

## Células estaminais em Obstetrícia e Ginecologia

### Parte I: Conceitos gerais e aplicações

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

*Crioestaminal*

#### RESUMO

Células estaminais (CE) são células que se podem diferenciar em diversos tipos celulares, tendo igualmente a capacidade de se auto-renovar e dividir indefinidamente. As CE embrionárias podem ser obtidas a partir de embriões na fase de blastocisto e podem dar origem a todos os tipos celulares das diversas linhagens embrionárias. Por outro lado, é possível o isolamento de CE a partir de vários tecidos adultos (como a medula óssea, sangue, pâncreas e outros tecidos), bem como do sangue do cordão umbilical e da placenta. Estas CE têm geralmente um potencial de diferenciação mais limitado, dando origem a tipos celulares presentes no seu tecido de origem. Em ginecologia/obstetrícia as células estaminais podem ter aplicações a vários níveis: 1. Em terapia de suporte para o tratamento de tumores sólidos como o cancro da mama ou do ovário; 2. No tratamento de doenças hematológicas do feto, por transplante *in útero*; 3. Em diagnóstico e terapia celular durante a gravidez, dado que existem evidências de que células estaminais fetais circulam no sangue materno; 4. Em inúmeras aplicações terapêuticas ao nível das doenças hemato-oncológicas, dado o sangue do cordão umbilical, normalmente descartado após o parto, conter células estaminais hematopoiéticas.

#### SUMMARY

Stem cells are cells capable of unlimited self-renewal with the ability to give rise to different cell lineages. Embryonic stem cells derived from the inner mass of blastocysts are pluripotent cells and give rise to all embryonic tissue types *in vitro*. On the other hand, adult stem cells, which can be derived from adult tissues, have a limited differentiation capacity and, in generally, can yield specialized cell types of their tissue of origin. In the context of gynecology/obstetrics, stem cells can have a variety of applications: 1. In supportive therapy for the treatment of solid tumors, like breast or ovary cancer; 2. In the treatment of haematological fetal diseases, by stem cell transplantation *in utero*. 3. In diagnosis and cell therapy during pregnancy, as there are evidences that fetal stem cells circulate in maternal blood; 4. In therapeutical approaches for haematological/oncological diseases using umbilical cord blood, which is usually discarded after birth, as a source of hematopoietic stem cells.

#### 1. CÉLULAS ESTAMINAIS – ORIGEM E CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO

As células estaminais (CE) distinguem-se das restantes células do organismo por apresentarem três características: a) são células indiferenciadas e não

especializadas; b) têm a capacidade de se auto-renovar e dividir indefinidamente; c) são capazes de se diferenciar em linhagens celulares distintas<sup>1</sup>.

Existem diversos tipos de CE que podem ser classificadas em função da sua origem e/ou da sua capacidade de diferenciação – assim as CE podem

ser **totipotentes**, **pluripotentes** ou **multipotentes**. As células iniciais resultantes da divisão celular do ovo recém-formado são **totipotentes**, o seu potencial é ilimitado e podem dar origem a qualquer tipo de célula. Ao 4º dia de fertilização as células totipotentes começam a especializar-se formando o blastocisto, um agregado de mais de 100 células, das quais é possível retirar a camada interna. Estas células da massa interna do blastocisto continuam a ter elevada capacidade de diferenciação, podendo dar origem a qualquer tipo de tecido do organismo, à excepção da placenta e dos tecidos de suporte do útero. Deste modo, as células obtidas a partir do interior do blastocisto não são consideradas totipotentes, mas sim **pluripotentes** - isoladas não têm a capacidade de originar um indivíduo, mesmo quando colocadas num útero. O conjunto de células da massa interna do blastocisto é a fonte das chamadas **CE embrionárias**<sup>2</sup>.

Também são consideradas pluripotentes as CE isoladas de linhas germinativas embrionárias, obtidas a partir de tecidos fetais. À medida que as células pluripotentes se especializam, passam a constituir tecidos específicos e o potencial das CE passa a ser mais restrito, dizendo-se então **multipotentes**<sup>1-3</sup>.

No organismo adulto é possível isolar CE multipotentes a partir de tecidos como a medula óssea, o sangue, tecido adiposo, bulbo dentário, bem como a partir da pele, do fígado, do pâncreas e de outros órgãos. Estas células de origem não embrionária consideram-se CE somáticas ou **CE adultas** e parecem constituir uma “reserva” celular do organismo quando ocorre lesão ou remodelação de tecidos.

Uma outra fonte de CE é o sangue do cordão umbilical que contém CE hematopoiéticas com grande potencial proliferativo. Na altura do nascimento o sangue fetal existente no cordão umbilical pode ser recuperado. A amostra de sangue recolhida é rica em células estaminais, actualmente usadas para fins terapêuticos. Existem em muitos países instituições públicas e privadas com programas de recolha de sangue do cordão umbilical para criopreservação e futuro uso terapêutico em transplantes - os chamados Bancos de Sangue de Cordão. A Crioestamina é o 1º banco português de sangue do cordão umbilical para uso autólogo ou heterólogo no seio da família.

Nos últimos 15 anos as CE do sangue do cordão umbilical têm sido usadas como alternativa às células da medula óssea no tratamento de diversas doenças hematológicas e/ou oncológicas, oferecendo vantagens importantes em relação aos transplantes de medula óssea. Algumas das vantagens são um risco menor de doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD) aguda, menor risco de infecção com agentes infecciosos e maior tolerância no teste de compatibilidade HLA (de 1 a 2 discrepâncias), o que permite a doação das CE a um grupo mais alargado de pacientes<sup>4,5</sup>.

## 2. POTENCIALIDADES E APLICAÇÕES

Algumas das potenciais aplicações das células estaminais são:

- a) **Em investigação básica e aplicada** - no estudo dos factores e mecanismos genéticos que determinam a diferenciação celular e a especialização dos tecidos; na identificação da origem bioquímica de algumas doenças resultantes da divisão celular anormal ou da deficiência nos mecanismos de diferenciação.
- b) **Na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de novas drogas** - as CE podem ser usadas como modelos celulares para testar o efeito ou a toxicidade de fármacos, em substituição ou complemento dos sistemas *in vitro* ou dos modelos animais.
- c) **Em terapia celular, nas mais variadas doenças** - a terapia com CE é já utilizada em diversas doenças causadas pela disfunção de tecidos ou órgãos, ou degeneração e morte celular e poderá, no futuro, ser alargada ao tratamento de outras doenças, tais como Parkinson's, Alzheimer's, diabetes, doenças cardíacas ou diferentes tipos de cancro..
- d) **Em terapia génica, associada a terapia celular** - as CE podem ainda ser usadas como vectores de terapia génica; é possível, por técnicas de genética molecular, introduzir novos genes em

**anúncio**  
**Crioestaminal**

células estaminais, que quando introduzidas no indivíduo se podem diferenciar em células do tecido alvo, repondo a “funcionalidade” dos genes correspondentes que se encontram mutados.

A possibilidade do uso de CE em medicina humana como instrumento terapêutico tem suscitado muito interesse, sendo alvo de intensa discussão na comunidade científica. Em 1998, cientistas da Universidade de Wisconsin isolaram, pela primeira vez, CE embrionárias humanas a partir da massa interna de blastocistos, conseguindo cultivá-las e mantê-las em cultura por largos períodos. Estas células, sob condições apropriadas, deram origem a vários tipos celulares, desde células nervosas a células ósseas ou musculares<sup>6</sup>. A capacidade que as CE embrionárias possuem de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares, torna-as excelentes candidatas para poderem ser usadas em terapia celular no campo da medicina regenerativa.

As CE embrionárias humanas podem originar-se a partir de embriões excedentários provenientes da fertilização *in vitro*. No entanto, para além dos problemas éticos relacionados com o uso de células derivadas de embriões humanos, existem algumas questões técnicas que limitam a utilização clínica das CE embrionárias. Dada a condicionante da compatibilidade HLA requerida entre as células transplantadas e o hospedeiro (para evitar rejeição pelo sistema imunitário), seria preciso criar bancos de linhas celulares embrionárias, de modo a permitir o uso alargado para todos os indivíduos<sup>7</sup>. No entanto, a quantidade de blastocistos humanos disponíveis actualmente para a criação de linhas de CE embrionárias é limitada, tornando difícil o estabelecimento de bancos de células embrionárias para serem usados por toda a população. Até ao momento estão estabelecidas 78 linhas celulares de CE embrionárias, registadas no NIH (<http://escr.nih.gov/>), para além de outras linhas celulares originadas posteriormente a Agosto de 2001 e que podem ser utilizadas em países com legislações mais liberais que os Estados Unidos da América.

Outra alternativa para a obtenção de CE embrionárias é a transferência nuclear de células somáticas ou **clonagem terapêutica**<sup>8</sup>. Através deste método é

possível obter uma célula pluripotencial a partir de uma célula somática. O núcleo de uma célula adulta (p.ex. da pele) é retirado e transferido para um óvulo ao qual previamente foi removido o núcleo. A activação com choques eléctricos e agentes químicos estimula a divisão celular até à fase de blastocisto. Da massa celular interna do blastocisto são retiradas células que, sob condições apropriadas, se podem diferenciar em muitos tecidos humanos. A probabilidade de rejeição no caso de transplante é mínima, pois as células usadas são originárias do próprio indivíduo. Assim, através da clonagem terapêutica podem obter-se linhas de CE embrionárias autólogas para transplante. As limitações deste procedimento prendem-se com a reduzida eficiência da técnica, aliada à necessidade de criação de “bancos” de ovócitos, sendo que eticamente se levantam também alguns obstáculos<sup>8</sup>. Em 2004, foi efectuada a primeira transferência nuclear somática usando ovócitos humanos, por um grupo de investigadores da Coreia do Sul<sup>9</sup>. O mesmo grupo conseguiu, já este ano, reproduzir a mesma técnica com taxas de sucesso mais elevadas, o que poderá impulsionar no futuro a uma maior utilização desta tecnologia para a obtenção de CE embrionárias humanas<sup>10</sup>.

A descoberta de que também os tecidos adultos possuem CE com capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, sugere que outras fontes de células estaminais, que não as embrionárias, possam ser usadas em terapia celular. Em 2002, foi isolada uma subpopulação de CE mesenquimais pluripotentes da medula óssea, ou seja, CE capazes de se diferenciarem em diversos tipos celulares do organismo adulto, desde hepatócitos a células musculares<sup>11</sup>. CE com propriedades semelhantes, foram recentemente identificadas no sangue do cordão umbilical<sup>12,13</sup>. As células presentes no sangue do cordão umbilical podem, deste modo, dar origem não só a células do sistema hematopoiético, mas também a células de outras linhagens celulares, como células ósseas<sup>14</sup>, células adiposas<sup>15</sup> ou células endoteliais<sup>16-18</sup>. Também no tecido adiposo foi descrita uma população de células, isoladas por lipoaspiração, com capacidade de diferenciação *in vitro* em células ósseas, células musculares e cardiomiócitos<sup>19,20</sup>. Existe alguma

controvérsia relativamente à plasticidade das células estaminais adultas e à possibilidade de ocorrer transdiferenciação, ou seja a conversão directa de uma célula noutras células de linhagens distintas. Estudos recentes apontam para a existência de populações heterogêneas de células estaminais nos diferentes tecidos que, em determinadas circunstâncias, podem diferenciar-se, dando origem a vários tipos de células<sup>21,22</sup>.

As CE hematopoiéticas presentes na medula óssea e no sangue do cordão umbilical são as que, no imediato, apresentam maior aplicação terapêutica. Embora a sua utilização clínica se restrinja fundamentalmente a doenças do foro hemato-oncológico, experiências em modelos animais sugerem que, no futuro, a gama de aplicações da terapia celular com CE do sangue do cordão umbilical se poderá alargar a doenças neurodegenerativas, diabetes, disfunções hepáticas ou lesões vasculares<sup>23-27</sup>.

### 3. CÉLULAS ESTAMINAIS EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

Existem algumas áreas de interesse em Ginecologia e Obstetrícia nas quais a investigação em células estaminais é considerada importante.

#### 3.1. Em ginecologia oncológica

O transplante de células estaminais hematopoiéticas após quimioterapia intensiva ou radioterapia tem sido usado no tratamento de tumores sólidos ginecológicos, tais como o cancro da mama ou o cancro do ovário. A paciente é submetida a quimioterapia de alta dosagem, seguida de terapia de suporte com infusão de CE hematopoiéticas provenientes quer da medula óssea quer de sangue periférico. Este tratamento leva ao restabelecimento das células sanguíneas e do sistema imunitário, permitindo a recuperação da paciente<sup>28,29</sup>. Também está documentado o uso de CE da medula óssea expandidas *ex vivo* em transplante autólogo, após quimioterapia ablativa em pacientes com cancro da mama<sup>30</sup>. A possibilidade de aplicação clínica de CE expandidas *ex vivo*, obtidas a partir de sangue do cordão umbilical também está a ser investigada<sup>28</sup>. O sangue do cordão umbilical pode ser assim considerado

uma fonte atractiva de CE hematopoiéticas para uso autólogo ou heterólogo, no tratamento de tumores hematológicos ou tumores sólidos incluindo o cancro da mama e do ovário.

#### 3.2. Células estaminais fetais no sangue materno

Durante a gravidez existem na circulação materna células fetais, que persistem no sangue e tecidos maternos durante décadas. As células fetais circulantes possuem características de CE podendo contribuir para a regeneração dos tecidos em órgãos maternos<sup>31</sup>. Srivastava e colaboradores descreveram a passagem de CE fetais para a circulação materna e sua diferenciação e permanência em tecidos maternos da tireóide<sup>32</sup>. Adicionalmente foram identificadas células masculinas numa biopsia ao fígado de uma mulher com hepatite C<sup>33</sup>. Estes resultados sugerem que as células fetais no organismo materno podem ter capacidade terapêutica ou regenerativa.

Por outro lado, o microquimerismo resultante da presença de células fetais no organismo materno tem sido associado com o desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes maternas, tais como a esclerose sistémica<sup>33</sup>.

É também reconhecido que o tráfego feto-maternal aumenta em certas complicações que ocorrem durante a gravidez, tais como pré-eclampsia e em casos de aneuploidias cromossómicas fetais específicas<sup>32</sup>. Assim, a análise das células fetais no sangue materno pode ser usada no diagnóstico pré-natal não invasivo de anomalias cromossómicas e distúrbios maternos<sup>33</sup>.

#### 3.3. Células estaminais no transplante *in utero* (contexto pré-natal)

O 1º transplante alogénico de CE num feto humano foi efectuado em 1988. Desde então mais de 40 procedimentos semelhantes foram realizados em fetos entre 12 a 28 semanas<sup>36</sup>. As vantagens de transplantação de CE *in utero* são: a) maior tolerância imunológica do feto, dada a sua imaturidade; b) possibilidade de transplantar uma menor quantidade de CE, devido ao reduzido tamanho do feto; c) menor risco de infecção, uma vez que o feto se encontra “isolado” na cavidade amniótica, protegido do exterior.

O transplante de CE *in utero* para tratamento de doenças do feto tem sido principalmente utilizado no contexto hematopoiético, quer utilizando CE adultas quer de origem fetal. Para além do transplante de células hematopoiéticas as perspectivas terapêuticas no transplante fetal incluem o tratamento de talassemias e doenças metabólicas, bem como transplante de células mesenquimais para tratamento de doenças musculares e displasias do osso e ainda terapia génica *in útero*<sup>28,37</sup>. Estudos em modelos animais demonstraram que, após transplante de CE mesenquimais humanas em fetos de ovelhas, é observada diferenciação destas células em condrócitos, adipócitos, miócitos e cardiomiócitos<sup>36, 38-39</sup>.

### 3.4. Células estaminais do sangue do cordão umbilical

O sangue do cordão umbilical, que geralmente é descartado durante o parto, é uma fonte privilegiada de CE hematopoiéticas. As CE do sangue do cordão umbilical apresentam inúmeras aplicações terapêuticas ao nível das doenças hematológicas/oncológicas, sendo actualmente considerados uma alternativa às CE da medula óssea. As vantagens do sangue do cordão umbilical em relação à medula óssea são as seguintes:

- a) o sangue do cordão umbilical contém um maior nº de células hematopoiéticas por unidade de volume em comparação com o sangue periférico ou a medula óssea;
- b) menor risco de doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD) aguda;
- c) maior tolerância no teste de compatibilidade HLA (de 1 a 3 discrepâncias);
- d) menor risco de infecção com agentes infecciosos;
- e) o sangue do cordão umbilical é facilmente recolhido após o nascimento, a colheita é indolor e não apresenta qualquer risco para a mãe e filho;
- f) disponibilidade imediata das células para transplantação<sup>5</sup>.

O 1º transplante de sangue do cordão umbilical foi efectuado em 1998 numa criança com anemia de Fanconi<sup>40</sup> Mais de 5000 transplantes foram efectuados

desde então em todo o mundo<sup>41-43</sup>. Apesar da concentração de CE 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. Dadas estas limitações, têm sido desenvolvidos uma série de protocolos para expandir *ex vivo* as CE presentes no sangue do cordão umbilical, permitindo deste modo alargar o seu uso no transplante em adultos<sup>44-46</sup>.

## REFERÊNCIAS

1. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM: Stem cells: hype and reality. *Hematology*, 369-91, 2002.
2. Fischbach GD, Fischbach RL: Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, 114(10):1364-70, 2004.
3. Santner-Nanan B, Peek MJ, McCullagh P, Nanan R: Therapeutic potential of stem cells in perinatal medicine. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 45(2):102-7, 2005.
4. Barker JN, Wagner JE: Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol*, 14: 160-164, 2002.
5. Lewis ID: Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Intern Med J*, 32: 601-609, 2002.
6. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145-7, 1998.
7. Rogers I, Casper RF: Stem Cells: you can't tell a cell by its cover. *Human Reproduction Update*, 9 (1): 25-33, 2003.
8. Hipp J, Atala A: Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *J Exp Clin Assist Reprod*, 1(1):3, 2004.
9. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH et al: Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*, 303(5664):1669-74, 2004.
10. Hwang WS, Roh SI, Lee BC et al: Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts. *Science*, May 19, 2005.
11. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al : Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418 (6893): 41-9, 2002.
12. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M et al: Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103: 1669 – 1675, 2004.
13. Kogler G, Sensken S, Airey J.A et al: A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*, 200 (2): 123-35, 2004.
14. Rosada C, Justesen J, Melsuik D et al: The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells.

- Calcified Tissue Int, 72 (2): 135-42, 2003.
15. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN et al: Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Tr*, 7 (11): 581-8, 2001.
  16. Eggermann J, Kliche S, Jarmy et al: Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res*, 58 (2): 478-86, 2003.
  17. Raffi S, Lyden D: Therapeutical stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med*, 9 (6): 702-712., 2003.
  18. Schmidt D, Breymann C, Weber A et al: Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Ann Thorac Surg*, 78 (6): 2094-8, 2004.
  19. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12):4279-95, 2002.
  20. Planat-Benard V, Menard C, Andre M et al: Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*, 6;94(2):223-9, 2004.
  21. Quesenberry, PJ, Dooner G, Dooner M et al: Ignoratio Elenchi: red herrings in stem cell research. *Science*, 308: 1121-1122, 2005.
  22. Quesenberry, PJ, Dooner G, Colvin: Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematology*, 33: 389-394, 2005.
  23. 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 Hematoh Stem Cell*, 12 (3): 255-70, 2003.
  24. 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 Hematoh Stem Cell*, 12 (3): 271-8, 2003.
  25. 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.
  26. 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.
  27. 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.
  28. Perillo A, Bonanno G, Pierelli L et al: Stem cells in gynecology and obstetrics. *Panminerva Med*, 46(1):49-59, 2004.
  29. Stiff PJ, Veum-Stone J, Lazarus HM et al: High-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation for ovarian cancer: an autologous blood and marrow transplant registry report. *Annals of Internal Med*, 133(7): 504-515, 2000.
  30. Stiff P, Chen B, Franklin W et al: Autologous transplant of ex vivo expanded bone marrow cells grown from small aliquots after high-dose chemotherapy for breast cancer. *Blood*, 95(6): 2169-2174, 2000.
  31. Khosrotehrani K, Bianchi DW: Multi-lineage potential of fetal cells in maternal tissue: a legacy in reverse. *J Cell Sci*, 118:1559-63, 2005.
  32. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL et al: Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet*, 358(9298):2034-8, 2001.
  33. Johnson KL, Samura O, Nelson JL et al: Significant fetal cell microchimerism in a nontransfused woman with hepatitis C: Evidence of long-term survival and expansion. *Hepatology*, 36(5):1295-7, 2002.
  34. Bianchi DW. Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 92(1):103-8, 2000.
  35. Bianchi DW, Romero R: Biological implications of bidirectional fetomaternal cell traffic: a summary of a National Institute of Child Health and Human Development-sponsored conference. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 14(2):123-9, 2003.
  36. Muench MO, Barcena A: Stem cell transplantation in the fetus. *Cancer Control*, 11(2):105-18, 2004.
  37. Zanjani ED, Anderson WF: Prospects for in utero human gene therapy. *Science*, 285(5436):2084-8, 1999.
  38. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al: Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*, 6(11):1282-6, 2000.
  39. Mackenzie TC, Flake AW: Multilineage differentiation of human MSC after in utero transplantation. *Cytotherapy*, 3(5):403-5, 2001.
  40. Gluckman E., Broxmeyer H., Auerbach A. et al. (1989) 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.
  41. <https://office.de.netcord.org>
  42. [www.nationalcordbloodprogram.org](http://www.nationalcordbloodprogram.org)
  43. Gluckman PE: Beneficence of stem cells from cord blood in Euroconference on stem cell research, Cascais, Portugal, 2005.
  44. Lam AC, Li K, Zhang XB et al: Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion*, 41(12): 1567-76, 2001.
  45. Shpall EJ, Quinones R, Giller R et al: Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transp*, 8(7): 368-76, 2002.
  46. McNiece I: Ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 32(5):409-10, 2004.
-