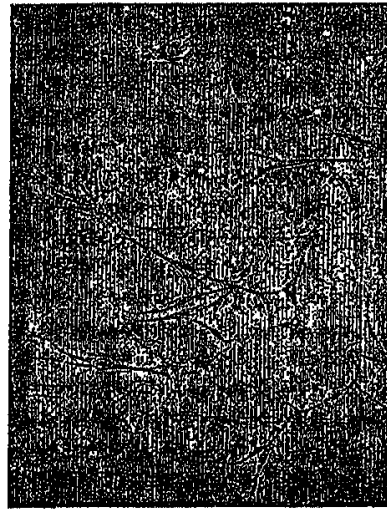
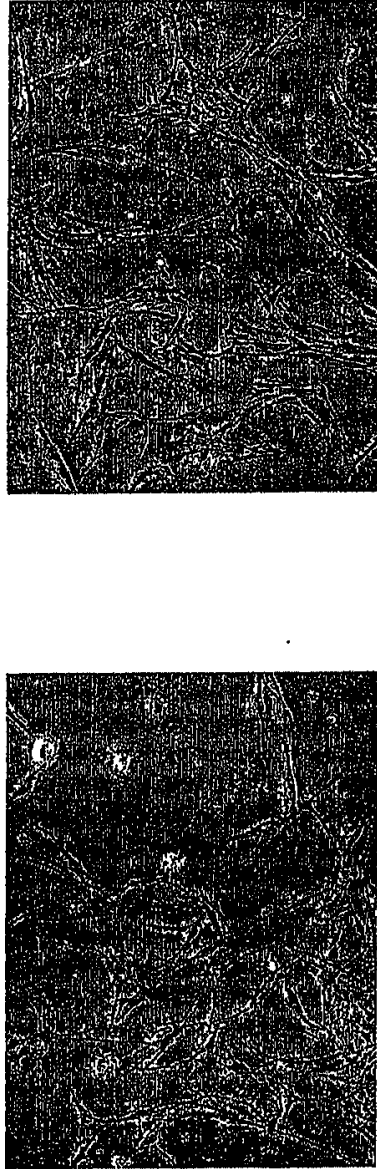
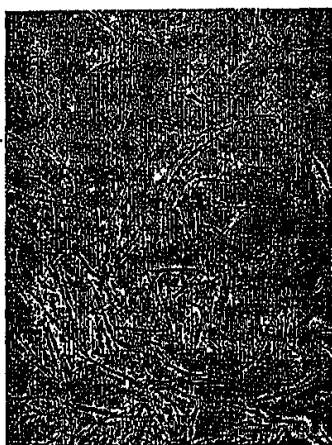
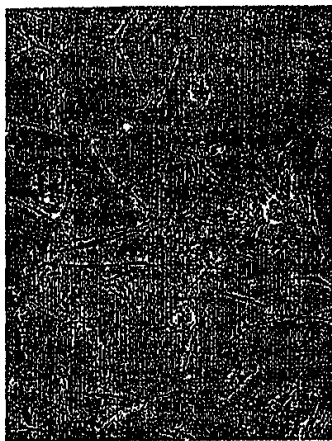


FIG 13-6: Células estromais derivadas adiposas cultivadas em PTT-3 no dia 10. Células não cresceram bem em meio livre de soro



57/65

FIG 13-7: Células estromais derivadas da medula óssea cultivadas em PTT-3 (MeE) no dia 10. Células não cresceram bem em meio livre de soro.



58/65

FIG 14: Expressão de gene global em Células-Tronco Epiteliais e Mesenquimais do Cordão Umbilical

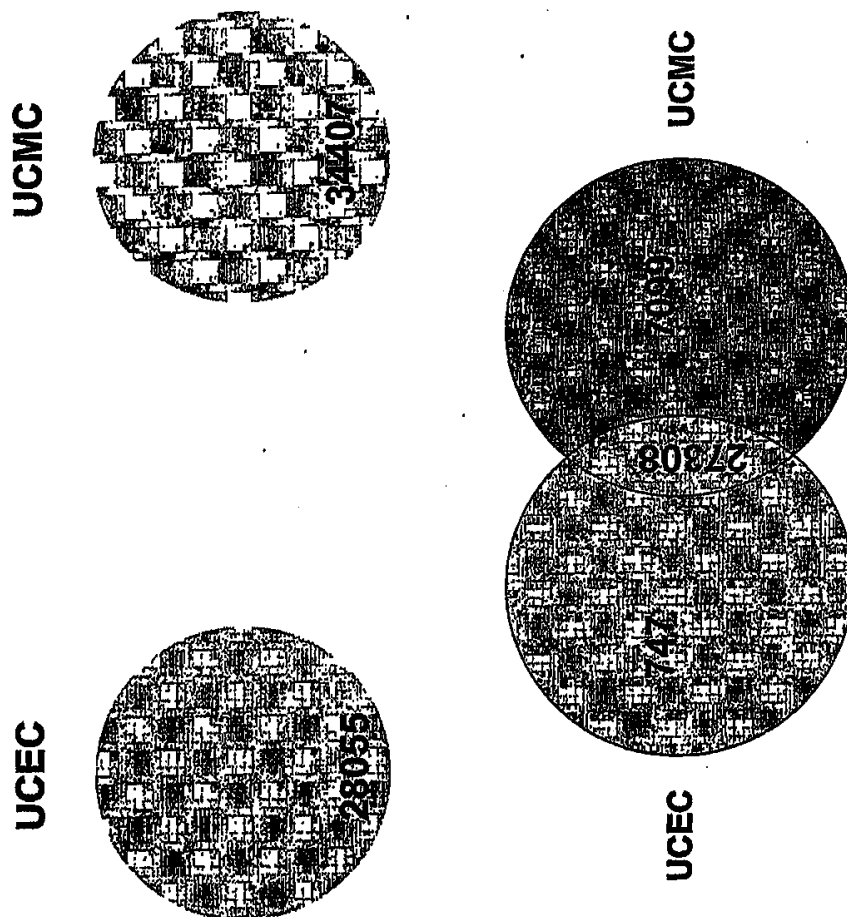


FIG 14: Expressão de gene
presente em AMBAS,
Células-Tronco Epiteliais
e Mesenquimais do Cordão Umbilical

VIn both UCEC and UCMC	
16 genes in both-cell envelope	
12 genes in both-cell wall	
19 genes in both-physiological process	
36 genes in both-reproduction	
65 genes in both-response to biotic stimulus	
78 genes in both-homeostasis	
83 genes in both-oxygen binding	
84 genes in both-endosome	
95 genes in both-peroxisome	
99 genes in both-response to endogenous stimulus	
120 genes in both-translation regulator	
136 genes in both-neurotransmitter transporter activity	
140 genes in both-embryonic development	
146 genes in both-morphogenesis	
164 genes in both-nuclear membrane	
176 genes in both-protein modification	
181 genes in both-viral life cycle	
198 genes in both-extracellular space	
205 genes in both-lysosome	
210 genes in both-ECM	
215 genes in both-microtubule organizing center	
223 genes in both-lipid binding	
283 genes in both-motor activity	
304 genes in both-response to stress	
508 genes in both-Golgi apparatus	
522 genes in both-phosphatase activity	
532 genes in both-cell adhesion molecules activity	
554 genes in both-cell growth	
554 genes in both-lipid metabolism	
565 genes in both-cytoskeleton	
570 genes in both-response to abiotic stimulus	
575 genes in both-cell proliferation	
590 genes in both-cell recognition	
607 genes in both-nucleases activity	
630 genes in both-response to external stimulus	

663	genes in both-protein binding
666	genes in both-cell death
747	genes in both-structural molecule activity
774	genes in both-extracellular
808	genes in both-cell cycle
817	genes in both-protein biosynthesis
825	genes in both-DNA metabolism
899	genes in both-energy pathway
926	genes in both-cytoskeleton organization and biogenesis
975	genes in both-receptor binding
987	genes in both-protein metabolism
1048	genes in both-cell-cell signaling
1138	genes in both-cell differentiation
1317	genes in both-cytosol
1364	genes in both-kinase
1364	genes in both-protein kinase activity
1473	genes in both-host-pathogen interaction
1483	genes in both-protein transport
1637	genes in both-ion channel activity
1667	genes in both-ion transport
1774	genes in both-cell organization, biogenesis
1774	genes in both-organelle organization biogenesis
1968	genes in both-nucleotide binding
2067	genes in both-receptor activity
2067	genes in both-signal transducer activity
2108	genes in both-signal transduction
2125	genes in both-cell growth
2503	genes in both-transcription regulator activity
2906	genes in both-transferase
2947	genes in both-transcription
3435	genes in both-plasma membrane
3436	genes in both-transcription factor activity
3509	genes in both-regulation of gene expression
3509	genes in both-regulation of gene expression, epigenesis
3634	genes in both-DNA binding

FIG 14: Expressão de
gene presente em AMBAS,
Células-Tronco Epiteliais e
Mesenquimais do Cordão Umbilical

FIG 14: Expressão de
gene presente em AMBAS
, Células-Tronco Epiteliais e
Mesenquimais do Cordão Umbilical

	3845 genes in both-component unknown
	3882 genes in both-nucleus
	3930 genes in both-cell communication
	4531 genes in both-development
	6645 genes in both-metabolism
	7785 genes in both-translation factor activity, nucleic acids
	10422 genes in both-cell growth or maintenance
	10458 genes in both-cell

FIG 14: Expressão de gene presente EXCLUSIVAMENTE em Células-Tronco Epiteliais do Cordão Umbilical (UCEC) y/ apenas, únicos para (UCEC)

VOnly, Unique to UCEC	
3 genes-ECM	54 genes-nucleus
3 genes-reproduction	54 genes-signal transduction
3 genes-responses to stress	55 genes-host-pathogen interaction
4 genes-homeostasis	56 genes-cell growth
4 genes-morphogenesis	62 genes-receptor activity
8 genes-embryonic development	62 genes-signal transducer activity
8 genes-extracellular space	67 genes-DNA binding
10 genes-cytoskeleton protein binding	72 genes-regulation of gene expression, epigenesis
10 genes-protein binding	78 genes-molecular function unknown
11 genes-protein biosynthesis	81 genes-cellular component unknown
12 genes-cell proliferation	82 genes-cytoplasm
12 genes-protein metabolism	103 genes-metabolism
15 genes-cytosol	107 genes-plasma membrane
16 genes-cell death	115 genes-development
16 genes-death	119 genes-cell communication
17 genes-cytoskeleton	148 genes-RNA binding
17 genes-growth	201 genes-cell growth, maintenance
18 genes-structural molecule activity	214 genes-cell
21 genes-response to abiotic stimulus	214 genes-intracellular
22 genes-cell cycle	
22 genes-cell recognition	
23 genes-response to external stimulus	
24 genes-cell adhesion molecule activity	
25 genes-cytoskeleton organization, biogenesis	
26 genes-kinase	
26 genes-protein kinase activity	
29 genes-cell organization, biogenesis	
29 genes-cytoplasm organization, biogenesis	
29 genes-organelle organization, biogenesis	
31 genes-defense immunity protein activity	
32 genes-receptor binding	
35 genes-extracellular	
38 genes-cell-cell signaling	
39 genes-cell differentiation	
47 genes-transcription	

FIG 14: Expressão de gene presente EXCLUSIVAMENTE em Células
-Tronco Mesenquimais do Cordão Umbilical (UCMC) genes - parede de célula

Only in UCMC	
14 genes-cell wall	303 genes-cell organization, biogenesis
6 genes-translation regulator	303 genes-organelle organization, biogenesis
9 genes-physiological process	339 genes-cell differentiation
12 genes-response to endogenous stimulus	340 genes-extracellular
21 genes-response to biotic stimulus	347 genes-cell-cell signaling
23 genes-homeostasis	444 genes-host-pathogen interaction
25 genes-reproduction	539 genes-transcription regulator activity
40 genes-response to stress	599 genes-cell growth
45 genes-morphogenesis	602 genes-signal transduction
48 genes-embryonic development	604 genes-transcription
48 genes-neurotransmitter activity	681 genes-nucleus
54 genes-motor activity	702 genes-receptor activity
71 genes-protein biosynthesis	702 genes-signal transducer activity
87 genes-extracellular space	712 genes-transcription factor activity
90 genes-ECM	747 genes-DNA binding
95 genes-energy pathway	814 genes-regulation of gene expression, epigenetic
125 genes-cell death	974 genes-cellular component unknown
125 genes-death	1026 genes-plasma membrane
126 genes-structural molecule activity	1120 genes-development
133 genes-cell cycle	1139 genes-cell communication
134 genes-DNA metabolism	1657 genes-translation factor activity, nucleic acid binding
150 genes-cell proliferation	2266 genes-cell growth and maintenance
157 genes-cytoskeleton	2289 genes-cell
157 genes-response to abiotic stimulus	
164 genes-recognition	
174 genes-cytoskeleton protein binding	
174 genes-protein binding	
174 genes-response to external stimulus	
184 genes-growth	
206 genes-cell adhesion molecule activity	
221 genes-cytoskeleton organization, biogenesis	
268 genes-cytosol	
268 genes-defence immunity protein activity	
294 genes-protein kinase activity	
297 genes-receptor binding	

FIG 15

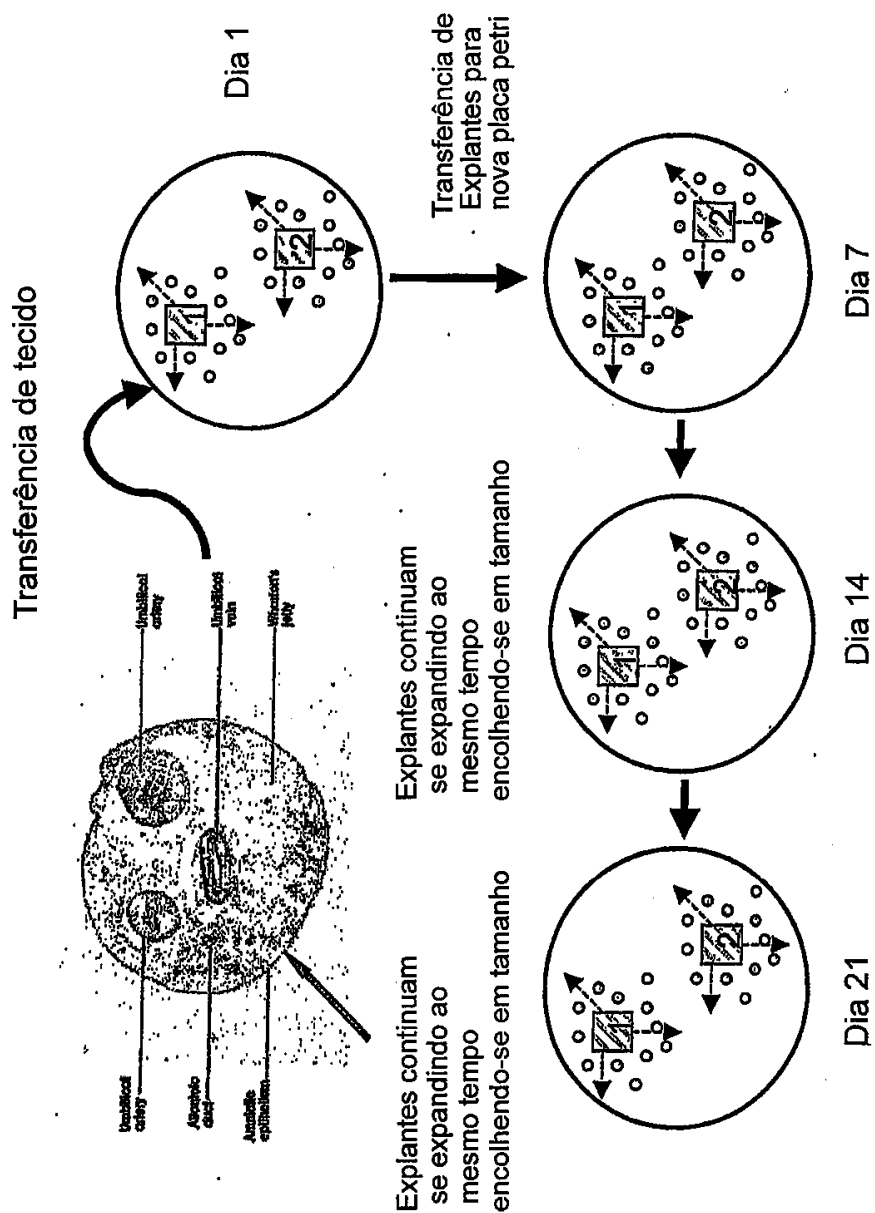


FIG 16: Histologia de cordão umbilical normal

