

## **Células Estaminais em Obstetrícia e Ginecologia – Parte II: Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical**

Margarida Vieira, André Gomes, Gonçalo Castelo-Branco, Luís Gomes, Raul Santos

*Crioestaminal*

*E-mail: info@crioestaminal.pt*

### **RESUMO**

O sangue do cordão umbilical contém células estaminais hematopoiéticas com capacidade de diferenciação em células da linhagem sanguínea. Nos últimos 15 anos as células estaminais do sangue do cordão umbilical têm sido usadas como alternativa às células da medula óssea no tratamento de diversas doenças hematológicas e/ou oncológicas. A recolha do sangue do cordão umbilical, usualmente descartado após o parto, não envolve quaisquer riscos, nem para o recém-nascido nem para a mãe, sendo um processo indolor e de fácil execução. A Crioestaminal foi pioneira em Portugal a oferecer o serviço de criopreservação de células estaminais, em parceria com a Cryo-Save, empresa conceituada com vasta experiência no mercado europeu e cujos laboratórios são acreditados segundo a norma ISO EN 17025. O sangue do cordão umbilical é recolhido para um saco de sangue esterilizado e posteriormente enviado para o laboratório onde é processado, procedendo-se ao isolamento das células estaminais e sua criopreservação, para uso futuro, em caso de necessidade.

### **SUMMARY**

Umbilical cord blood contains hematopoietic stem cells, which can give rise to all types of blood cells in the body. In the last 15 years umbilical cord blood stem cells have been used as an alternative to bone marrow cells, to treat several haematological/oncological diseases. Collection of umbilical cord blood is painless and does not involve any risk, neither for the newborn nor for his mother. Besides, transplantation of umbilical cord blood offers several advantages over bone marrow transplants. Crioestaminal was pioneer in offering umbilical cord blood cryopreservation to Portuguese families, in partnership with the prestigious European company, Cryo-Save, whose laboratories are accredited according to ISO EN 17025. Umbilical cord blood is collected into a sterile bag and transported to the laboratory where processing occurs. Then, stem cells are isolated from the umbilical cord blood and cryopreserved for future use, in case of need.

#### **1. TRANSPLANTE COM CÉLULAS ESTAMINAIS DO CORDÃO UMBILICAL – –COMPARAÇÃO COM A MEDULA ÓSSEA.**

As células estaminais diferem das restantes células do organismo por se poderem diferenciar em diversos tipos celulares, tendo igualmente a capacidade de se

auto-renovar e dividir indefinidamente. No organismo adulto é possível isolar células estaminais a partir de tecidos como a medula óssea, o sangue, o tecido adiposo, bem como a partir da pele, do fígado, do pâncreas e de outros órgãos. Estas células, de origem não embrionária, consideram-se células estaminais adultas e constituem uma “reserva” celular do

organismo quando ocorre lesão ou remodelação de tecidos. Geralmente, as células estaminais adultas dão origem aos tipos celulares dos tecidos de onde são provenientes. Uma outra fonte de células estaminais é o sangue do cordão umbilical, que contém células estaminais hematopoiéticas, que se podem diferenciar em células da linhagem sanguínea, e igualmente outros tipos de células estaminais.

O transplante de células estaminais hematopoiéticas do sangue do cordão umbilical é uma das terapias disponíveis para tratamento de doenças hematológicas/oncológicas<sup>1</sup> – na tabela 1 encontram-se algumas doenças tratadas com estas células. Até à data foram realizados entre 5000 a 6000 transplantes com células estaminais do sangue do cordão umbilical<sup>2-4</sup>, um terço dos quais em adultos. O transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical oferece vantagens importantes relativamente ao transplante de medula óssea, tais como disponibilidade imediata das células para transplantação, menor risco de infecção com agentes infecciosos e maior tolerância na histocompatibilidade HLA (de 1 a 3 discrepâncias). O transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical reduz ainda o risco de doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD), comparativamente ao transplante com células da medula óssea<sup>5-7</sup>.

Apesar da concentração de células estaminais no sangue do cordão umbilical ser elevada, o volume de sangue normalmente recolhido é inferior ao volume processado a partir da medula óssea de um adulto, pelo que a quantidade real de células obtidas a partir do sangue do cordão umbilical é menor. Esta limitação pode condicionar o transplante de sangue do cordão umbilical em adultos, pois o peso do paciente determina o nº de células estaminais necessárias para o transplante, daí que o maior nº de transplantes com células estaminais do sangue do cordão umbilical se efectue em crianças ou adultos de baixo peso. Dado que uma das condicionantes do sangue do cordão umbilical é o seu número limitado de células estaminais, existem actualmente alguns grupos de investigação a desenvolver protocolos de expansão que permitam aumentar o número de células estaminais hematopoiéticas<sup>8-10</sup>. Têm também sido adoptadas outras estratégias para aumentar o nº de células transplantadas, tais como o

transplante sequencial de duas unidades de sangue do cordão umbilical, a combinação de transplante de sangue do cordão e medula óssea haplo-idêntica ou a co-infusão com células estaminais mesenquimais<sup>11</sup>.

## 2. BANCOS DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Desde a realização do primeiro transplante com sangue do cordão umbilical em 1988, por uma equipa franco-americana, numa criança com anemia de Fanconi<sup>12</sup>, algumas instituições públicas e privadas tomaram a iniciativa de criar bancos para armazenamento de amostras de sangue do cordão umbilical para futuro uso em transplantes heterólogos (sendo o dador uma outra pessoa que não o paciente) ou autólogos (em que o paciente utiliza as suas próprias células anteriormente criopreservadas).

Existem dois modelos principais de bancos de sangue do cordão umbilical: os bancos públicos e os bancos familiares ou privados<sup>13</sup>. Os bancos de sangue do cordão umbilical públicos armazenam unidades de sangue do cordão umbilical doadas altruisticamente pelos pais – estas unidades passam a estar disponíveis para uso heterólogo, por qualquer pessoa que necessite de um transplante. Os bancos privados armazenam unidades de sangue do cordão umbilical para uso autólogo ou heterólogo no contexto familiar. As amostras armazenadas são propriedade do dador, não estando disponíveis para uso geral na comunidade, nem para investigação científica. Em Portugal não existe, até à data, nenhum banco público de sangue do cordão umbilical que se dedique à recolha e criopreservação de amostras, apesar de notícias recentes darem conta da possibilidade de criação de um banco público no nosso país. A Crioestaminal – Saúde e Tecnologia SA, foi pioneira em Portugal a oferecer o serviço de criopreservação de células estaminais, para uso autólogo ou heterólogo no seio da família.

As células estaminais do sangue do cordão umbilical armazenadas em bancos privados podem ser utilizadas pelo próprio ou por irmãos ou familiares compatíveis – as unidades armazenadas nestes bancos têm sido utilizadas maioritariamente em transplantes entre irmãos. Um estudo de 2004 indica que o nº de

transplantes efectuados com células estaminais criopreservadas em bancos privados nos Estados Unidos da América cresceu 29% entre 2003 e 2004<sup>14</sup>. Num contexto autólogo, o nº de transplantes realizados é ainda pequeno. Os dados mais recentes apontam para pelo menos 14 transplantes autólogos, a maioria para tratamento de doenças como retinoblastoma, neuroblastoma e anemia aplástica adquirida<sup>15</sup>. Tendo em conta que os bancos de sangue de cordão umbilical familiares são uma realidade recente (o primeiro foi criado nos EUA em 1992), os dados actuais reportam-se, naturalmente, ao uso terapêutico num contexto exclusivamente pediátrico. Uma vez que as amostras de sangue do cordão podem ser preservados por longos períodos<sup>16</sup>, a possibilidade de uma criança vir a utilizar as suas células quando adulta, irá certamente

aumentar o espectro de aplicações, bem como o nº de transplantes autólogos. Por outro lado, a possibilidade de utilização para tratamento de doenças do foro não-hematológico, como as doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças gastrointestinais, disfunções hepáticas e lesões vasculares, vem potenciar o uso futuro das células estaminais do sangue do cordão umbilical no contexto autólogo<sup>17-21</sup>. Diversos estudos utilizando células estaminais do sangue do cordão umbilical em modelos animais têm conduzido a resultados muito promissores ao nível do tratamento de doenças cardiovasculares e nervosas<sup>22, 23</sup>. Num artigo recente foi relatado o transplante de células estaminais multipotentes do sangue do cordão umbilical numa mulher paraplégica com lesões na espinal-medula. Três

**Tabela 1**

**Doenças tratadas com células estaminais do sangue do cordão umbilical**

<p><b>Doenças malignas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Leucemia linfóide aguda</li> <li>• Leucemia mielóide aguda</li> <li>• Leucemia mielóide crónica</li> <li>• Leucemia mielóide crónica juvenil</li> <li>• Linfoma de Burkitt</li> <li>• Liposarcoma</li> <li>• Síndrome Mielodisplásico</li> <li>• Tumores sólidos (ex.: neuroblastoma ou retinoblastoma)</li> <li>• Doença de Hodgkin refractária</li> <li>• Linfoma Não-Hodgkin</li> </ul> <p><b>Hemoglobinopatias:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Talassémia (anemia de Cooley)</li> <li>• Anemia das células falciformes</li> </ul> <p><b>Imunodeficiências:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Omenn</li> <li>• Deficiências imunitárias combinadas severas</li> <li>• Disgénese reticular</li> <li>• Displasia tímica</li> <li>• Leucodistrofia celular globóide</li> <li>• Síndrome de Wiskott Aldrich</li> <li>• Síndrome Linfoproliferativo ligado ao cromossoma</li> </ul>	<p><b>Deficiências medulares:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Anemia aplástica</li> <li>• Anemia aplástica idiopática</li> <li>• Síndrome Blackfan-Diamond</li> <li>• Disqueratosis congénita</li> <li>• Anemia de Fanconi</li> <li>• Trombocitopenia amegacariocítica</li> <li>• Síndrome de Kostmann</li> </ul> <p><b>Doenças metabólicas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Adrenoleucodistrofia</li> <li>• Doença de Batten</li> <li>• Doença de Gunther</li> <li>• Doença de Krabbe</li> <li>• Síndrome de Hunter</li> <li>• Síndrome de Hurler</li> <li>• Síndrome de Lesch-Nyhan</li> <li>• Síndrome de Maroteaux-Lamy</li> </ul> <p><b>Outras doenças:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Evans</li> <li>• Osteopetrose</li> <li>• Histiocitose das células de Langerhans</li> </ul>
---	--

Lista elaborada a partir de artigos científicos recentemente publicados nas revistas *Biology of Blood and Marrow Transplantation* da Sociedade Americana para Transplantação de Medula e Sangue e *British Medical Journal*, e do livro *Cord Blood: Biology, Immunology, Banking and Clinical Transplantation*, da Associação Americana de Bancos de Sangue. Para além destas doenças, muitas outras encontram-se neste momento em ensaios clínicos, nomeadamente mieloma múltiplo (para lista completa, ver em <http://www.parentsguidecordblood.com/diseases.shtml>)

semanas após o transplante a paciente recuperou alguns movimentos e os seus nervos sensoriais e motores mostraram sinais de melhoria evidentes<sup>24</sup>.

### 3. A CRIOESTAMINAL

A Crioestaminal é uma empresa de biotecnologia que presta serviços na área da saúde, nomeadamente o serviço de isolamento e criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical, tendo iniciado a sua actividade em 2003, numa parceria com a conceituada empresa belga Cryo-Save. É nesta empresa que é efectuado o isolamento das células estaminais e a sua criopreservação, sendo os seus laboratórios acreditados segundo a norma ISO EN 17025, seguindo os mais elevados padrões de qualidade e respeitando todas as exigências legais, o que garante um rigoroso controlo de todos os processos. Graças a estes elevados padrões de qualidade, a Cryo-Save é líder do mercado europeu nesta área e encontra-se em forte expansão, prestando já este serviço em vários países como o Reino Unido, Bélgica, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Suíça, Dinamarca, Noruega e Grécia. A Crioestaminal, em parceria com a *Cryo-Save*, iniciou em 2005 a montagem do seu laboratório de processamento, isolamento e criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical, o que lhe permitirá, a curto prazo, desenvolver a totalidade do serviço em Portugal.

### 4. RECOLHA DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL E CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS

Hoje em dia o processo de recolha do sangue do cordão umbilical é um procedimento de rotina em muitas salas de parto, dado que é cada vez maior o nº de famílias que opta pelo armazenamento das células estaminais do sangue do cordão umbilical dos seus filhos.

#### 4.1 Procedimento para a colheita

Os pais interessados em aderir ao serviço devem contactar a Crioestaminal para que lhes seja fornecido um *kit* com todo o material necessário para efectuar a recolha do sangue do cordão umbilical, bem como

uma descrição pormenorizada de todo o procedimento. O *kit* deve ser levado pelos pais para a sala de partos para poder ser efectuada a recolha imediatamente após o nascimento da criança (parto normal ou cesariana) e antes da expulsão da placenta (sem alteração aos procedimentos normais do parto). O procedimento de recolha do sangue não demora mais do que 5 minutos e todo o material necessário para que a colheita seja efectuada da melhor forma e com toda a segurança estão contidos no *kit* disponibilizado. Depois de recolhido o sangue é transportado para o laboratório para se proceder ao isolamento e criopreservação das células estaminais.

#### 4.2 Processamento da amostra

Após a chegada do sangue do cordão umbilical é dado início ao processo de isolamento e criopreservação das células estaminais. Em primeiro lugar é feito um teste bacteriológico para verificar se ocorreu contaminação do sangue durante o procedimento de recolha e envio. De seguida, procede-se ao isolamento das células estaminais e a um teste da vitalidade das células (número de células vivas após o transporte). A qualidade da amostra é definida medindo a quantidade de células mononucleadas e células estaminais/progenitoras hematopoiéticas (CD34+) nela presentes (a Crioestaminal disponibiliza aos pais informações relativas a estes 2 parâmetros e ao volume de sangue recolhido). Segundo vários artigos científicos, a taxa de sucesso de transplantes de sangue do cordão umbilical é mais elevada quando o transplante é efectuado com um número de células mononucleadas maior ou igual a 15 milhões de células por kg<sup>5, 25</sup>. Quando o número de células estaminais CD34+ presente na amostra é inferior a 100 mil, o seu número será provavelmente demasiado baixo para ser usado num transplante. Neste caso, as células são criopreservadas para serem expandidas no futuro caso seja possível e não são cobrados os serviços de processamento e criopreservação da amostra. Se a amostra tiver um número de células CD34+ inferior a 20 mil, as células não são criopreservadas. Caso reúnam as condições necessárias, de acordo com o que foi referido, as células estaminais presentes na amostra são guardadas em azoto líquido a 196°C negativos.

As células criopreservadas podem ser pedidas a qualquer altura à Crioestaminal. Para tal, será apenas necessário que o próprio ou os pais/tutores e o médico as requisitem por escrito.

## REFERÊNCIAS

- Ballen K: New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood*, 105(10):3786-92, 2005.
  - <https://office.de.netcord.org>
  - [www.nationalcordbloodprogram.org](http://www.nationalcordbloodprogram.org)
  - Gluckman PE: Beneficence of stem cells from cord blood *in Euroconference on stem cell research*, Cascais, Portugal, 2005.
  - Barker JN, Wagner JE : Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol*, 14: 160-164, 2002.
  - Lewis ID: Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Intern Med J*, 32: 601-609, 2002.
  - Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, Bacigalupo A, Piaggio G, Locatelli F: Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood*, 102(3):1138-4, 2003.
  - Tanavde VM, Malehorn MT, Lumkul R, Gao Z, Wingard J, Garrett ES, Civin CI: Human stem-progenitor cells from neonatal cord blood have greater hematopoietic expansion capacity than those from mobilized adult blood. *Exp Hematol*, 30:816-823, 2002.
  - De Angeli S, Di Liddo R, Buoro S, Toniolo L, Conconi MT, Belloni AS, Parnigotto PP, Nussdorfer GG: New immortalized human stromal cell lines enhancing *in vitro* expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int. J. Mol. Med*, 13:363-371, 2004.
  - McNiece I: Ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 32(5):409-10, 2004.
  - Robinson S, Niu T, de Lima M, Ng J, Yang H, McMannis J, Karandish S, Sadeghi T, Fu P, del Angel M, O'Connor S, Champlin R, Shpall E: Ex vivo expansion of umbilical cord blood. *Cytotherapy*, 7(3):243-50, 2005.
  - Gluckman E., Broxmeyer H., Auerbach A et al: Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New Eng J Med*, 321: 1174-8, 1989.
  - [www.parentsguidecordblood.com](http://www.parentsguidecordblood.com)
  - Nietfeld & Verter: Statistics of autologous cord blood storage and use. 6th International Cord Blood Society Congress, Boston, USA, 2004.
  - Committee on Establishing a National Cord Blood Stem Cell Bank Program, Institute of Medicine of the National Academies of the United States of America, Abril 2005
  - Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM: High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *P Natl Acad Sci USA*, 100 (2): 645-50, 2003.
  - Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T et al: Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematol Stem Cell*, 12 (3): 255-70, 2003.
  - Saporta S, Kim JJ, Willing AE et al: Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematol Stem Cell*, 12 (3): 271-8, 2003.
  - Wang X, Ge S, McNamara G et al: Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood*, 101 (10): 4201-8, 2003.
  - Ende N, Chen R, Reddi AS: Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 325(3):665-9, 2004.
  - Ma N, Stamm C, Kaminski A et al: Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*, 66(1):45-54, 2005.
  - Ott I, Keller U, Knoedler M et al: Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J*, 19(8):992-4, 2005.
  - Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, et al: Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke*, 35(10):2390-5, 2004.
  - Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H: A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*, 7(4):368-73, 2005.
  - Moretta A, Maccario R, Fagioli F, Giraldo E, Busca A, Montagna D, Miniero R, Comoli P, Giorgiani G, Zecca M, Pagani S, Locatelli F: Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol*, 29: 371-379, 2001.
-