

Uso de Células Estaminais do Líquido Amniótico no Tratamento de Anomalias Congénitas

Mariana Filipa Garcia Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

abril de 2022

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um especial agradecimento aos meus pais, a minha maior fonte de apoio, suporte e inspiração, por terem sempre acreditado em mim mesmo quando eu não acreditei, por estarem sempre lá para mim, nos bons e nos maus momentos, simplesmente por tudo.

Agradeço ao Prof. Doutor José Moutinho pela sua disponibilidade desde o início e valiosa orientação na realização desta dissertação.

E a todos os que ao longo destes 6 anos do curso me apoiaram e tornaram esta experiência inesquecível pelos melhores motivos.

Resumo

As anomalias congénitas correspondem à quinta principal causa de morte em crianças com menos de 5 anos, em todo o mundo, representando um total de 532854 mortes em 2019. Constituem, assim, um grave problema de saúde pública a nível mundial, sendo uma importante causa de mortalidade, mobilidade e hospitalização. Apesar dos avanços na Medicina, as opções terapêuticas para o tratamento destas malformações são ainda muito limitadas, sendo necessário encontrar alternativas válidas que permitam melhorar os *outcomes* clínicos destas crianças. As células estaminais do líquido amniótico possuem um conjunto de propriedades e características únicas e incomparáveis que lhes conferem um enorme potencial terapêutico no campo da Medicina Regenerativa fetal/pediátrica, nomeadamente no que toca ao tratamento de anomalias congénitas. Recentemente, a TRASCET – *Transamniotic Stem Cell Therapy* –, por se basear no papel natural desempenhado por estas células, tem surgido como uma opção terapêutica promissora com enorme potencial no tratamento de algumas das anomalias congénitas mais frequentemente diagnosticadas, parecendo ser uma opção mais acessível, menos invasiva, custo-efetiva e eficaz.

Esta dissertação pretende então descrever o estado atual da arte no que concerne à aplicação terapêutica com células estaminais do líquido amniótico no tratamento de anomalias congénitas – TRASCET –, nomeadamente a sua aplicabilidade em algumas das anomalias congénitas mais frequentes – Mielomeningocele, incluindo a malformação de Chiari II, Gastrosquise e Hérnia Diafragmática Congénita. Foram realizadas pesquisas nas plataformas *PubMed* e *Google Scholar*, tendo por base as palavras-chave “*Stem Cells*”, “*Amniotic Fluid*”, “*Congenital Anomalies*” e “*TRASCET*”.

Concluiu-se que, de facto, a TRASCET tem impacto no tratamento destas anomalias congénitas e a evidência atual suporta a hipótese de que as células estaminais do líquido amniótico representam uma fonte promissora com enorme potencial terapêutico em diversas anomalias congénitas. Ainda que a translação dos resultados destes estudos experimentais para a clínica possa ser uma tarefa complexa, é altamente provável que os resultados que têm vindo a ser obtidos através de estudos pré-clínicos em modelos animais sejam trasladados para fetos humanos dentro de poucos anos. É imperativo aprofundar o estudo destas células e da aplicabilidade da TRASCET, quer em estudos pré-clínicos como clínicos.

Palavras-chave

Células Estaminais; Líquido Amniótico; Células Estaminais do Líquido Amniótico; Anomalias Congénitas; Terapia com Células Estaminais do Líquido Amniótico; TRASCET

Abstract

Congenital anomalies are the fifth leading cause of death in children under 5 years of age worldwide, representing a total of 532854 deaths in 2019. Thus, they constitute a grave public health problem, being an important cause of mortality, morbidity and hospitalization. Despite all the advances in Medicine, the therapeutic options for the treatment of these malformations are still very limited, and it's necessary to find valid alternatives that improve the clinical outcomes of these children. Amniotic fluid stem cells have a set of unique and incomparable properties and characteristics that give them an enormous therapeutic potential in the field of fetal/pediatric Regenerative Medicine, particularly with regard to the treatment of congenital anomalies. Recently, TRASCET – Transamniotic Stem Cell Therapy -, based on the natural role played by these cells, has emerged as a promising therapeutic option with enormous potential in the treatment of some of the most frequently diagnosed congenital anomalies, appearing to be a more accessible, less invasive, cost-effective and efficient option.

This dissertation aims to describe the current state of art regarding the therapeutic application with amniotic fluid stem cells in the treatment of congenital anomalies – TRASCET -, namely its applicability in some of the most frequent congenital anomalies – Myelomeningocele, including the Chiari Malformation type II, Gastroschisis and Diaphragmatic Congenital Hernia. Research was carried out on the PubMed and Google Scholar platforms, based on the keywords “Stem Cells”, “Amniotic Fluid”, “Congenital Anomalies” and “TRASCET”.

It was concluded that, in fact, TRASCET has an impact on the treatment of these congenital anomalies and the current evidence supports the hypothesis that amniotic fluid stem cells represent a promising source with enormous therapeutic potential in various congenital anomalies. Although translating the results of these experimental studies to the clinic can be a complex task, it's highly likely that the results that have been obtained from preclinical studies in animal models will be translated to human fetuses within a few years. It's imperative to deepen the study of these cells and the applicability of TRASCET, both in pre-clinical and clinical studies.

Keywords

Stem cells;Amniotic Fluid;Amniotic Fluid Stem Cells;Congenital Anomalies;Transamniotic Stem Cells Therapy;TRASCET

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Palavras-Chave	vi
Abstract	viii
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Acrónimos	xiii
1. Introdução	1
1.1 Líquido Amniótico	2
1.2 Células Estaminais do Líquido Amniótico	4
1.2.1 Definição e Tipos	4
1.2.2 Características Celulares	8
1.2.3 Isolamento e Cultura	9
1.2.4 Origem das CELAS	10
1.2.5 Perfil de Segurança	11
2. TRASCET	12
2.1 Aplicações Clínicas	14
3. Objetivos	15
4. Materiais e Métodos	16
5. Resultados e Discussão	17
5.1 Defeitos do Tubo Neural.....	17
5.1.1 Resultados Terrapêuticos	18
5.1.2 Discussão	21
5.2 Defeitos Diafragmáticos	27
5.2.1 Resultados Terapêuticos	28
5.2.2 Discussão	28
5.3 Defeitos da Parede	31
5.3.1 Resultados Terapêuticos	32
5.3.2 Discussão	33
6. Conclusão	38
7. Perspetivas Futuras	41
8. Bibliografia	43

Lista de Acrónimos

CEEs	Células Estaminais Embrionárias
CEHs	Células Estaminais Hematopoiéticas
CELAs	Células Estaminais do Líquido Amniótico
CEMs	Células Estaminais Mesenquimais
CEPis	Células Estaminais Pluripotentes Induzidas
CEMLAs	Células Estaminais Mesenquimais do Líquido Amniótico
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
c-kit	Recetor Tirosina Cinase kit
c-Myc	Oncogene da Mielocitomatose Celular
COX-2	Ciclo-oxigenase
CXCL12	Quimiocina C-X-C com Motivo 12
CXCR4	Recetor de quimiocinina C-X-C tipo 4
DALYS	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DAZL	<i>Deleted in Azoospermia Like</i>
DTN	Defeitos do Tubo Neural
ECMO	Oxigenação por Membrana Extracorporal
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EUROCAT	Registo Europeu de Anomalias Congénitas
FCH	Fator de Crescimento do Hepatócito
FGF	Fator de Crescimento dos Fibroblastos
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GSK3-β	Glicogénio Sintase Cinase 3 Beta
HDC	Hérnia Diafragmática Congénita
HLA	Antigénio Leucocitário Humano
HPPN	Hipertensão Pulmonar Persistente do Recém-Nascido
HTP	Hipertensão Pulmonar
IL	Interleucina
Klf4	Fator 4 do tipo Kruppel
LA	Líquido Amniótico
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MMC	Mielomeningocelo
MCP-1	Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1
Oct-4	Fator de Transcrição de Ligação ao Octamer 4
PGE ₂	Prostaglandina E2
PUM2	Homólogo 2 do Pumilio
RENAC	Registo Nacional de Anomalias Congénitas
RN	Recém-Nascido
SDF-1	Fator 1 Derivado das Células Estromais
SPC	Proteína C do Surfactante
Sox	Fator de Transcrição <i>Sex-Determining Region Y- Box</i>
SRY	<i>Sex-Determining Region Y</i>
SSEA	Antigénio de Estádio Embrionário Específico
Tgfβ-1	Fator de Crescimento Transformador beta 1
Tra-1-	Antigénio de Reconhecimento Tumoral

TRASCET	<i>Transamniotic Stem Cell Therapy</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF-A	Fator de Crescimento Endotelial Vascular A

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as anomalias congénitas definem-se como anomalias estruturais ou funcionais que ocorrem durante o desenvolvimento intrauterino e que podem ser diagnosticadas quer em período pré-natal, neonatal, ou durante a infância. (1) Algumas das mais frequentemente diagnosticadas incluem a hérnia diafragmática congénita, os defeitos da parede abdominal, como é o caso da gastrosquise, e os defeitos do tubo neural. (2)

As anomalias congénitas correspondem à quinta principal causa de morte em crianças com menos de 5 anos, em todo o mundo (3), representando um total de cerca de 532854 mortes em 2019, configurando a décima principal causa de carga global de doenças (2% DALYs), constituindo, portanto, um grave problema de saúde pública a nível mundial. (4, 5, 6, 7)

Apesar dos avanços da Medicina no que concerne ao diagnóstico e tratamento das anomalias congénitas, que permitiram uma redução ao nível da taxa de mortalidade infantil e da carga global de doença, estas continuam a ser uma grande causa de mortalidade, morbilidade e hospitalização em todo o mundo (2), sendo que em muitas das quais, as opções de tratamento são ainda muito limitadas, baseando-se principalmente no controlo sintomático e não no tratamento dos danos provocados por elas. (8, 9)

Numa tentativa de melhorar os *outcomes* clínicos destas crianças, terapias que façam uso de células estaminais do líquido amniótico têm surgido recentemente como uma opção promissora no tratamento das anomalias congénitas, quer diagnosticadas *in utero*, quer em período pós-natal, dado as suas características e propriedades incomparáveis. Baseando-se na amplificação do papel biológico natural destas células na reparação e regeneração tecidual fetal, a TRASCET – Transamniotic Stem Cell Therapy – parece ser uma opção com um elevado potencial terapêutico no campo da Medicina Regenerativa, capaz de ser uma alternativa válida na melhoria do prognóstico de crianças diagnosticadas com anomalias congénitas. (2, 8, 10, 11, 12)

1.1 Líquido Amniótico

O líquido amniótico (LA) envolve o embrião/feto durante o seu desenvolvimento uterino. Tem várias funções, nomeadamente a de proteção do feto contra traumatismos externos, a proteção do cordão umbilical, reduzindo o seu risco de compressão entre o feto e a parede uterina, a proteção do feto contra agentes patógenos infecciosos e a função de reservatório de líquidos e nutrientes, proteínas, eletrólitos, imunoglobulinas, vitaminas e fatores de crescimento necessários à embriogénese. (8,13,14)

Durante muitos anos acreditou-se que o LA era apenas composto por urina fetal e células epiteliais diferenciadas com origem na pele fetal e âmnio. Atualmente, está mais que comprovado que o LA é composto por um grupo heterogéneo de células progenitoras, incluindo progenitores hematopoiéticos CD34+, células estaminais mesenquimais (CEMs) (c-kit-) e células estaminais c-kit+. (2,13) Cada um destes tipos de células estaminais possui um conjunto de características específicas que se transladam a um potencial clínico único baseado nas suas capacidades de diferenciação, capacidade antinflamatória e outras propriedades que promovem a reparação e regeneração tecidual. (2)

O LA é composto maioritariamente por água, substâncias químicas e células (13), sendo que a sua composição e volume se vai alterando ao longo de toda a gestação, permitindo a formação de um grupo muito heterogéneo de células. (8,13) Estas células têm origem nas membranas amnióticas e tecido conjuntivo, bem como no próprio feto (pele, tratos respiratório, urinário e gastrointestinal) e o seu número tende a aumentar à medida que aumenta a idade gestacional. Podem dividir-se em três grandes grupos: células epitelioides (33,7%), células específicas do LA (60,8%) e células tipo-fibroblastos (5,5%), sendo que a sua proporção varia com a idade gestacional. (8,13,15,16) Pensa-se que as células específicas do LA tenham origem nas membranas mesenquimais fetais e no trofoblasto, as epitelioides a partir de urina e pele fetal e as tipo-fibroblastos a partir de fibroblastos da derme e tecido conjuntivo. (8,16)

Na presença de determinadas anomalias congénitas, outros tipos singulares de células estaminais podem também ser encontrados no LA, como é o caso de células neuronais, se defeitos do tubo neural, ou células peritoneais, se defeitos da parede abdominal. (10,13)

A maioria das células presentes no LA são diferenciadas e têm capacidade proliferativa limitada. No entanto, em 1990, Torricelli et al demonstraram a presença de precursores hematopoiéticos numa amostra de LA colhido antes das 12 semanas de gestação. (13,17)

Streubel et al conduziram um estudo no qual foram capazes de diferenciar células do LA em miócitos, o que sugere a presença de precursores não-hematopoiéticos no LA. Tal significa que existirão células no LA capazes de se diferenciarem e proliferarem noutras linhagens celulares - células estaminais. (13,18)

1.2 Células Estaminais do Líquido Amniótico

1.2.1 Definição e Tipos

As células estaminais caracterizam-se pela sua capacidade de autorrenovação e pluripotência. Classificam-se segundo a sua origem em células estaminais embrionárias (CEEs), células estaminais pluripotentes induzidas (CEPis) e células estaminais mesenquimais (CEMs). (9)

As CEEs possuem um potencial de diferenciação extremamente elevado, tendo a capacidade de dar origem a qualquer célula do organismo. Porém, dada esta sua característica, existe o risco de tumorigénese. Outras características contra o seu uso são a elevada imunogenicidade e a dificuldade da sua produção em massa. Todavia, as diversas questões éticas que a sua utilização coloca limitam a sua pesquisa para fins terapêuticos. (9)

As CEPis são células adultas diferenciadas às quais foi induzida laboratorialmente a capacidade de pluripotência, como forma de ultrapassar as questões éticas que restringem o uso das CEEs. Apesar de ultrapassada a questão ética, mantém-se ainda as restantes desvantagens comuns às CEEs, nomeadamente o risco de carcinogénese, a dificuldade da sua produção em massa e a elevada imunogenicidade. (9)

As CEMs podem dividir-se em CEMs adultas e CEMs fetais. As CEMs adultas possuem um potencial de diferenciação inferior às restantes células estaminais referidas anteriormente, apenas conseguindo diferenciar-se, tal como o próprio nome indica, em células mesenquimais, como as que compõem a medula óssea, o tecido adiposo e a cartilagem. Ambas as CEMs adultas e fetais não levantam questões éticas e o risco de carcinogénese é muito inferior ao das CEPis. Quando comparadas as CEMs adultas com as CEMs fetais, conclui-se que as capacidades biológicas destas últimas superam as das primeiras, uma vez que as CEMs fetais têm um rácio de crescimento superior, os seus telómeros são mais compridos (9) (dado expressarem a transcriptase reversa telomerase, que é um marcador de pluripotência), o que lhes permite evitar o encurtamento do cromossoma até 250 replicações, superando largamente o limite definido por Hayflick (2) – células humanas normais conseguem replicar-se entre 40 a 60 vezes antes de entrarem em senescência (19) -, conferindo-lhes esta característica, então, uma enorme capacidade regenerativa. O seu potencial de diferenciação também é superior, estando no intermédio do das CEMs adultas e do das CEEs. (2,9,16)

Uma das fontes destas CEMs é o LA. Cerca de 1% das células do LA são CEMs com origem no próprio feto – células estaminais mesenquimais do LA (CEMLAs). (9)

As CEMLas são uma população de células plástico-aderentes c-kit-, CD34-, CD45-, CD124-, CD73+, CD90+, CD105+ e CD166+. Alguns investigadores demonstraram uma maior plasticidade das CEMLas, comparativamente às CEMs da medula óssea, e a expressão de marcadores de superfície que conferem pluripotência, expressos igualmente nas CEEs, como o Oct-4, SSEA4 e Nanog, embora em quantidades menores na maioria dos casos. (2,16)

A expressão dos marcadores de superfície pluripotentes é variável, devido à sua natureza policlonal, e tende a diminuir ao longo da gestação e quanto mais tempo estiverem em cultura. As CEMs são maioritariamente conhecidas pelo seu papel imunomodulador em processos inflamatórios e no curso de diversas doenças. Apesar do mecanismo das CEMs *in vivo* não estar completamente esclarecido, sabe-se que as CEMLas, comparativamente com as CEMs da medula óssea e da placenta, inibem a proliferação de linfócitos T, reduzem o número de linfócitos T de memória, aumentam os linfócitos T reguladores, polarizam os linfócitos Th2, fazendo simultaneamente aumentar os níveis de IL-10 e IL-4. Colocou-se a hipótese de que as CEMLas têm um papel parácrino importantíssimo na resposta imune na interface materno-fetal devido à expressão de CD59, HLA-G, entre outros. (2)

Para além das CEMLas, também já foram descritas outras células estaminais no LA, as CD117+ (c-kit+). Este subtipo de células estaminais do LA foi descrito pela primeira vez por De Coppi et al (2,20) e expressa o mesmo painel de marcadores fenotípicos que as CEMLas, incluindo marcadores de pluripotência, expressos igualmente nas CEEs, como o Oct-4, SSEA4, Nanog e Sox-2, correspondendo a cerca de 1% de todas as células no LA. (2,8,13,16)

As CEMLas conseguem-se diferenciar em, como o próprio nome indica, células mesenquimais, como adipócitos, osteócitos e condrócitos. As CD117+, para além de serem capazes de se diferenciarem em linhagens celulares com origem na mesoderme (osso, tecido adiposo, cartilagem, músculo, tecido hematopoiético), são também capazes de se diferenciarem em linhagens celulares com origem na endo- e ectoderme (linhagens celulares endotelial, hepática e neuronal), possuindo assim um potencial de diferenciação superior ao das CEMs com origem quer no LA, quer na medula óssea. (2,9,13,16)

Uma característica que dificulta o uso das c-kit⁺ é a sua raridade. Contrariamente às CEMLAs, que se encontram em maior número no LA e que podem ser obtidas até ao final da gravidez, as c-kit⁺ representam apenas cerca de 1% de todos os subtipos celulares no LA e não podem ser isoladas com segurança a partir de amostras de LA colhidas no final do segundo e terceiro trimestres de gravidez, que correspondem aos períodos onde mais anomalias congénitas são detetadas por ecografia gestacional. Para além disso, os métodos de isolamento são mais diligentes, mais demorados e mais caros, pelo que, por todas estas razões, se opte por usar as c-kit⁺ apenas como uma alternativa *off-the-shelf* para o transplante autólogo de células estaminais. (2)

Quanto ao seu potencial de diferenciação, como já foi referido, as células estaminais do LA (CELAs), classificação que inclui ambas as CEMLAs e as CD117⁺, são capazes de se diferenciar em diversos tipos de células mesenquimais, como osteócitos, condrócitos e adipócitos, bem como se conseguem diferenciar em células não-mesenquimais, como é o caso de cardiomiócitos, células neuronais e hepatócitos, ou seja, têm a capacidade de se diferenciarem em células de todas as camadas germinativas embrionárias. (2,9,13,16)

Adicionalmente, a imunogenicidade das CELAs é extremamente reduzida (9), o que faz com que a sua possível rejeição pelo organismo seja muito pouco provável.

Para além disso, as CELAs possuem propriedades imunomoduladoras especiais, comparativamente às CEMs adultas, que lhes permitem controlar infeções. (9)

As CELAs podem ser obtidas através da realização de amniocentese entre as 15-20 semanas de gestação (21) e consegue-se facilmente obter um grande número de células a partir de uma pequena amostra sem interferir com o cariótipo fetal. (9,16) Para exemplificar, bastam apenas 3-5mL de toda a amostra de LA colhida via amniocentese para se obterem centenas de milhões de CELAs em 3-4 semanas de cultura. (10)

A comparação direta entre culturas de CELAs colhidas por amniocentese estratificadas por idade materna não revelou quaisquer diferenças estatísticas no sucesso das culturas nem na pureza da amostra. Apesar de a idade materna avançada poder ser considerada um fator que diminui a qualidade do LA, a verdade é que os estudos não demonstram um grande prejuízo na qualidade das culturas das CELAs. Porém, estudos recentes detetaram ligeiras diferenças na sinalização parácrina das CELAs humanas com diferentes idades gestacionais. (22)

Para além de tudo o que já foi referido, Kunisaki et al. demonstraram no seu estudo que as CEMLAs se conseguem proliferar duas vezes mais rápido em cultura do que as

CEMs com origem na medula óssea ou no cordão umbilical, com o mesmo fenótipo, e sob condições de cultura *in vitro* semelhantes. Tal cinética proliferativa, associada à demonstração de padrões únicos de deposição da matriz extracelular, comparativamente com outras CEMs *in vitro*, parecem ser de particular importância na reparação e regeneração tecidulares. (23,24) Adicionalmente, está comprovado que a capacidade imunossupressora das CELAs é bastante superior à das células estaminais com origem no cordão umbilical, como medido pela expressão de PGE₂. (22)

O uso de CELAs parece, então, ser uma escolha lógica e prática para o tratamento de crianças com anomalias congénitas, já que não é necessário esperar até ao parto para colher uma amostra de LA. (2) Basta realizar uma amniocentese pelas 15-20 semanas de gestação e colher cerca de 2-5mL de LA e, dado que este procedimento está medicamente indicado como parte do rastreio pré-natal do segundo trimestre para muitas grávidas para exclusão de aneuploidias, não existe risco aumentado de morbilidade por colheita adicional de LA para potencial benefício terapêutico. (2,13,21) A amniocentese é um procedimento relativamente seguro, com uma taxa de aborto espontâneo inferior a 1% quando ecoguiada e realizada por um profissional experiente. (2,21) Contrariamente, a colheita pré-natal de células estaminais da placenta, vilosidades coriônicas, cordão umbilical, fígado, pele ou medula óssea são tecnicamente mais exigentes e associados a um maior risco de aborto espontâneo, infeção, hemorragia e outras complicações. (2,23)

De salientar que a colheita das CELAs está isenta de questões éticas, uma vez que não há manipulação nem destruição de embriões humanos. (16)

As CELAs têm origem genética fetal (2,13), o que permite a sua aplicação terapêutica autóloga, sem risco de rejeição após transplante, quer em período pré-natal, quer em período pós-natal precoce. (2) Estudos comprovam que as CELAs do segundo e terceiro trimestre se conseguem proliferar mais rapidamente em cultura, comparativamente a células somáticas pós-natais, o que permite que mal sejam diagnosticadas anomalias congénitas durante o diagnóstico pré-natal, as CELAs colhidas possam-se multiplicar rapidamente, prontas para serem usadas em terapias autólogas em período perinatal. (2)

Prusa et al foram os primeiros a demonstrar a expressão de Oct-4 pelas células estaminais do LA. (13,25) Cerca de 90% de todas as CELAs expressam este fator de transcrição que confere pluripotência, que é igualmente expresso noutras células estaminais de origem embrionária, nomeadamente nas CEEs, células germinativas embrionárias e nas células carcinogénicas embrionárias. (16) Karlmark et al demonstraram que algumas destas células eram capazes de ativar os promotores de Oct-4 e Rex-1. (13,26)

O facto de não possuírem uma verdadeira pluripotência embrionária, como as CEEs impede que estas, ao serem transplantadas, originem teratomas. Para além desta característica, o facto de não levantarem questões éticas, o seu fenótipo multipotente, a capacidade em se diferenciarem em diversas linhagens celulares e a facilidade na sua obtenção fazem das CELAs as candidatas ideais para o campo da Medicina Regenerativa no que toca ao tratamento de anomalias congénitas. (2,13, 16)

1.2.2 Características Celulares

Pensa-se que as CELAs do primeiro trimestre possuam um fenótipo mais primitivo, já que partilham 82% do transcriptoma com as CEEs. (13)

Elas são uma população muito heterogénea, com distribuição bimodal no que toca ao tamanho– varia de 8 a 15 μm , com uma média de 12 $\mu\text{m} \pm 0,3 \mu\text{m}$. As células de menor tamanho tendem a crescer em colónias e expressam os fatores de transcrição Oct-4, c-Myc, Sox-2, Nanog, expressam os antigénios SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81 e expressam também fosfatase alcalina. As células de maior tamanho são, contrariamente às mais pequenas, SSEA3 negativas, possuem uma morfologia fibroblástica e não expressam nenhum dos marcadores de superfície nem fatores de transcrição típicos das CEEs, que lhes conferem pluripotência. Apesar de ainda não se ter chegado à conclusão acerca de qual a sua função específica, pensa-se que elas têm um papel acessório apoiando o crescimento das CELAs SSEA3+. (13)

As CELAs apresentam igualmente heterogeneidade no que toca à sua forma, com células fusiformes e redondas, cada uma possuindo propriedades distintas, com as CELAs fusiformes a possuírem maiores capacidades neuroprotetoras, conforme evidenciado pela sua análise imunohistoquímica. Especificamente, as CELAs fusiformes expressam na sua superfície os marcadores celulares CD117, CD73, CD90 e CD105, enquanto que as CELAs redondas não expressam CD90 nem CD105. Além dos marcadores CD117 e CD73, a presença de CD90 e CD105 está associada a um potencial de proteção cerebral fetal superior, medido pela redução do tamanho da lesão cerebral após a injeção de CELAs em modelos animais de encefalopatia hipóxico-isquémica. (22)

A origem fetal das CELAs do primeiro trimestre foi confirmada em amostras fetais masculinas através da presença do gene SYR. (13)

As CELAs CD117+ SSEA3+, partilham características semelhantes às células germinativas primitivas, expressando c-kit, FGF-8, Sox17, STELLA, DAZL, NANOS, VASA, SSEA1, FRAGILIS, PUM2, o que suporta a teoria de que as CELAs terão origem nas células germinativas primitivas. (13)

Para além dos marcadores de pluripotência, as CELAs do primeiro trimestre também expressam na sua superfície vários marcadores mesenquimais, nomeadamente, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166. (13, 16) As CELAs do primeiro trimestre possuem uma baixa imunogenicidade, dado o HLA de classe I e de classe II ser muito baixo ou mesmo negativo, o que permite que estas células sejam capazes de formar corpos embrioides, mas sem o risco de formação de teratomas. (13)

As CELAs do segundo e terceiro trimestres expressam Oct-4, mas não Nanog nem Klf4. Apesar de serem SSEA4+, não expressam SSEA3, Tra-1-60, Tra-1-81 nem fosfatase alcalina. Expressam igualmente um número elevado de marcadores mesenquimais na sua superfície, nomeadamente CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CxCR4, CD146, CD166, CD184 e SDF-1. HLA de classe 1 é expresso em pequenas quantidades, mas o HLA de classe 2 está ausente. (13) As CELAs do segundo trimestre podem diferenciar-se em células de qualquer uma das três camadas germinativas embrionárias. (13,16) Contudo, estudos demonstram que não são capazes de formar corpos embrioides, a não ser que sejam expostas a condições de cultura de CEEs, e não dão origem a teratomas quando injetadas em ratos imunocomprometidos. Estas observações sugerem que as CELAs do segundo e terceiro trimestres tendem a diferenciarem-se mais em linhagens celulares com origem na mesoderme, mas que mantêm alguma plasticidade, semelhante à das CEEs, e amplas características multipotentes, quando comparadas com as CELAs do primeiro trimestre. De modo semelhante às CELAs do primeiro trimestre, também têm origem fetal, dado expressarem o gene SYR, e expressam marcadores migratórios das células germinativas primitivas, embora em níveis inferiores, o que mais uma vez reforça a teoria anterior de que as CELAs têm origem nestas células germinativas primitivas. (13)

1.2.3 Isolamento e cultura

As CELAs podem ser isoladas a partir de amostras de LA em qualquer altura da gravidez (8): 1) durante o segundo trimestre, através da amniocentese (13) – procedimento invasivo de diagnóstico pré-natal que consiste na colheita de uma pequena amostra de LA através da punção da bolsa amniótica, orientado por ecografia (16, 27) entre as 15 e as 20

semanas de gestação (21) -, que corresponde ao método preferencial de colheita de LA; 2) durante o terceiro trimestre, através de amniorredução (13) - consiste na aspiração de um determinado volume de LA (cerca de 1-5mL) com o objetivo de prolongar a gestação em casos de grávidas com diagnóstico de polihidrâmnios grave, que apresentem sintomas como dor de difícil controlo ou dificuldade respiratória, por grande distensão uterina, e que pode ser feita a partir das 28 semanas (28); 3) durante cesariana. (13)

Todavia, pensa-se que as CELAs isoladas no primeiro trimestre serão mais primitivas (partilham 82% do transcriptoma com as CEEs, com maior probabilidade de terem origem germinativa). Contudo, elas não estão acessíveis para uso autólogo. (13) Mas, as do segundo e terceiro trimestres ainda manterão características terapêuticas importantes. (8,13)

A separação das CELAs c-kit+ das CEMLAs numa mesma cultura pode ser conseguida através de diversos protocolos, incluindo a imunoseleção c-kit, ou colocando a amostra de LA num meio de cultura que estimule a proliferação de apenas uma das duas subpopulações de células. Como há estudos que comprovaram a existência de padrões anormais de diferenciação e de reações imunitárias pouco características nas células isoladas através do protocolo de imunoseleção c-kit, protocolos que não usem esta técnica de separação são preferíveis para serem usados na prática clínica. (13,16)

De destacar, que quer as CELAs de roedores, quer as CELAs humanas colhidas mantém a sua pluripotência após cultura. (22)

1.2.4 Origem das CELAs

A sua origem não está completamente esclarecida. É possível que tenham origem nos tecidos extra-embriónicos, como a placenta, e posteriormente migrariam daí para o LA. (13)

Todavia, as que expressam c-kit, poderão ter a sua origem nas células germinativas primitivas fetais, na crista neural e/ou células estaminais hematopoiéticas, uma vez que todas estas expressam este recetor tirosina cinase durante o desenvolvimento embrionário e fetal. (13,16)

A origem fetal das CELAs do primeiro trimestre foi confirmada em amostras fetais masculinas através da presença do gene SRY. (13)

Pensa-se que as CELAs terão origem nas membranas mesenquimais fetais e no trofoblasto. Esta origem trofoblástica é suportada pelo facto de as CELAs produzirem gonadotrofina coriónica humana, progesterona e estrogénio. (8,16)

Também se pensa que poderão existir diferenças ao nível do LA e da sua composição entre diferentes espécies. (13) Um exemplo disso, seria o facto de nos ratos haver a persistência do saco vitelino (13), ao contrário do que acontece nos humanos, em que este desaparece no final do primeiro trimestre (26), o que poderia influenciar a composição do líquido amniótico, pelo que os dados obtidos através do uso de CELAs com origem em ratos teriam de ser confirmados primeiro com CELAs de origem humana antes do seu uso clínico. (13)

1.2.5 Perfil de Segurança

Não foram reportados casos de desenvolvimento de teratomas após injeção das CELAs em ratos imunocomprometidos em estudos pré-clínicos. O grupo de Guillot testou o potencial carcinogénico das CELAs e concluiu que apenas se formavam teratomas após uma reprogramação das CELAs em CEPis. (13, 30) Já se sabe que isto é válido quer para as CELAs de roedores como para as humanas. (13)

Pensa-se que as CELAs serão mais seguras do que usar células estaminais pós-natais, uma vez que as CEMs adultas se ficarem em cultura durante um longo período de tempo começam a apresentar erros na estabilidade genética e na sua capacidade de diferenciação, provavelmente por anomalias epigenéticas. Nos estudos feitos com as CELAs não se observaram alterações a nível epigenético, pelo que se pode assumir que a sua cultura *in vitro* é segura para uso clínico. (13)

2. TRASCET

A TRASCET – *Transamniotic Stem Cell Therapy* – é um conceito terapêutico relativamente recente, visto só a partir de 2014 haver registo de investigações translacionais, sendo que até ao presente momento não decorreram nem estão a decorrer quaisquer ensaios clínicos. (10)

A TRASCET baseia-se no papel natural desempenhado por populações específicas de células estaminais presentes naturalmente no LA ou no contexto de determinadas anomalias congénitas. (10)

Do ponto de vista translacional, as CEMLAs são as células estaminais mais vantajosas para a TRASCET (10,23), uma vez que são usadas no seu ambiente nativo, preferencialmente de forma autóloga, são obtidas de forma rápida e através do método menos invasivo de todos os métodos de recolha de células fetais - amniocentese – que pode, inclusive, estar já indicada para o diagnóstico de anomalias congénitas. (10)

São amplamente conhecidas as características anti-inflamatórias e imunomoduladoras das CEMs, existindo diversos estudos pré-clínicos e mesmo clínicos que comprovam o benefício das CEMs de diversas origens na reparação e regeneração tecidual num elevado número de patologias. (31,32) Porém, os mecanismos por detrás da capacidade regenerativa e anti-inflamatória, bem como os mecanismos de migração mantêm-se ainda por determinar totalmente. (10,31)

A TRASCET baseia-se então na injeção de CEMLAs na bolsa amniótica, amplificando desta forma o papel biológico destas células na reparação tecidual fetal normal, visando benefício terapêutico através de uma abordagem minimamente invasiva de administração das células ao feto. (11,12,33,34,35) É expectável que nos próximos anos sejam desenvolvidos estudos que descrevam a presença de outros tipos de células estaminais no LA específicos da anomalia congénita diagnosticada, bem como o seu potencial em futuras terapias autólogas. (10)

Muito ainda falta esclarecer acerca dos mecanismos que regulam o tráfego e o papel na reparação e regeneração tecidulares e na inflamação e, conseqüentemente, ainda muito pouca informação se tem acerca da TRASCET. (10)

O raciocínio por detrás do uso da TRASCET no tratamento de anomalias congénitas cujo defeito se encontra diretamente exposto ao LA baseia-se na ideia de que as CEMLas utilizadas na TRASCET, após a sua injeção intraamniótica, migrariam diretamente da bolsa amniótica para o local da lesão. (10) Pensava-se que este seria o único mecanismo de tráfego celular implicado na TRASCET, mas recentemente demonstrou-se que o trajeto via circulação sanguínea é um componente essencial desta opção terapêutica. As células migrariam para a placenta e a partir daí alcançariam a circulação quer fetal quer materna, incluindo a medula óssea fetal e mesmo locais de lesão materna. (10,34,36,37,38) Este achado permite que anomalias congénitas que não estejam diretamente expostas ao LA possam beneficiar desta opção terapêutica, como é o caso da hérnia diagramática congénita. (36) O facto de as CEMLas se dirigirem para a medula óssea fetal é de grande importância, uma vez que, tal como acontece com as CEMs da medula óssea em período pós-natal, elas conseguem atingir qualquer área/zona do feto. Tal característica expande em muito o potencial terapêutico da TRASCET. (10)

Diversos estudos que avaliam a migração das CEMLas após a TRASCET têm verificado que os padrões migratórios variam de forma significativa, dependendo da existência ou não de uma anomalia congénita, bem como da anomalia em questão. Mas há um denominador em comum em todos esses estudos, que é a placenta. Ela parece ser o centro de onde partem todas as possíveis trajetórias migratórias das CEMLas administradas, funcionando como uma porta de entrada entre a bolsa amniótica e as circulações fetal e materna. (34,35) Tal só vem apoiar ainda mais a necessidade da realização de estudos que permitam compreender qual o destino a longo prazo das CEMLas, incluindo o seu destino pós-natal. Tracy et al demonstraram a existência de migração transmembranar entre as membranas gestacionais e a placenta, que não depende do gradiente de estímulos quimiotáticos ou nutricionais. Perto do termo, observaram que o sentido desta migração tanto se fazia do âmnio – córion - placenta como vice-versa. Tal é sugestivo da hipótese de o tráfego das CEMs ser um componente normal do parto e, possivelmente, um componente anormal do parto pré-termo. (34) Sabe-se que as CEMs expressam na sua superfície moléculas de adesão que facilitam a transmigração através de barreiras endoteliais, permitindo a migração entre as circulações fetal e materna. É de especular que de forma comparável as CEMs consigam migrar através das membranas gestacionais e da placenta. (35)

No estudo de Tracy et al em ratos Lewis saudáveis, não foram detetadas CEMLas em nenhum local do neonato. Apenas ao 16º dia do período pós-natal foram identificadas. Muito possivelmente, em estudos com fetos com anomalias congénitas esses resultados

serão diferentes. No entanto, tais resultados apoiam a possibilidade da TRASCET poder ser aprovada para ensaios clínicos. (34) Permanece ainda por determinar qual o período de viabilidade das CEMLAs que migram para os locais de lesão materna. (10)

Muito recentemente, a TRASCET tem então surgido experimentalmente como um novo paradigma no tratamento pré-natal de diversas anomalias congénitas. (11,12,32,33,39)

2.1 Aplicações Clínicas

A base biológica, o *timing*, a praticabilidade, a acessibilidade e a ausência de questões éticas relacionadas com o uso das CEMLAs suportam a perspectiva de que a TRASCET poderá ter um grande impacto no tratamento perinatal de uma grande variedade de anomalias congénitas. Dado este ser um conceito tão recente, ainda muito pouca informação plausível existe acerca da sua aplicabilidade clínica, apenas existindo alguns estudos pré-clínicos a avaliar a sua potencialidade terapêutica em algumas anomalias congénitas, como é o caso do mielomeningocele, da gastrosquise e da hérnia diafragmática congénita. (9,10,22)

3. Objetivos

Com esta revisão descritiva da literatura pretende-se descrever o estado atual da arte no que concerne à aplicação terapêutica com células estaminais do líquido amniótico no tratamento de anomalias congénitas – TRASCET -, nomeadamente à sua aplicabilidade nos defeitos do tubo neural – mielomeningocele, incluindo a malformação de Chiari II, nos defeitos da parede - gastrosquise e nos defeitos diafragmáticos - hérnia diafragmática congénita.

4. Material e Métodos

A presente dissertação foi redigida após recolha e seleção criteriosa da informação de artigos científicos e de estudos publicados em revistas médicas indexadas.

A pesquisa bibliográfica foi efetuada na língua inglesa nas plataformas digitais *PubMed* e *Google Scholar*, tendo por base as palavras-chave “*Stem Cells*”, “*Amniotic Fluid*”, “*Congenital Anomalies*” e “*TRASCET*”, tendo sido selecionados artigos publicados entre 2015 e 2022. Foram incluídos também alguns artigos anteriores ao ano de 2015, correspondentes a algumas referências bibliográficas dos artigos selecionados, por conterem dados importantes relativos às características das células estaminais do líquido amniótico e resultados de estudos experimentais que avaliam as aplicabilidades terapêuticas destas mesmas células.

Os dados epidemiológicos foram retirados da Organização Mundial da Saúde, do *Our World In Data*, do EUROCAT - Registo Europeu de Anomalias Congénitas, e do RENAC - Registo Nacional de Anomalias Congénitas em Portugal.

5. Resultados e Discussão

5.1 Defeitos do Tubo Neural

Os Defeitos do Tubo Neural (DTN) resultam de uma falha no encerramento do tubo neural até ao vigésimo oitavo dia do desenvolvimento embrionário (10,23) e constituem uma das anomalias congénitas mais frequentes. (10) O encerramento incompleto leva à exposição ambiental do neuroepitélio e, conseqüentemente, à sua degeneração e ao défice neuronal. (40)

São multifatoriais, contribuindo tanto para o seu desenvolvimento fatores genéticos como fatores ambientais, como a deficiência de ácido fólico. (10,23) Está descrito que a suplementação de, pelo menos, 0,4mg de ácido fólico antes da conceção e durante o primeiro trimestre de gravidez reduz o risco de DTN em 70%. Contudo, Portugal ainda regista uma incidência de 2.36 por cada 10000 nascimentos, segundo dados de 2016-2017. (41) Os dados mais recentes revelam que, na Europa, o número total de casos registados com DTN foi de 11.61 casos por cada 10000 nascimentos, sendo que desses, 5.32 correspondiam a espinha bífida. (42)

A espinha bífida é o tipo de DTN compatível com a vida mais frequente. (10,23) A forma mais comum, mas também a mais grave, é o mielomeningocele (MMC), que resulta da ausência do encerramento dos arcos posteriores da coluna vertebral, com conseqüente protusão medular e das meninges. (10,43,44)

É grande causa de morbidade, uma vez que leva à perda das funções sensoriomotoras das extremidades inferiores, deformações do esqueleto, incontinência urinária e fecal, cardiomegalia, hidrocefalia e malformação de Chiari II. (2,8,22,45) O não encerramento do tubo neural leva à exposição da medula espinhal ao ambiente intrauterino (primeiro *hit*). A medula espinhal fica então exposta a trauma químico e mecânico pela exposição ao LA, o que leva à sua destruição *in útero* (segundo *hit*), com conseqüente lesão neurológica irreversível. É este segundo *hit* o mecanismo clinicamente mais relevante para a lesão neurológica. (8,10,12,23,45)

Até à data, o tratamento *standard* do MMC corresponde ao encerramento cirúrgico pós-natal, que pretende prevenir danos adicionais ao sistema nervoso central, mas não permite reparar a lesão neurológica já presente. (2,23)

Teoricamente, intervenções *in utero* poderiam prevenir o trauma provocado pela exposição da medula espinhal ao LA (segundo *hit*), mas não o primeiro *hit*. (8,45) Um ensaio clínico randomizado prospetivo acerca do tratamento cirúrgico do MMC – *Management of Myelomeningocele Study*- demonstrou que a cirurgia pré-natal feita antes da 26^o semana de gestação (mas nunca antes da segunda metade do segundo trimestre de gestação, o que já é relativamente tarde no processo fisiopatológico dos DTN), apesar de não ser curativa, pode melhorar o *outcome* fetal, comparativamente com a cirurgia pós-natal. Contudo, não está indicada na maioria dos casos, nem é isenta de riscos, quer para o feto, quer para a mãe, sendo o risco de parto pré-termo a complicação mais evidente. (8,10,12,22,23,45,46) Conclui-se, então, que os benefícios tanto da cirurgia pré-natal como da pós-natal são ainda bastante modestos, existindo, por isso, necessidade de encontrar uma alternativa prática e inovadora, capaz de ser realizada no início da gestação, acessível a todos, minimamente invasiva e que permita um melhor *outcome* clínico. (8,10,12,22,23,46) A TRASCET pode ser uma opção já que parece ir ao encontro desses mesmos requisitos. (10,39,45)

5.1.1 Resultados Terapêuticos

Diogini et al administraram a ratos Sprague-Dawley fêmea durante a gestação ácido retinóico, de forma a induzir MMC. Ao 17^o dia de gestação, transferiram CEMLAs de ratos da mesma espécie, colhidas ao 21^o dia de gestação, para a bolsa amniótica. Tal resultou num *coverage* parcial ou completo do defeito, por uma pele rudimentar, com escassez de anexos na análise histológica. (9,12,23) 29% apresentavam um *coverage* completo da lesão, com isolamento total da medula espinhal exposta ao LA. (23) A análise imunohistoquímica permitiu identificar, em 83% dos fetos tratados com TRASCET, CEMLAs administradas, organizadas em *clusters*, sugestivos de clonalidade, preferencialmente localizados nas estruturas ósseas próximas do defeito. Algumas foram identificadas ainda no tecido subcutâneo e, muito escassamente, no tecido neuronal. As CEMLAs pareciam ser menos abundantes nos defeitos com *coverage* completa do que nos com parcial, apesar de tal não ter sido possível quantificar. (23)

No estudo conduzido por Abe et al, foram criados laboratorialmente modelos de MMC através da exposição de ratos Sprague-Dawley fêmea em período gestacional a ácido retinóico. Posteriormente, injetou-se, em cada bolsa amniótica, CELAs CD117+ humanas, ao 17^o dia de gestação, provenientes de mulheres grávidas, recolhidas por amniocentese entre as 15-17 semanas de gestação. As CELAs injetadas na bolsa amniótica de modelos de

fetos de ratos com MMC demonstraram ter especial afinidade pela medula espinhal exposta, reduzindo a lesão neural, através da redução da neurodegeneração e astrogliose, e promovendo a regeneração neuronal. Este estudo provou que as CELAs atuavam através de dois mecanismos distintos – *coverage* direto do defeito e secreção do fator de crescimento do hepatócito (FCH). As dimensões crânio-caudal e lateral bem como a área do MMC, comparativamente com o grupo que não recebeu o tratamento com as CELAs, foram reduzidas significativamente. A análise histológica dos diferentes cortes seccionais transversais da medula espinhal revelou um aumento destas secções, comparativamente ao grupo que não recebeu o tratamento com as CELAs. Estes resultados indicam que as CELAs promovem o *coverage* do MMC e protegem a medula espinhal exposta. Nos diferentes cortes da medula espinhal tingiu-se com coloração específica a Tubulina- β III, um marcador precoce de neurogênese, para avaliação da lesão neuronal, tendo-se verificado um aumento significativo deste marcador após o tratamento com as CELAs. Para além da Tubulina- β III, também foi tingido GFAP, de forma a investigar a presença de astrogliose. O que se verificou foi uma diminuição do rácio de áreas GFAP positivas/áreas Tubulina- β III positivas após o tratamento com as CELAs. Estes resultados sugerem que as CELAs reduzem a astrogliose e induzem a neurogênese no local da lesão, protegendo, assim, as células neuronais. Foi analisada a expressão de diversos marcadores inflamatórios, uma vez que a inflamação causada pela exposição da medula espinhal a trauma químico e mecânico por parte do LA se trata do mecanismo responsável pelo segundo *hit*. A exposição ao ácido retinóico aumentou significativamente os níveis de MCP-1, de IL-6, de TNF- α e de COX-2, sendo que esta resposta inflamatória seria atenuada com o tratamento com CELAs, especialmente os níveis de MCP-1 e COX-2. (45) Estudos prévios sugerem a hipótese de que a expressão de Tubulina- β III na camada muscular da bexiga está diminuída após exposição ao ácido retinóico. (45,47,48) No estudo de Abe et al, verificou-se que após o tratamento com as CELAs, os níveis de Tubulina- β III nas fibras nervosas vesicais aumentaram. (45) Este resultado sugere que a TRASCET reduz o dano neuronal na camada muscular da bexiga (45), atendendo-se ao facto de que a disfunção vesical é uma das complicações do MMC. Os autores verificaram, após a injeção das CELAs nas bolsas amnióticas, o aparecimento de uma camada de pele rudimentar a cobrir o defeito. Também verificaram que a expressão de CXCL12 se encontrava ligeiramente aumentada na superfície da medula espinhal exposta após a indução fetal de MMC e marcadamente aumentada após o tratamento com as CELAs. Isto sugere que as CELAs se acumulam no local de lesão através da via sinalizadora CXCL12, que é produzido sobretudo por estas células estaminais que migraram para o local do defeito. Também se verificou que algumas das CELAs que se acumularam no local de lesão eram positivas para os marcadores STEM121 e citoqueratina (um dos principais

componentes da epiderme), enquanto outras eram apenas positivas para STEM121. Para além disso, os níveis de FCH encontravam-se significativamente aumentados após a TRASCET, sendo que a análise por imunofluorescência revelou que algumas das CELAs eram positivas para STEM121 e FCH. Adicionalmente, verificou-se também que no grupo tratado com CELAs existia uma sobreexpressão do recetor fosforilado do FCH – p-Met. Estes dados sugerem que algumas das CELAs injetadas nas bolsas amnióticas se diferenciam diretamente em células neopiteliais, que cobrem o defeito, protegendo a medula espinhal do segundo *hit*, enquanto outras CELAs permanecem indiferenciadas e produzem FCH, que contribui para a supressão da inflamação e promove a proteção e a regeneração neuronal. Concluiu-se também que nem todas as CELAs injetadas nas bolsas amnióticas migraram para o local de lesão. Estas células foram colhidas no 21º dia de gestação e analisadas, revelando, as do grupo tratado com TRASCET, quer positividade quer negatividade para o marcador STEM121, e as do grupo de controlo, apenas negatividade para este marcador. Praticamente todas as CELAs CD117+ obtidas entre os dias 19º e 21º de gestação expressavam o marcador STEM121, sugestivo de que estas células teriam origem nas CELAs injetadas ao 17º dia de gestação. Analisaram-se igualmente os níveis de FCH ao 17º dia de gestação (antes da injeção das CELAs), ao 19º dia (48 horas após a injeção) e ao 21º dia (96 horas após a injeção), tendo se verificado que os níveis deste mediador parácrino aumentaram significativamente após a TRASCET, de uma forma tempo-dependente. Estes dados sugerem que as CELAs injetadas nas bolsas amnióticas ao 17º dia de gestação se integraram no LA dos roedores e produziram FCH. (45)

Shieh et al testaram a eficácia da TRASCET em modelos de espinha bífida em coelhos New Zealand criados cirurgicamente ao 22º/23º dia de gestação, através de uma laminectomia lombar que expôs a medula espinhal. Em seguida, foram administradas CEMLas de coelhos da mesma espécie através injeções intraplasmáticas nas bolsas amnióticas, com uma concentração de CEMLas 60 vezes superior à administrada nos estudos experimentais em modelos roedores. Constatou-se que, dos sobreviventes com espinha bífida, uma percentagem significativa (50%) apresentava um *coverage* parcial da lesão, comparativamente aos grupos não tratados com TRASCET. Esse *coverage* consistia, semelhante ao estudo de Diogini et al, numa nova camada de pele rudimentar, com escassez/ausência de anexos, que se começava a formar a partir das extremidades do defeito. Técnicas de imunohistoquímica permitiram identificar as CEMLas injetadas dispersas e não contidas na camada de pele formada. (12)

Dionigi et al analisaram o impacto na TRASCET na malformação de Chiari-II, quase sempre universalmente associada ao MMC. Ao 17º dia de gestação, foram administradas injeções intraamnióticas de CEMLAs de ratos da mesma espécie (colhidas 21º dia de gestação) em modelos de espinha bífida criados em laboratório, através da exposição de ratos Sprague-Dawley fêmea a ácido retinóico. Como já era expectável, pelo estudo anterior de Diogini et al, verificou-se um *coverage* parcial/total do defeito apenas no grupo tratado com TRASCET, com as mesmas características histológicas verificadas no estudo prévio realizado por este grupo, bem como uma organização das CEMLAs injetadas em *clusters*, localizadas preferencialmente nas estruturas ósseas próximas do defeito. A análise imunohistoquímica permitiu identificar as CEMLAs injetadas em 71% dos fetos tratados com TRASCET. Relativamente ao deslocamento do tronco cefálico, verificaram-se diferenças significativas entre o grupo tratado com TRASCET e o não tratado, com o grupo não tratado a apresentar um maior deslocamento caudal. Igualmente, também se verificaram diferenças ao nível do deslocamento do cerebelo, apesar de mais discretas, com o grupo não tratado com um maior grau de deslocamento. Estes dados são sugestivos de que a TRASCET, apesar de não reverter totalmente, é capaz de atenuar a malformação de Chiari-II. (39)

5.1.2 Discussão

Já havia sido comprovado em estudos prévios o papel biológico fundamental das CELAs na regeneração tecidular fetal. Porém, permanecia ainda a questão se a injeção intraamniótica de CELAs era capaz de estimular a regeneração tecidular em fetos com anomalias congénitas. (23)

De facto, as CELAs injetadas nas bolsas amnióticas de ratos fêmea tendem a migrar preferencialmente para os locais de lesão, em modelos fetais de MMC criados em laboratório. (23,45,49) Esta migração parece ser o primeiro passo no tratamento. Com base nos estudos de Garcia et al, de Sun et al e de Yang et al, acredita-se que as CELAs migram para a zona de lesão devido à libertação de citoninas inflamatórias pela medula espinhal exposta que ativam a via sinalizadora CXCL12/CXCR4. (45,50,51,52) Por sua vez, as CELAs que aí se acumulam passariam a produzir CXCL12 que contribuiria para uma ainda maior acumulação de CELAs. Uma vez aí, estas células parecem aderir à superfície da medula espinhal e diferenciarem-se em células neoepiteliais, cobrindo a medula espinhal exposta, e promovendo o crescimento da epiderme através de medidores parácrinos produzidos pelas próprias CELAs. Isto levaria à proteção do segundo *hit*. (45)

Estes resultados suportam os estudos prévios de Fukutake et al, Sun et al e Yoon et al que demonstraram que as CELAs por si só e através do seu secretoma eram capazes de acelerar a cicatrização através da estimulação da re-epitelização num modelo de ferida em ratos da estirpe BALB/c, bem como apoiam a descoberta de Sun et al de que as CELAs seriam capazes de se diferenciarem em queratinócitos em diferentes estádios de maturação e, assim, promoverem a cicatrização celular. (45,50,53,54)

De facto, já tinham sido feitos estudos em foi comprovado que CELAs CD117+ se conseguem diferenciar em células progenitoras neuronais *in vitro*, quando estimuladas pelo inibidor da proteína cinase GSK3- β , SB21676, conforme medido pelo marcador neuronal progenitor, Nestina. (22)

Abe et al identificaram que no seu estudo, quer as CELAs que migraram para o local do defeito, quer as que passaram a integrar o LA, produziam FCH. (45) Já De Coppi et al e Trounson tinham reportado uma produção de FCH pelas CELAs nos seus estudos. (16,20,55) O FCH é um potente fator mitogénico para os hepatócitos adultos, para além de que estimula a angiogénese, reduz a inflamação, melhora a microcirculação, atua como um fator neurotrófico para inúmeros tipos de neurónios e exerce um efeito neuroprotetor na isquemia cerebral, na esclerose lateral amiotrófica e na lesão da medula espinhal. (9,45) Abe et al concluíram que o FCH secretado pelas CELAs CD117+ reduziu o dano neuronal e a astrogliose (reação inflamatória neuronal que se deve a trauma/lesão neural), protegendo do segundo *hit*. Para além disso, com o uso da Tubulina- β III, que representa o mais precoce marcador de neurogénese, conclui-se que a TRASCET é capaz de induzir a neurogénese num modelo de MMC fetal através da secreção de FCH. (45)

Notavelmente, no estudo de Abe et al um pequeno número de fetos com MMC no grupo de controlo apresentava algum *coverage* do defeito, ainda que limitado e incompleto, mesmo sem administração de CELAs. Este achado apoia a ideia de que a atividade biológica intrínseca das CELAs constitui o principal mecanismo por detrás do *coverage* do defeito desencadeado pela TRASCET, que representa simplesmente um aumento dessa atividade natural através da administração de CELAs em número bastante superior, porque, de facto as CELAs intrinsecamente são capazes de cobrir o defeito. Contudo, o seu grau de *coverage* é limitado pelo pequeno número de células existentes naturalmente no LA. (9,10,45) A TRASCET, ao administrar múltiplas injeções intraamnióticas de CELAs, e em quantidades maiores, permitiria, em teoria, um *coverage* total do defeito. (10)

No estudo de Dionigi et al, ficou demonstrado que as CEMLas migraram preferencialmente para as estruturas ósseas próximas do defeito. Porém, apesar do modelo roedor ser o ideal para expor o mecanicismo da TRASCET, não foi possível esclarecer o porquê das CEMLas revelarem especial preferência pelas estruturas ósseas, nem o porquê de os arcos vertebrais afetados pelo defeito não serem as únicas zonas para as quais houve migração das CEMLas. Para além disso, também não foi possível explicar o porquê da densidade de CEMLas injetadas aparentar ser inferior nos defeitos com *coverage* completa, relativamente aos com *coverage* parcial. (23)

Lazow et al, com base nos resultados de Dionigi et al, colocou a hipótese de que a medula óssea tem um papel fundamental na resposta do hospedeiro à TRASCET, no contexto de espinha bífida. Está largamente demonstrado que a importância da medula óssea na reparação tecidual se prende com a sua população de CEMs, que secreta diversos fatores parácrinos que promovem a cicatrização, a angiogénese e a imunomodulação. Os resultados deste estudo mostraram uma diminuição dos fatores parácrinos, secreção de FGF-2 e EGF, no local do defeito em fetos com *coverage* da espinha bífida, comparativamente com aqueles sem qualquer *coverage*. Isto parece sugerir uma regulação por feedback negativo da atividade parácrina local à medida que o defeito vai sendo coberto por uma camada de pele. Estes resultados estão de acordo com a literatura. E, apesar de esta associação entre a diminuição da secreção FGF-2 e EGF e o *coverage* do defeito não represente uma prova definitiva dos processos mecanicistas da TRASCET, de facto fornece importantes pistas no que toca ao mecanicismo desta nova opção terapêutica, servindo de base para investigações futuras. Lazow et al demonstraram também uma diminuição da expressão de TGF β -1 na medula óssea com o *coverage* da lesão, de forma similar ao que se verificou com a atividade parácrina no local do defeito. Igualmente, verificaram uma diminuição da expressão de CD45 à medida que o defeito ia sendo coberto pela nova camada de pele. O CD45 é um marcador expresso pelas células estaminais hematopoiéticas (CEHs), que não está presente nas CEMs. Tais resultados parecem indicar um *shift* no balanço de CEHs e CEMs na medula óssea. De facto, demonstrou-se que o *coverage* do defeito estava associado a um predomínio relativo de CEMs, o que corrobora uma vez mais o papel da medula óssea na formação da camada de pele que cobrirá o defeito. Neste estudo verificaram-se diferenças significativas nos fatores parácrinos e na expressão de marcadores de clonalidade das CEMs, na medula óssea, entre os diferentes grupos com DTN e que receberam tratamento e o grupo como DTN usado como referência. Está descrito em vários estudos prévios que tal reflete apenas os efeitos biológicos do uso de ácido retinóico na medula óssea e no desenvolvimento ósseo. Porém, não se pode colocar de parte a hipótese de que estes resultados reflitam apenas

uma reposta reflexa das medulas ósseas ao DTN nos fetos de todos os grupos. Apesar das limitações deste estudo, nomeadamente, a divisão de defeito em dois hemidefeitos, o estudo de Lazow et al suporta de facto a hipótese de que o *coverage* do DTN induzido pela TRASCET se deve à atividade da medula óssea, através da amplificação de um fenómeno que ocorre naturalmente. (32)

O uso do modelo de MMC fetal em ratos tem algumas limitações, nomeadamente o curto período de gestação, o curto espaço de tempo desde a injeção intramniótica das CELAs e a morte, que não permite inferir se caso se tivessem administrado as CELAs mais precocemente ou repetidamente, os efeitos da TRASCET poderiam ter sido mais pronunciados, e o facto dos fetos com MMC morrerem logo após o nascimento, não permitindo estudar o verdadeiro impacto da TRASCET a longo prazo no que toca à disfunção motora. Tal implica a realização de novos estudos em moldes semelhantes em animais mais complexos, com gestações mais longas para se poderem estudar estas características. (10,23,45)

O estudo de Shieh et al, utilizando um modelo de MMC fetal em coelhos constitui o passo sequencial na análise pré-clínica do impacto da TRASCET, uma vez que o volume do LA presente na bolsa amniótica de coelhos fêmea em período gestacional é múltiplas vezes superior ao encontrado em ratos. No entanto, também este modelo não é isento de limitações. O DTN tem de ser criado cirurgicamente em período relativamente avançado da gestação, o que leva a que o período de gestação se torne demasiado curto para permitir maximizar os efeitos da TRASCET. De facto, apesar de se ter verificado um *coverage* da lesão no grupo tratado com TRASCET, esse *coverage* foi apenas parcial, contrariamente ao verificado no estudo com o modelo de MMC fetal em ratos, em que se verificaram *coverages* parciais e totais. Para além disso, neste modelo a injeção intramniótica das CELAs deu-se no momento da criação do defeito, em oposição com o modelo em ratos, em que as CELAs foram injetadas algum tempo após a indução do DTN com ácido retinóico. (12)

O próximo passo na investigação deverá passar pela realização dum estudo nos mesmos moldes, mas em animais da raça ovina, antes de se poder pensar em ensaios clínicos. (10,12)

Uma das principais complicações do MMC é a malformação de Chiari-II. Esta condição pertence ao espectro de anomalias congénitas do rombencéfalo, caracterizando-se pela descida do vermis cerebeloso, do tronco cerebral e do quarto ventrículo, através do forâmen magno. Raramente é reportada isoladamente, sem estar associada ao MMC. Na maioria dos casos, a malformação de Chiari-II complica-se com hidrocefalia, causa de grande morbidade e mortalidade em crianças com espinha bífida. (39)

Em 1950, Cameron propôs a teoria, posteriormente confirmada, de que a herniação do rombencéfalo ocorre devido às diferenças de pressão resultantes do vazamento do líquido cefalorraquidiano (LCR) para a bolsa amniótica, através do DTN, resultando disto uma força descendente que atua sobre as estruturas da fossa posterior. Adicionalmente, a herniação do rombencéfalo conduz a uma obstrução do quarto ventrículo, impedindo o normal fluxo de LCR, obrigando a sua circulação pelo canal medular, desde o DTN até à bolsa amniótica. À medida que a gestação avança, a herniação agrava-se, acabando por obstruir igualmente o fluxo de LCR do quarto ventrículo para os forâmens de Magendie e de Luschka, conduzindo necessariamente a hidrocefalia. (39)

A cirurgia fetal reduz a frequência e a gravidade da malformação de Chiari-II, uma vez que ao reparar o DTN, impede o vazamento de LCR. Todavia, como já foi referido anteriormente, a cirurgia não está indicada na maioria dos casos, nem é isenta de riscos. (39)

Quanto à alternativa terapêutica TRASCET, os resultados do estudo de Diogini et al sugerem que o tratamento com CELAs, apesar de não reverter completamente a malformação de Chiari-II, minimiza as suas consequências, por levar ao *coverage* do MMC e, conseqüentemente, impedir o vazamento de LCR. (10,39)

No modelo de MMC de ácido retinóico usado neste estudo, apesar dos fetos apresentarem malformação de Chiari-II, não se identificou hidrocefalia em nenhum. Várias teorias foram levantadas para explicar este facto. Uma das teorias propostas assume que a ausência de hidrocefalia se deve à não rotação ventral no rombencéfalo nos roedores, enquanto que outros assumem que a hidrocefalia é tempo-dependente e, sendo o período de gestação nos roedores bastante curto e a taxa de sobrevivência a curto prazo após o nascimento também bastante curta, não permite o desenvolvimento de hidrocefalia. (39)

De facto, o tempo foi um fator limitante inerente a este estudo, assim como já se havia verificado nos restantes estudos apresentados. Não só o período gestacional dos roedores

é bastante curto, como também o tratamento com TRASCET só pode ser efetuado com taxas de sobrevivência elevadas ao 17º dia de gestação, restando apenas menos de uma semana entre o tratamento e a eutanásia. É impossível não especular que o efeito da TRASCET poderia ter sido ainda mais pronunciado caso as injeções intraamnióticas de CELAs pudessem ter sido feitas mais cedo e/ou administradas mais do que uma vez. (23,39,45)

Apesar de todas as limitações, é inerente a todos os estudos mencionados que a TRASCET parece ser uma alternativa terapêutica futura válida, prática e com resultados promissores para o tratamento da espinha bífida e das suas complicações. (12,23,39,45)

Adicionalmente, de referir que já se comprovou a existência de outra subpopulação de células estaminais no LA - células de fenótipo neural, mais indiferenciadas e primitivas, que aparecem no LA em contexto de DTN - e que, em teoria, poderiam auxiliar no diagnóstico dessas anomalias. (10,56) Os dois estudos publicados por Pennington et al sugerem que este subtipo de células estaminais têm um valor diagnóstico para os DTN, para além do seu potencial terapêutico. (10,57,58)

Turner et al conseguiram isolar CELAs “do tipo neural” no LA na presença de DTN. Posteriormente, transplantaram-nas em fetos roedores com espinha bífida induzida laboratorialmente, tendo concluído que estas migravam preferencialmente para o local do defeito. (13,59)

Apesar de ainda não existirem estudos que demonstrem se este subtipo de CELAs tem impacto clínico na reparação do defeito, elas parecem ser candidatas naturais para a TRASCET, uma vez que tal como as restantes CELAs, seriam colhidas a partir de amniocentese, expandidas *ex vivo*, e seriam administradas através de injeções intraplasmáticas, juntamente com as restantes CELAs. (13)

De ressaltar que embora possam existir preocupações relativamente à viabilidade do uso de CELAs de fetos com anomalias congénitas comparativamente com o uso de CELAs de fetos normais, sem quaisquer malformações, existem já estudos que comprovam existir potencial a nível terapêutico e que demonstraram não existir diferenças ao nível do crescimento/proliferação celular, quando comparados estes dois tipos de CELAs. (22)

5.2 Defeitos Diafragmáticos

A hérnia diafragmática congénita (HDC) é uma anomalia congénita que se caracteriza por um defeito no diafragma que leva à herniação das vísceras abdominais para a cavidade torácica, impedindo o normal desenvolvimento dos pulmões, e conduzindo, consequentemente, a hipoplasia pulmonar. (2,43,60,61) O defeito diafragmático mais comum é o posterolateral – de Bochdalek – e ocorre maioritariamente à esquerda. (43,60,61)

A sua incidência na Europa é de 3.2 casos por cada 10000 nascimentos, segundo dados relativos a 2019. (42)

A sua etiologia permanece ainda por ser totalmente esclarecida, porém é considerada multifatorial, com diversos fatores genéticos associados a exposição ambiental e deficiências nutricionais a serem propostos como possíveis etiologias. A HDC pode ser uma anomalia isolada ou fazer parte de um síndrome genético, associado a outras anomalias. (60,61)

A sua fisiopatologia resulta da associação de hipoplasia pulmonar com vasorreatividade pulmonar anormal, hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (HPPN) e disfunção ventricular. (60,61)

Com o avanço das técnicas de diagnóstico pré-natal, cerca de dois terços dos casos de HDC são detetados durante o período pré-natal, por ecografia fetal por volta das 18-20 semanas de gestação. (2,61)

A gestão imediata do RN inclui descompressão intestinal, evitar ventilação com Ambu, e intubação com tubo endotraqueal, se necessário. O foco principal inclui a ventilação, monitorização hemodinâmica e tratamento da hipertensão pulmonar com óxido nítrico, seguido de cirurgia, que parece ser a única esperança de sobrevivência destas crianças atualmente. A oxigenação por membrana extracorporeal (ECMO) será opção em fetos com HDC e ≥ 34 semanas de gestação ou com peso >2 kg, sem outras anomalias *major* letais, após a falência do tratamento médico convencional. (60)

A cirurgia para a redução do conteúdo herniado com reparação do defeito diafragmático tem benefícios a longo prazo, por permitir a expansão pulmonar, mas tem poucos benefícios imediatos para o RN. A hipertensão pulmonar raramente resolve apenas com a reparação da hérnia. Aliás, a própria cirurgia pode induzir crises hipertensivas

pulmonares, dado o stress gerado nos RNs com doença mais severa, podendo mesmo levar a complicações hemorrágicas graves nos pacientes a fazerem ECMO. (60)

Para os RNs que não necessitam de ECMO, a cirurgia deve ser feita nunca antes das 48-72 h após o nascimento, dado que se supõe que a vasculatura pulmonar destas crianças não se encontra comprometida a ponto de representar um risco significativo de descompensação peri ou pós-operatória. Quando o RN requer ECMO, existem três abordagens que podem ser adotadas: reparação precoce, imediatamente após o início da ECMO (normalmente <72 h), reparação retardada, considerada como a última esperança no cenário de incapacidade de desmamar a ECMO, e reparação pós decanulação. (60)

Apesar dos avanços no tratamento médico e cirúrgico da HDC, a taxa de mortalidade neonatal permanece elevada (30%) (43), assim como a taxa de morbilidade, e o tempo de internamento destas crianças é bastante prolongado, exigindo uma abordagem multidisciplinar e acompanhamento médico após a alta hospitalar. (60)

5.2.1 Resultados Terapêuticos

Chalpin et al avaliaram o impacto da TRASCET na HDC num modelo experimental de HDC em ratos Sprague-Dawley. Ao 9º dia de gestação foi administrado nitrofenol aos ratos fêmea de forma a induzir HDC. Ao 17º dia gestacional, foram administradas injeções intraamnióticas contendo CEMLAs de ratos Lewis normais colhidas ao 21º dia de gestação. (36)

O grupo que recebeu as injeções com CEMLAs mostrava uma diminuição da expressão do FGF-10 e do VEGF-A, comparativamente com os grupos que não foram tratados com TRASCET, enquanto a expressão da SPC se encontrava significativamente aumentada no grupo que recebeu as CEMLAs, comparativamente com o grupo que não recebeu qualquer tratamento. A medição dos níveis FGF-10, VEGF-A e SPC no pulmão ipsilateral ou no pulmão contralateral à hérnia não demonstrou resultados muito díspares. (36)

5.2.2 Discussão

Nos últimos anos, tem sido bastante estudado o impacto do uso de CEMLAs na indução do desenvolvimento pulmonar como tratamento da hipoplasia pulmonar causada pela HDC.

Dado a conhecida associação entre oligohidrâmnios e a hipoplasia pulmonar, colocou-se a hipótese de que de facto as CEMLAS poderiam secretar fatores de crescimento que proovessem o desenvolvimento *vis-à-vis* com mediadores parácrinos e/ou exossomas. (2) Pederiva et al, Di Bernardo et al e Pozzobon et al tinham já comprovado com os seus estudos a capacidade regenerativa pulmonar das CELAs em modelos de HDC. (62,63,64) O estudo de Di Bernardo et al demonstrou que CEMLAS administradas num modelo roedor de HDC com hipoplasia fetal foram capazes de estimular e aumentar a ramificação das vias aéreas e a maturação epitelial do pulmão. (63)

O estudo de Chalphin et al demonstrou principalmente que a TRASCET tem impacto no desenvolvimento pulmonar. (36)

Estudos prévios acerca da expressão da proteína VEGF-A em modelos de HDC induzidos por nitrofenol revelaram resultados díspares. (36) Nos estudos de Chang et al e de Hara et al, a expressão de VEGF-A no seu global encontrava-se diminuída, enquanto que o estudo de Oue et al demonstrou um aumento da sua expressão. (36,65,66,67) O VEGF-A é necessário para a sobrevivência embrionária, desempenhando um papel essencial no desenvolvimento vascular e parênquima pulmonar, por promover a angiogénese, a migração e proliferação celular e a permeabilidade vascular. (66) O VEGF-A vai sendo sujeito a *splicing* alternativo, originando diversas isoformas, que atuam de forma diferente na angiogénese, podendo induzi-la ou inibi-la, devendo ter-se tal em conta aquando da escolha do método de PCR utilizado, para que os resultados obtidos sejam fidedignos. Apesar de este estudo ter revelado uma diferença significativa da expressão da proteína VEGF-A entre o grupo tratado com TRASCET e os grupos não tratados, dada a grande complexidade desta molécula, o significado destes resultados ainda não está totalmente esclarecido. (36)

Para além do VEGF-A, também o FGF-10 desempenha um papel fulcral no desenvolvimento pulmonar, nomeadamente na ramificação das vias aéreas. (36) Teramoto et al conduziram um estudo em que expuseram igualmente ratos fêmea em período gestacional a nitrofenol, com o objetivo de induzir HDC, e mediram os níveis de expressão de FGF-10, tendo verificado uma diminuição do mesmo. Verificaram igualmente não existirem diferenças na expressão de FGF-10 entre os grupos de controlo e os grupos de fetos expostos a nitrofenol mas que não desenvolveram HDC. (68) Estes resultados apontam para que a diminuição da expressão FGF-10 seja principalmente dependente da existência de HDC. Tal como VEGF-A, a expressão de FGF-10 encontra-se igualmente diminuída no grupo tratado com TRASCET comparativamente com os restantes grupos

não tratados. No entanto, ao contrário do que acontece com o aumento da expressão do FGF-10, em que existem estudos a ligar este aumento a metaplasia das células caliciformes, compromisso do desenvolvimento do broto pulmonar e captura de células progenitoras, ainda não se conhece o impacto clínico da diminuição da expressão do FGF-10. (36)

SPC é um marcador da maturação dos pneumócitos tipo-II. A deficiência de surfactante já foi demonstrada em fetos de ratos expostos a nitrofenol e RNs humanos com HDC. Os resultados do estudo de Chalpin et al demonstraram um aumento da expressão de SCP no grupo tratado com TRASCET, comparativamente com grupo que não recebeu qualquer tratamento. Apesar de estes dados serem bastante positivos, não se pode descartar a opção de que a expressão aumentada de SCP se possa dever ao simples facto de os dados serem insuficientes. (36)

Naturalmente, todos estes resultados têm de ser considerados à luz das limitações deste estudo. Apesar de o modelo de HDC induzido por nitrofenol ser o mais representativo de HDC humana, não consegue reproduzir a 100% a doença clínica. Para além disso, é difícil controlar o tamanho do defeito diafragmático, que se sabe que é um fator preditor da sua gravidade clínica. E, como já seria expectável, não permite retirar conclusões com absoluta certeza, dado a complexa rede de sinalização que está por detrás do desenvolvimento pulmonar, sendo necessários mais dados. (36)

Ainda assim, o estudo de Chalpin et al permitiu demonstrar que de facto a TRASCET tem impacto em aspetos fundamentais do desenvolvimento pulmonar num modelo experimental de HDC, constituindo assim o primeiro passo na investigação do potencial terapêutico da TRASCET na HDC e servindo como base para novos estudos acerca da que poderá vir a ser a terapia do futuro desta anomalia congénita. (36)

Dado que cerca de 30% dos neonatos com HDC morre devido a hipoplasia pulmonar e HTP, a TRASCET, por estimular o desenvolvimento pulmonar, poderá ter um grande impacto clínico na mortalidade e morbilidade destas crianças. (2)

5.3 Defeitos da Parede

A gastrosquise, o defeito da parede abdominal mais frequente, consiste numa anomalia congénita da parede abdominal anterior, localizada à direita da inserção do cordão umbilical e caracterizada pela herniação das vísceras abdominais, geralmente das ansas intestinais, que ficam expostas diretamente ao LA. (2,10,69,70)

A sua incidência na Europa é de 2.73 casos por cada 10000 nascimentos, segundo dados relativos a 2019 (42), e em Portugal é de 0.9 por cada 10000 nascimentos, segundos dados recolhidos entre 2000 e 2010. (71) De ressaltar, que se tem vindo a observar um aumento da sua incidência a nível mundial. (10,11,70)

A sua etiologia não está totalmente esclarecida. No entanto, existem alguns fatores associados com o desenvolvimento de gastrosquise, nomeadamente o consumo de álcool e tabaco, uso de drogas ilícitas, exposição ambiental a nitrosaminas ou atrazina, uso de inibidores da COX-2 e de descongestionantes durante a parte inicial da gestação, história de diabetes pré-gestacional ou gestacional e uso de antidepressivos, antecedentes de infeções do trato geniturinário em período periconcepcional, uma idade jovem do próprio progenitor masculino e residência em áreas onde a prescrição de opióides é média a elevada. (69,70) Raramente está associada a anomalias genéticas. (70)

A exposição continuada do conteúdo intestinal herniado ao LA, mecónio e outros produtos de excreção, principalmente durante o terceiro trimestre de gestação, é responsável pelo dano intestinal verificado na gastrosquise. (2,11,31) A análise histológica revela um espessamento de todas as camadas da parede intestinal, edema, inflamação crónica, aspeto coriáceo e um encurtamento das ansas intestinais. A isto acresce a constrição provocada pelo estreitamento pré-natal da fásia típica da gastrosquise que conduz à vasoconstrição e, conseqüentemente, à isquemia intestinal. (31) Em casos mais graves, pode mesmo conduzir a estrangulamento e/ou atresia. (10) Conseqüentemente, verificar-se-á uma ausência do peristaltismo e um retorno muito prolongado a um normal funcionamento intestinal. (10,31)

A gastrosquise pode levar a restrição de crescimento intrauterino (RCIU), parto prematuro ou mesmo morte fetal. (70) Aproximadamente 10% dos casos encontram-se associados a outras anomalias extraintestinais (69) e até 25% podem desenvolver outros problemas gastrointestinais, como atresia intestinal, estenose, perfuração, necrose, má rotação ou volvo intestinal. (70)

Os defeitos da parede são rotineiramente diagnosticados em período pré-natal através da ecografia fetal. Porém, apesar do diagnóstico precoce, a gestão pré-natal desta anomalia limita-se apenas ao aconselhamento relativamente ao *timing* e ao tipo de parto a optar. (10)

Várias estratégias pré-natais foram propostas com o intuito de minimizar o dano intestinal e recuperar a função gastrointestinal na gastrosquise, mas ainda nenhuma se comprovou ser efetivamente eficaz na reparação do dano e recuperação da função intestinal. (10,11,31) E, embora a mortalidade de RNs com gastrosquise tenha diminuído ao longo dos anos, é verdade que a morbidade permanece ainda consideravelmente elevada, associada a internamentos caros e prolongados, nutrição parenteral a longo prazo, infeções e outras comorbilidades. (11,31)

5.3.1 Resultados Terapêuticos

Feng et al induziram cirurgicamente gastrosquise em fetos de ratos Sprague-Dawley ao 17,5-18,5^o dia de gestação e estudaram o impacto da TRASCET no tratamento desta anomalia, através da administração de injeções intraamnióticas de CEMLAs colhidas ao 21^o dia de gestação de ratos Lewis fêmea normais. À vista macroscópica, o grupo que recebeu as injeções intraamnióticas de CEMLAs apresentava aparentemente menor alteração das ansas intestinais, contrariamente às dos restantes grupos, que apresentavam características expectáveis de gastrosquise, como dilatação das ansas, aparência coriácea e apresentando um espesso revestimento. O grupo tratado com TRASCET apresentou igualmente uma redução significativa da espessura total das ansas intestinais e das camadas serosa, muscular e mucosa, comparativamente com os grupos que não receberam as injeções intraamnióticas de CEMLAs. Em relação com o grupo de controlo, o grupo tratado com TRASCET apresentou valores de espessura total das ansas intestinais e das camadas serosa e mucosa semelhantes, mas não da camada muscular, cuja espessura era superior. As CEMLAs foram identificadas por microscopia de fluorescência no grupo tratado com TRASCET, dispersas pelas diferentes camadas da parede intestinal. (31)

Posteriormente, Feng et al avaliaram a eficácia da TRASCET no tratamento da gastrosquise em modelos animais mais complexos, com gestações mais prolongadas - coelhos. Induziram cirurgicamente gastrosquise em fetos de coelhos New Zealand ao 23^o dia de gestação. Seguidamente, administraram injeções intraamnióticas de CEMLAs de coelhos fêmea normais em período gestacional, colhidas ao 23-24^o dia de gestação. No

grupo tratado com TRASCET, a espessura total das ansas intestinais, assim como a espessura das camadas serosa, muscular e mucosa, encontrava-se significativamente reduzida, comparativamente com os grupos que não receberam as injeções de CEMLAS. Já comparativamente com o grupo de controlo, a espessura total das ansas intestinais e a espessura da camada mucosa do grupo que recebeu as CEMLAS apresentava-se com valores em muito semelhantes aos do grupo de controlo, contrariamente ao verificado com a espessura das camadas serosa e muscular, que apresentavam um aumento da sua espessura relativamente à do grupo de controlo. No grupo tratado com TRASCET, as CEMLAS injetadas foram identificadas dispersas por todo o intestino, excetuando no epitélio luminal. Não se verificaram diferenças significativas na atividade dos marcadores de inflamação mieloperoxidase, malondialdeído e interferão-gama ao longo de todos os grupos analisados. (11)

Chalphin et al estudaram a cinética das CEMLAS após a TRASCET, num modelo roedor de gastrosquise. Ao 18º dia de gestação de ratos Sprague-Dawley, foi induzido gastrosquise cirurgicamente e durante este procedimento, CEMLAS colhidas ao 21º dia de gestação de ratos Lewis normais, e posteriormente marcadas com luciferase, foram administradas via injeções intraamnióticas. Foram recolhidas amostras de diversos locais anatómicos e rastreada a atividade da luciferase por luminometria. As CEMLAS injetadas foram maioritariamente detetadas na placenta e ansas intestinais expostas e ainda residualmente na medula óssea, cérebro e cordão umbilical. No entanto, a migração das CEMLAS para o intestino não foi documentada nas ansas não expostas ao LA. Não foi encontrada qualquer correlação entre a migração das CEMLAS em direção à placenta e às ansas intestinais, o que é indicativo que as rotas migratórias para estes dois locais são mutuamente independentes uma da outra. (33)

5.3.2 Discussão

Apesar de já terem sido propostas diversas estratégias pré-natais para a redução do dano intestinal provocado pela exposição continuada ao LA e a produtos de excreção, atualmente, não existe nenhum tratamento pré-natal clinicamente comprovado que permita diminuir o dano, melhorar a função intestinal ou que consiga diminuir a morbidade provocada pela gastrosquise. (11,31)

Dado já estar comprovado o papel fulcral das CEMLAS na regeneração e reparação tecidual, a amplificação do seu papel natural através do aumento do número de CEMLAS

presentes no LA, conseguido à custa de injeções intraamnióticas, a TRASCET poderia ter efeito terapêutico na gastrosquise, tal como já se comprovou ter num modelo de espinha bífida. (2,11,31)

Porém, diferentemente do que se observou no modelo de espinha bífida, não se verificou uma implantação de CEMLas nas diversas camadas da parede intestinal no modelo de gastrosquise, o que é sugestivo de um efeito parácrino. No modelo roedor de gastrosquise, as CEMLas tiveram necessariamente de ser injetadas concomitantemente com a criação do defeito da parede, o que pode explicar a fraca implantação, uma vez que as CEMs são conhecidas por migrarem preferencialmente para as zonas de lesão, correspondendo esta a uma limitação deste estudo. (10,31)

Outras limitações deste estudo incluem a alta taxa de mortalidade fetal, a incapacidade de conduzir estudos detalhados acerca da motilidade intestinal e outros estudos funcionais pós-natais, assim como a dificuldade em administrar mais do que uma injeção intraamniótica ou fazê-lo após a criação do defeito da parede. Contudo, este modelo é o ideal no estudo inicial do impacto da TRASCET na gastrosquise, uma vez que parece mimetizar a fisiopatologia deste defeito em fetos humanos, tem baixo custo, período de gestação curto e grande número de fetos por ninhada. (31)

Apesar do modelo ovino parecer ser o melhor para comprovar de facto a eficácia da TRASCET, a transição de um modelo roedor para o modelo ovino, excessivamente caro e que exige bastantes recursos, não parece ser a alternativa mais sensata quando existe uma espécie intermédia como os coelhos que pode fazer a ponte entre o modelo roedor e o ovino. Os coelhos têm vantagens sobre os roedores, uma vez o volume de LA nativo é várias vezes superior, o que permite injetar um volume de CEMLas 30-60 vezes maior, dependendo da fisiopatologia da doença em questão. Este modelo é custo-efetivo e apresenta uma taxa de sobrevivência fetal relativamente elevada. Todavia, o período de gestação não é longo o suficiente para permitir o uso de CEMLas autólogas. De ressaltar, que não se verificaram quaisquer reações inflamatórias ou outras reações adversas ao uso de células heterólogas, tal como no modelo roedor. (11)

No estudo com o modelo de coelho, verificou-se que as ansas intestinais expostas tratadas com as injeções intraamnióticas de CEMLas heterólogas não eram totalmente normais, não se podendo descartar a possibilidade de que o uso de células autólogas poderia ter algum impacto nesses resultados. (11)

Neste estudo, o tratamento com TRASCET apesar de não ter conseguido reverter na totalidade o dano intestinal associado à gastrosquise, foi capaz de o diminuir. Apesar de não saber ainda com certeza os mecanismos por detrás deste resultado, pensa-se que a capacidade anti-inflamatória e imunomoduladora das CEMs serão responsáveis por tal. (11)

Não se verificaram diferenças significativas entre os grupos tratados com TRASCET e os restantes ao nível das moléculas inflamatórias analisadas neste estudo, o que está de acordo com os estudos de Midrio et al e de Gonçalves et al, que igualmente não demonstraram diferenças nos marcadores inflamatórios medidos no contexto de fetos com gastrosquise. (11,72,73)

Será de máxima importância a realização de novos estudos que investiguem outros componentes da resposta inflamatória, nomeadamente uma análise quantitativa e qualitativa da atividade leucocitária e da proliferação do tecido conjuntivo e/ou da deposição de fibrina, bem como analisar o *status* das células estaminais intestinais nativas, uma vez que já se comprovou que as células estaminais, incluindo as CEMs, muitas vezes acompanham a população de células estaminais locais, de forma independente de intervenção inflamatória. (11)

Neste modelo de gastrosquise em coelhos, as CEMs são administradas em simultâneo com a criação do defeito, ou seja, antes de existir de facto dano intestinal. Tal pode então explicar o facto de não se ter observado um grande fluxo migratório de CEMs para o local do defeito. (10,11) Adicionalmente, apesar do coelho ser um animal maior, mais complexo e com um volume de LA bastante superior ao do roedor, não foi possível a administração de múltiplas injeções intramnióticas de CEMs, mais uma vez, devido ao *timing* de administração das CEMs e da criação do defeito. (11)

Quer este modelo quer o modelo roedor não conseguiram reproduzir fiel e consistentemente o estreitamento pré-natal da fásia presente no defeito em fetos humanos, que tem um papel crucial no mecanismo de lesão intestinal. Daí que, com base apenas nestes dois estudos, não se possa inferir se a TRASCET teria ou não algum impacto neste componente da fisiopatologia da gastrosquise. (11)

Apesar de todas as limitações apresentadas em ambos os modelos, ficou comprovado que a TRASCET, apesar de não reverter totalmente o defeito, consegue diminuir significativamente a espessura total da parede intestinal, bem como a espessura das

camadas serosa, muscular e mucosa, sendo capaz então de diminuir o dano intestinal, suportando, assim, a ideia de que a TRASCET poderá tornar-se numa alternativa terapêutica válida no tratamento da gastrosquise. (11,31)

Os estudos de Feng et al nos modelos de rato e coelho de gastrosquise demonstraram a presença escassa de CEMLAs e apenas nas ansas intestinais expostas, em todas as suas camadas, excetuando a mucosa. Já Chalphin et al, para além de terem confirmado a migração intestinal das CEMLAs, conseguiram demonstrar que a placenta é de facto um componente fundamental para o trajeto migratório a tomar pelas CEMLAs. Tal vai ao encontro dos estudos de Graham et al e Shieh et al, que tinham já comprovado a presença de CEMLAs na placenta e na via hematogénica após a TRASCET, tanto em fetos saudáveis como em modelos animais de espinha bífida. Para além da placenta, estes dois grupos demonstraram igualmente a presença de CEMLAs noutros locais altamente irrigados, como é o caso do cordão umbilical, baço e medula óssea, o que suporta a importância da via hematogénica na migração das CEMLAs. A luciferase, apesar de permitir uma avaliação homogénea de um órgão como um todo, pode não ser sensível o suficiente para detetar todos os locais de migração das CEMLAs. No estudo de Chalphin et al apesar de se ter detetado atividade da luciferase no cordão umbilical, medula óssea e cérebro, a verdade é que esta atividade enzimática não permite retirar dados estatisticamente significativos, comparativamente com o grupo de controlo com luciferase que não recebeu as CEMLAs. Tal poder-se-á dever a um erro tipo II, dado o tamanho da amostra ou então ao facto da gastrosquise, de entre todas as anomalias genéticas em que já se estudou o impacto da TRASCET, ser aquela que mais dano tecidual provoca, o que resulta num maior e mais rápido consumo das CEMLAs. Apesar da presença de CEMLAs na medula óssea, verificou-se que algumas das patas traseiras dos sobreviventes com gastrosquise seriam mais pequenas e/ou anormais e que os seus fémures aparentavam ser mais pálidos do que o normal. Ora, tal tem implicações importantes, uma vez que o fémur é o único local do roedor onde pode ser obtida medula óssea de maneira fiável, e apenas em fetos de termo. Isto poderá ter tido impacto nos resultados deste estudo. Para além disso, o facto de na gastrosquise, comparativamente com outras anomalias genéticas já estudadas, o defeito ter sido criado cirurgicamente provoca maior dano tecidual, quer fetal, quer uterino, o que leva a que haja um maior consumo de CEMLAs nesses locais de lesão. Ao que se adiciona o facto de que as CEMLAs foram administradas concomitantemente à criação do defeito. (33)

A migração das CEMLAs parece depender da patologia presente, o que sugere que os mecanismos responsáveis pelos efeitos terapêuticos da TRASCET serão diferentes em

cada anomalia congénita. Esta migração para a placenta tem duas implicações translacionais. A primeira, será que as CEMLAs conseguem atingir as ansas intestinais expostas através da circulação, o que permitiria às CEMLAs migrarem para o intestino, mesmo na presença de uma camada fibrosa, típica deste defeito, que impede a migração direta das CEMLAs desde a bolsa amniótica para as ansas intestinais afetadas. A segunda, relaciona-se com as implicações que a migração por via hematogénica das CEMLAs para outros locais anatómicos poderá ter, exigindo investigação a médio-longo prazo do efeito destas células nesse locais, antes de se partir para os ensaios clínicos em humanos. De ressaltar, que as migrações placentária e intestinal são totalmente independentes uma da outra. A demonstração da existência de dois trajetos migratórios distintos, incluindo a disseminação direta pela bolsa amniótica e a disseminação por via hematogénica, suporta a necessidade de determinar qual o futuro a curto-longo prazo das CEMLAs injetadas intraamnioticamente. (33)

Estes dados apoiam a hipótese de que a TRASCET se poderá tornar numa estratégia terapêutica altamente valiosa no tratamento pré-natal da gastrosquise. (33)

6. Conclusão

O LA é uma fonte subaproveitada de células estaminais, com enorme potencial terapêutico no campo da Medicina Regenerativa (13), especialmente no que toca ao tratamento de anomalias congénitas, que apesar dos avanços da Medicina, permanecem como um enorme problema social (8), e cujas opções terapêuticas atualmente não permitem garantir o melhor *outcome* clínico nem a melhor qualidade de vida das crianças com estas malformações fetais.

As CELAs têm vindo a demonstrar-se como uma promissora fonte para o tratamento de várias doenças, nomeadamente das anomalias congénitas, dadas as suas propriedades e características únicas, nomeadamente a sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares das três camadas germinativas embrionárias, a facilidade no seu isolamento e expansão em cultura, o facto de conseguirem reduzir a resposta anti-inflamatória e estimular a reparação e regeneração tecidulares, a ausência de limitações éticas, assim como do risco de tumorigénese. (13,16,45) Para além disso, as CELAs são facilmente obtidas através de amniocentese, que representa um dos procedimentos de obtenção de células fetais menos invasivos atualmente, com um risco mínimo para a mãe e feto, para além de que está já indicado como parte do diagnóstico pré-natal em muitas das gestantes, bastando apenas uma pequena amostra de LA para se obter um grande número de novas CELAs. (16,31,45) Adicionalmente, as CELAs são capazes de se proliferar em cultura muito mais rapidamente, resistindo com mais facilidade a condições de hipoxia que quaisquer outros tipos de células estaminais *in vitro*. (31) Todas estas características tornam o seu uso bastante prático e acessível, somando ao seu enorme valor translacional (16), ao que se junta o facto da grande maioria das anomalias congénitas ser diagnosticada em fases relativamente precoces da gestação, fazendo então das CELAs as candidatas ideais para o desenvolvimento de terapias únicas para o tratamento de um variado leque de anomalias congénitas humanas. (13)

A qualidade e a capacidade de reparação das CELAs não parecem ser prejudicadas pela idade materna, conforme estudos comparativos entre LA colhido de gestantes entre os 18 e os 46 anos, durante o segundo trimestre de gravidez. (22)

Numa perspetiva translacional, as CEMLas são ideais para usar em terapêuticas pré-natais, como a TRASCET (31), que se baseia na obtenção de CEMs no seu ambiente natural e posterior reintrodução nesse mesmo ambiente nativo, mas em maior número, amplificando o papel natural desempenhado pelas CEMLas na reparação e regeneração

tecidual. (33,34) O LA é uma fonte importante de CEMs, com distintas vantagens sobre as CEMs adultas. (16)

As CEMLAs, apesar de não serem tão primitivas nem terem um potencial de diferenciação tão elevado quanto outros tipos de células estaminais, conseguem diferenciar-se em vários tipos de células, e está comprovado que quando expostas um extenso processamento celular mantém-se estáveis quer genética, quer fenotipicamente (10,13), para além de que já foi demonstrado em diversos estudos que as CEMLAs se expandem mais rapidamente em cultura do que outros tipos de CEMs, quando expostas às mesmas condições *in vitro*. Tal capacidade proliferativa, associada ao princípio básico da TRASCET de utilizar CEMLAs no seu estado nativo, sem quaisquer manipulações, amplificando a sua capacidade intrínseca de reparação e regeneração tecidual fetal, após a sua injeção na bolsa amniótica, de onde foram inicialmente colhidas, acentuam ainda mais a operacionalidade e o potencial alcance terapêutico da TRASCET. (10)

Apesar da TRASCET ser uma estratégia de tratamento relativamente recente, as CEMLAs há muito que são usadas no tratamento de diversos modelos animais, sem existir, até à data, qualquer caso, reportado de tumorigénese ou outro efeito adverso relacionado com o seu uso. (10)

As CEMLAs são igualmente capazes de migrar para as diferentes zonas de lesão. Têm surgido nos últimos anos evidência científica através de diversos modelos experimentais de anomalias congénitas em animais com resultados muito promissores no que toca ao uso TRASCET no tratamento das anomalias congénitas, dada a capacidade regenerativa e de reparação tecidual das CEMLAs. (8,13) A injeção intraamniótica de CELAs em modelos de MMC resultou no *coverage* parcial ou total da lesão. (12,23,32,45) Para além disso, este *coverage*, apesar de não reverter na totalidade, é capaz de minimizar a malformação de Chiari II, universalmente associada ao MMC. (39) As CELAs são igualmente capazes de migrar para o local de lesão e produzir FCH, promovendo a regeneração neural, suprimindo a inflamação neuronal e protegendo as células neuronais. (45) A injeção intramniótica de CEMLAs não previne, mas é capaz de reduzir o dano intestinal em modelos experimentais de gastrosquise. (11,31) As CEMLAs migram para a placenta e para as ansas intestinais expostas, de forma independente, sugestivo da existência de disseminação direta a partir da bolsa amniótica e disseminação por via hematogénica. (33) A TRASCET tem ainda impacto em aspetos fundamentais do desenvolvimento pulmonar num modelo roedor de HDC. (36)

Nos últimos anos, a TRASCET tornou-se numa das áreas com mais interesse na medicina translacional fetal/pediátrica, dentro do campo da Medicina Regenerativa, e a evidência atual suporta a hipótese de que as CELAs representam uma fonte promissora com enorme potencial no tratamento de diversas anomalias congénitas. Ainda que a translação dos resultados destes estudos experimentais para a clínica possa ser uma tarefa complexa, é altamente provável que os resultados que têm vindo a ser obtidos através de estudos pré-clínicos em modelos animais sejam trasladados para fetos humanos dentro de poucos anos. (2) É imperativo aprofundar o estudo das CELAs e da aplicabilidade da TRASCET, quer em estudos pré-clínicos como clínicos, o que permitirá desenvolver uma nova forma de tratamento (8), mais acessível, custo-efetiva, eficaz e que permita melhorar quer o *outcome* clínico quer a qualidade de vida destas crianças.

7. Perspetivas Futuras

A pesquisa e obtenção de mais dados acerca da TRASCET, juntamente com a informação recolhida até ao presente momento, associada ao princípio biológico em que se baseia esta estratégia terapêutica, suporta a hipótese de que a TRASCET poderá tornar-se, num futuro próximo, numa opção terapêutica prática, acessível, minimamente invasiva e eficiente no tratamento de diversas anomalias congénitas. (10)

Dado os resultados tão promissores da TRASCET em modelos animais, os próximos passos devem passar por reproduzir os modelos laboratoriais das anomalias congénitas já estudadas até ao momento (MMC, incluindo a malformação de Chiari II, gastrosquise e HDC) em modelos animais maiores e mais complexos para a eventual translação clínica da TRASCET em humanos (10,11,23), bem como iniciar estudos pré-clínicos em modelos animais de outras anomalias congénitas, a fim de alargar o espetro de atuação da TRASCET.

O benefício da extensão e do padrão terapêutico em modelos animais maiores e mais complexos e, posteriormente, em humanos, é expectável que dependa de diversas variáveis, nomeadamente a densidade e o volume celular da injeção intraamniótica de CELAs a administrar, o *timing* e o número de injeções e, possivelmente, o eventual refinamento das CELAs *in vitro* antes da sua administração *in vivo*. (2,10) Como tal, é imperativo que, à medida que o estudo da TRASCET se vai alargando, se tenha em consideração tais variáveis.

As CEMLas são as CELAs mais utilizadas nos estudos da TRASCET, quer por se encontrarem em maior número no LA, quer pela facilidade na sua obtenção e perfil de segurança. Porém, alargar a investigação quanto ao potencial terapêutico das CELAs c-kit+ (10), células estaminais com um perfil de diferenciação diferente do das CEMLas, procurando encontrar métodos de isolamento com maior perfil de segurança, mais acessíveis e rápidos, bem como meios de cultura que permitam a sua rápida e numerosa multiplicação, deve fazer parte da investigação futura no campo da TRASCET. Será igualmente necessária uma melhor definição de qual o fenótipo ótimo, dentro do grupo heterogéneo das CELAs, que permita os melhores resultados em cada aplicação clínica. (2,22)

Outros pontos onde as investigações futuras da TRASCET devem incidir incluem o conhecimento acerca do mecanicismo da TRASCET e da base biológica da função parácrina das CELAs, que ainda pouco se sabe (2), assim como a obtenção de dados

relativos à ontogenia e, particularmente, o esclarecimento acerca de qual o destino destas células a longo prazo, incluindo o seu perfil de segurança na mãe e RN. (10,23,34) Dado o potencial benéfico, mas também prejudicial que o microquimerismo fetal poderá ter na circulação materna, aquando da translação clínica da TRASCET, esta deve ser uma questão a incluir durante o aconselhamento maternofetal. (10)

Será igualmente importante determinar a idade gestacional ótima para o isolamento das CELAs, assim como qual a dose e *timing* ótimos para a sua administração. (2,22)

A cultura das CELAs frequentemente requer o uso de reagentes xenogénicos, cuja utilização em humanos é desencorajada ou requer regulação apertada por conselhos de segurança clínica. (2) Daí que seja imperativo encontrar novos reagentes que possuam um bom perfil de segurança.

O progresso da TRASCET é dificultado pela raridade relativa das anomalias congénitas, o que pode dificultar a realização de ensaios clínicos cujos resultados sejam fidedignos. (2) Para garantir a máxima qualidade dos futuros ensaios clínicos, estes deverão estar baseados num único grande centro ou basear-se num esforço colaborativo entre diversos centros. (22)

8. Bibliografia

1. WHO. Birth Defects. [Internet]. Genebra: World Health Organization; 28 de Fevereiro 2022 [citado 16 de Março de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/birth-defects>
2. Kunisaki SM. Amniotic Fluid Stem Cells for the Treatment of Surgical Disorders in the Fetus and Neonate. *Stem Cells Transl Med.* Novembro 2018; 7(11): 767-773. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0018>
3. Our World in Data. Causes of Death in Children under 5, World, 2019. [Internet]. Inglaterra e País de Gales: Global Change Data Lab; 2021 [citado 16 de Agosto de 2021]. Disponível em: <https://ourworldindata.org/grapher/causes-of-death-in-children-under-5>
4. WHO. Global Health Estimates: Life Expectancy and Leading Causes of Death and Disability. [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2022 [citado 16 de Agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
5. WHO. The Top 10 Causes of Death. [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2020 [citado 16 de Agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
6. WHO. Global Health Estimates: Leading Causes of Death. [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2020 [citado 16 de Agosto de 2021]. Disponível em: Global summary estimates
7. WHO. Global Health Estimates: Leading Causes of DALYs. [Internet]. Genebra: World Health Organization; 2020 [citado 16 de Agosto de 2021]. Disponível em: Global summary estimates
8. Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Otani T, Fukutake M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Tanaka M. Human Amniotic Fluid Stem Cells: Therapeutic Potential for Perinatal Patients with Intractable Neurological Disease. *Keio J Med.* Dezembro 2018; 67(4): 57-66. Disponível em: [10.2302/kjm.2017-0019-IR](https://doi.org/10.2302/kjm.2017-0019-IR)
9. Abe Y, Ochiai D, sato Y, Otani T, Fukutake M, Ikenoue S, Kasuga Y, Tanaka M. Amniotic fluid stem cells as a novel strategy for the treatment of fetal and neonatal

neurological diseases. *Placenta*. Janeiro 2021; 104: 247-252. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.01.009>

10. Fauza DO. Transamniotic stem cell therapy: a novel strategy for the prenatal management of congenital anomalies. *Pediatr Res*. Janeiro 2018; 83(1): 241-248. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/pr.2017.228>

11. Feng C, Graham CD, Shieh HF, Brazzo III JA, Connors JP, Rohrer L, Papadakis A, Zurakowski D, Fauza DO. Transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in a leporine model of gastroschisis. *J Pediatr Surg*. Janeiro 2017; 52(1): 30-34. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.10.016>

12. Shieh HF, Tracy SA, Hong CR, Chalphin AV, Ahmed A, Rohrer L, Zurakowski D, Fauza DO. Transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in a rabbit model of spina bifida. *J Pediatr Surg*. Fevereiro 2019; 54(2): 293-296. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.10.086>

13. Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Concise Review: Amniotic Fluid Stem Cells: The Known, the Unknown, and Potential Regenerative Medicine Applications. *Stem Cells*. Julho 2017; 35(7): 1663-1673. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/stem.2553>

14. Fitzsimmons ED, Bajaj T. Embryology, Amniotic Fluid. [Atualizado a 25 Julho de 2021]. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro 2022. [Citado a 23 de Agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541089/>

15. Simoni G, Colognato R. The amniotic fluid-derived cells: the biomedical challenge for the third millennium. *J Prenat Med*. Julho 2009; 3(3):34-6. PMID: 22439040; PMCID: PMC3279105.

16. Borlongan CV. Amniotic fluid as a source of engraftable stem cells. *Brain Circ* [Internet]. 2017 [citado a 7 de Setembro de 2021]; 3(3):175-9. Disponível em: <http://www.braincirculation.org/text.asp?2017/3/3/175/216592>

17. Torricelli F, Brizzi L, Bernabei PA, Gheri G, Di Lollo S, Nutini L, Lisi E, Di Tommaso M, Cariati E. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Ital J Anat Embryol*. Abril-Junho 1993;98(2):119-26. Erratum in: *Arch Ital Anat Embriol*. Julho-Setembro 1993; 98(3):215. PMID: 8239855.

18. Streubel B, Martucci-Ivessa G, Fleck T, Bittner RE. In-vitro-Transformation von Amnionzellen zu Muskelzellen--Hintergründe und Ausblicke [In vitro transformation of amniotic cells to muscle cells--background and outlook]. *Wien Med Wochenschr.* 1996; 146(9-10):216-7. PMID: 9012220
19. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Outubro 2000; 1: 72–76. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35036093>
20. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* Janeiro 2007; 25(1):100-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt1274>
21. Beckmann CRB, Ling FW, Herbert WNP, Laube DW, Smith RP, Casanova R, Chuang A, Goepfert AR, Hueppchen NA, Weiss PM. Beckmann and Ling's *Obstetrics and Gynecology*. 8º ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
22. Baughn C, Campion S, Elbabaa S. Amniotic fluid-derived stem cell potential for therapeutic and surgical use: a review of the literature. *Prenat Diagn.* 2022; 42(2):157-163. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pd.6087>
23. Diogini B, Ahmed A, Brazzo III J, Connors JP, Zurakowski, Fauza DO. Partial or complete coverage of experimental spina bifida by simple intra-amniotic injection of concentrated amniotic mesenchymal stem cells. *J Pediatr Surg.* janeiro 2015; 50(1): 69-73. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.10.004>
24. Kunisaki SM, Fuchs JR, Steigman SA, Fauza DO. A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng.* novembro 2007; 13(11):2633-44. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0407>
25. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod.* julho 2003; 18(7):1489-93. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/deg279>
26. Karlmark KR, Freilinger A, Marton E, Rosner M, Lubec G, Hengstschläger M. Activation of ectopic Oct-4 and Rex-1 promoters in human amniotic fluid cells. *Int J Mol Med.* 2005 Dec;16(6):987-92. PMID: 16273276

27. Jindal A, Chaudhary C. Amniocentesis. [Atualizado a 3 de junho de 2021]. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro 2021. [Citado a 26 de Agosto de 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559247/>
28. Passarudo MMAA. Polihidrâmnios: Uma Revisão Bibliográfica [Dissertação]. [Lisboa]: Faculdade de Medicina Lisboa; Março 2018. 39 p. Disponível em: <https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/42358/1/MariaMPassarudo.pdf>
29. Donovan MF, Bordoni B. Embryology, Yolk Sac. [Atualizado a 7 de fevereiro de 2021]. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro 2021. [Citado a 2 de Setembro de 2021]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555965/>
30. Hoehn H, Bryant EM, Karp LE, Martin GM. Cultivated cells from diagnostic amniocentesis in second trimester pregnancies. II. Cytogenetic parameters as functions of clonal type and preparative technique. *Clin Genet.* Janeiro 1975; 7(1):29-36. PMID: 1167818.
31. Feng C, Graham CD, Connors JP, Brazzo III J, Pan AHS, Hamilton JR, Zurakowski, Fauza DO. Transamniotic stem cell therapy (TRASCET) mitigates bowel damage in a model of gastroschisis. *J Pediatr Surg.* Janeiro 2016; 51(1): 56-61. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.011>
32. Lazow SP, Tracy SA, Chalphin AV, Kycia I, Zurakowski D, Fauza DO. Initial Mechanistic Screening of Transamniotic Stem Cell Therapy in the Rodent Model of Spina Bifida: Host Bone Marrow and Paracrine Activity. *Fetal Diagn Ther.* 2020; 47: 902-911. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000509244>
33. Chalphin AV, Tracy SA, Kycia I, Chan C, Finkelstein A, Zurakowski D, Fauza DO. Donor mesenchymal stem cell kinetics after transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in a rodent model of gastroschisis. *J Pediatr Surg.* Março 2020; 55(3): 482-485. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.11.005>
34. Tracy SA, Chalphin AV, Lazow SP, Kycia I, Finkelstein A, Chan C, Zurakowski, Fauza DO. Postnatal fate of donor mesenchymal stem cells after transamniotic stem cell therapy in a healthy model. *J Pediatr Surg.* Junho 2020; 55(6): 1113-1116. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2020.02.041>

35. Tracy SA, Chalphin AV, Kycia I, Chan C, Finkelstein A, Zurakowski D, Fauza DO. Hematogenous Donor Cell Routing Pathway After Transamniotic Stem Cell Therapy. *Stem Cells Dev.* Junho 2020; 29(12):755-760. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0012>
36. Chalphin AV, Tracy SA, Lazow SP, Kycia I, Zurakowski D, Fauza DO. Congenital diaphragmatic hernia as a potential target for transamniotic stem cell therapy. *J Pediatr Surg.* Fevereiro 2020; 55(2): 249-252. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2019.10.033>
37. Graham CD, Shieh HF, Brazzo JA 3rd, Zurakowski D, Fauza DO. Donor mesenchymal stem cells home to maternal wounds after transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in a rodent model. *J Pediatr Surg.* Junho 2017; 52(6): 1006–1009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.03.027>
38. Shieh HF, Ahmed A, Tracy SA, Zurakowski D, Fauza DO. Fetal bone marrow homing of donor mesenchymal stem cells after transamniotic stem cell therapy (TRASCET). *J Pediatr Surg.* Janeiro 2018; 53(1): 174-177. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2017.10.033>
39. Diogini B, Brazzo III JA, Ahmed A, feng C, Wu Y, Zurakowski, Fauza DO. Transamniotic stem cell (TRASCET) minimizes Chiari-II malformation in experimental spina bifida. *J Pediatr Surg.* Junho 2015; 50(6): 1037-1041. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.03.034>
40. Greene ND, Copp AJ. Neural tube defects. *Annu Rev Neurosci.* 2014; 37:221-42. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1146%2Fannurev-neuro-062012-170354>
41. INSA. Estudo revela ausência de diminuição da prevalência de defeitos do tubo neural na Europa. [Internet]. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge; 23 de Março de 2016. [citado a 5 de Janeiro de 2022]. Disponível em: <http://www2.insa.pt/sites/INSA/Portugues/ComInf/Noticias/Paginas/DefeitostuboneuralEuropa.aspx>
42. EUROCAT. Prevalence Charts and Tables. [Internet]. Bruxelas: European Platform on Rare Disease Registration; 2019 [Atualizado a 3 de Janeiro de 2022; Citado 6 de Janeiro de 2022]. Disponível em: https://eu-rd-platform.jrc.ec.europa.eu/eurocat/eurocat-data/prevalence_en

43. Da Graça LM. Medicina Materno Fetal. 5^oed. Lisboa: Lidel - Edições Técnicas Lda; 2017
44. Adzick NS, Thom EA, Spong CY, Brock JW 3rd, Burrows PK, Johnson MP, Howell LJ, Farrell JA, Dabrowiak ME, Sutton LN, Gupta N, Tulipan NB, D'Alton ME, Farmer DL; MOMS Investigators. A randomized trial of prenatal versus postnatal repair of myelomeningocele. *N Engl J Med*. Março 2011; 364(11): 993-1004. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1056%2FNEJMoa1014379>
45. Abe Y, Ochiai D, Masuda H, Sato Y, Otani T, Fukutake M, Ikenoue S, Miyakoshi K, Okano H, Tanaka M. In Utero Amniotic Fluid Stem Cell Therapy Protects Against Myelomeningocele via Spinal Cord Coverage and Hepatocyte Growth Factor Secretion. *Stem Cells Transl Med*. Novembro 2019; 8(11): 1170-1179. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0002>
46. Farmer DL, Thom EA, Brock JW 3rd, Burrows PK, Johnson MP, Howell LJ, Farrell JA, Gupta N, Adzick NS, Management of Myelomeningocele Study Investigators. The Management of Myelomeningocele Study: full cohort 30-month pediatric outcomes. *American journal of obstetrics and gynecology*. Fevereiro 2018; 218(2): 256.e1-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.001>
47. Danzer E, Kiddoo DA, Redden RA, Robinson L, Radu A, Zderic SA, Doolin EJ, Adzick NS, Flake AW. Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele. *Am J Physiol Renal Physiol*. Janeiro 2007; 292(1):197-206. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00001.2006>
48. Shen J, Zhou G, Chen H, Bi Y. Morphology of nervous lesion in the spinal cord and bladder of fetal rats with myelomeningocele at different gestational age. *J Pediatr Surg*. Dezembro 2013; 48(12): 2446-52. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2013.08.021>
49. Feng C, D Graham C, Connors JP, Brazzo J 3rd, Zurakowski D, Fauza DO. A comparison between placental and amniotic mesenchymal stem cells for transamniotic stem cell therapy (TRASCET) in experimental spina bifida. *J Pediatr Surg*. Junho 2016; 51(6): 1010-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.02.071>
50. Sun Q, Li F, Li H, Chen RH, Gu YZ, Chen Y, Liang HS, You XR, Ding SS, Gao L, W YL, Qin MD, Zhang XG. Amniotic fluid stem cells provide considerable advantages in

epidermal regeneration: B7H4 creates a moderate inflammation microenvironment to promote wound repair. *Sci Rep.* Junho 2015; 5(11560). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep11560>

51. Garcia O, Carraro G, Turcatel G, Hall M, Sedrakyan S, Roche T, Buckley S, Driscoll B, Perin L, Warburton D. Amniotic fluid stem cells inhibit the progression of bleomycin-induced pulmonary fibrosis via CCL2 modulation in bronchoalveolar lavage. *PLoS One.* Agosto 2013; 8(8): e71679. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071679>

52. Yang DY, Sheu ML, Su HL, Cheng FC, Chen YJ, Chen CJ, Chiu WT, Yiin JJ, Sheehan J, Pan HC. Dual regeneration of muscle and nerve by intravenous administration of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells regulated by stromal cell-derived factor-1 α in a sciatic nerve injury model. *J Neurosurg.* Junho 2012; 116(6): 1357-1367. Disponível em: <https://doi.org/10.3171/2012.2.jns111360>

53. Fukutake M, Ochiai D, Masuda H, Abe Y, Sato Y, Otani T, Sakai S, Aramaki-Hattori N, Shimoda M, Matsumoto T, Miyakoshi K, Kanai Y, Kishi K, Tanaka M. Human amniotic fluid stem cells have a unique potential to accelerate cutaneous wound healing with reduced fibrotic scarring like a fetus. *Hum Cell.* Janeiro 2019; 32(1): 51-63. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13577-018-0222-1>

54. Yoon BS, Moon JH, Jun EK, Kim J, Maeng I, Kim JS, Lee JH, Baik CS, Kim A, Cho KS, Lee JH, Lee HH, Whang KY, You S. Secretory profiles and wound healing effects of human amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* Junho 2010; 19(6): 887-902. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0138>

55. Trounson A. A fluid means of stem cell generation. *Nat Biotechnol.* Janeiro 2007; 25(1): 62-63. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt0107-62>

56. Turner CG, Klein JD, Wang J, Thakor D, Benedict D, Ahmed A, Teng YD, Fauza DO. The amniotic fluid as a source of neural stem cells in the setting of experimental neural tube defects. *Stem Cells Dev.* Fevereiro 2013; 22(4): 548-553. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0215>

57. Pennington EC, Gray FL, Ahmed A, Zurakowski D, Fauza DO. Targeted quantitative amniotic cell profiling: a potential diagnostic tool in the prenatal management of neural tube defects. *J Pediatr Surg.* Junho 2013; 48(6): 1205-1210. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2013.03.009>

58. Pennington EC, Rialon KL, Dionigi B, Ahmed A, Zurakowski D, Fauza DO. The impact of gestational age on targeted amniotic cell profiling in experimental neural tube defects. *Fetal Diagn Ther.* 2015; 37(1): 65-69. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000362811>
59. Turner CG, Pennington EC, Gray FL, Ahmed A, Teng YD, Fauza DO. Intra-amniotic delivery of amniotic-derived neural stem cells in a syngeneic model of spina bifida. *Fetal Diagn Ther.* 2013; 34(1): 38-43. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000350267>
60. Chandrasekharan PK, Rawat M, Madappa R, Rothstein DH, Lakshminrusimha S. Congenital Diaphragmatic Hernia – a review. *Matern health, neonatol and perinatol.* Março 2017. 3(6). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40748-017-0045-1>
61. Dumpa V, Chandrasekharan P. Congenital Diaphragmatic Hernia. [Atualizado em 11 de agosto de 2021]. Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Citado a 20 de setembro de 2021]. Janeiro 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556076/>
62. Pederiva F, Ghionzoli M, Pierro A, De Coppi P, Tovar JA. Amniotic fluid stem cells rescue both in vitro and in vivo growth, innervation, and motility in nitrofen-exposed hypoplastic rat lungs through paracrine effects. *Cell Transplant.* 2013; 22(9): 1683-1694. Disponível em: <https://doi.org/10.3727/096368912x657756>
63. Di Bernardo J, Maiden MM, Hershenson MB, Kunisaki SM. Amniotic fluid derived mesenchymal stromal cells augment fetal lung growth in a nitrofen explant model. *J Pediatr Surg.* Junho 2014; 49(6): 859-865. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2014.01.013>
64. Pozzobon M, Russo FM, Richter J, Vandersloten PJ, Verbeken E, De Coppi P, Deprest J. The use of human amniotic fluid stem cells as an adjunct to promote pulmonary development in a rabbit model for congenital diaphragmatic hernia. *Prenat Diagn.* Setembro 2015; 35(9): 833-40. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pd.4621>
65. Chang R, Andreoli S, Ng YS, Truong T, Smith SR, Wilson J, D'Amore PA. VEGF expression is downregulated in nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg.* Junho 2004; 39(6): 825-828. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.02.015>
66. Hara A, Chapin CJ, Ertsey R, Kitterman JA. Changes in Fetal Lung Distension Alter Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Isoforms in Developing Rat

Lung. *Pediatric Research*. Julho 2005; 58(1): 30–37. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000163614.20031.C5>

67. Oue T, Yoneda A, Shima H, Taira Y, Puri P. Increased vascular endothelial growth factor peptide and gene expression in hypoplastic lung in nitrofen induced congenital diaphragmatic hernia in rats. *Pediatric Surgery International*. Maio 2002; 18(4): 221–226. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003830100625>

68. Teramoto H, Yoneda A, Puri P. Gene expression of fibroblast growth factors 10 and 7 is downregulated in the lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J Pediatr Surg*. 2003; 38(7):1021–1024. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0022-3468\(03\)00183-0](https://doi.org/10.1016/s0022-3468(03)00183-0)

69. Bhat V, Moront M, Bhandari V. Gastroschisis: A State-of-the-Art Review. *Children (Basel)*. Dezembro 2020; 7(12): 302. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fchildren7120302>

70. Rentea RM, Gupta V. Gastroschisis. [Atualizado a 20 de novembro de 2021]. Em: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; Janeiro 2022. [Citado a 16 de janeiro de 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557894/?report=classic>

71. Braz P, Machado A, Roquette R, Dias CM. Registo Nacional de Anomalias Congénitas: 11 anos de vigilância em Portugal. Lisboa: INSA, IP; Maio 2015

72. Midrio P, Stefanutti G, Mussap M, D'Antona D, Zolpi E, Gamba P. Amnioexchange for fetuses with gastroschisis: is it effective? *J Pediatr Surg*. Maio 2007; 42(5): 777-782. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2006.12.029>

73. Goncalves FL, Bittencourt DG, Velloso LA, Schmidt AF, Gallindo RM, Sbragia L. Corticosteroid effect upon intestinal and hepatic interleukin profile in a gastroschisis rat model. *Acta Cir Bras*. 2013; 28(1): 8–12. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-86502013001300003>