

EDIÇÃO PORTUGUESA

TODOS OS ARTIGOS SÃO REVISTOS POR ESPECIALISTAS

SEPARATA

Patient Care[®]

A REVISTA DA MELHOR PRÁTICA CLÍNICA PARA O MÉDICO ACTUAL



**Criopreservação
de células estaminais**

Criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical: utilização actual e potencialidades em medicina regenerativa

DRA. TERESA MATOS

Doutorada em Biologia Celular,
Departamento de I&D, Crioestaminal –
Biocant Park, Cantanhede.

DR. ANDRÉ GOMES

Licenciado em Bioquímica, Doutorando
em Biologia Molecular e Celular,
Departamento de I&D, Crioestaminal –
Biocant Park, Cantanhede.

DRA. MARGARIDA VIEIRA

Doutorada em Biologia Molecular,
Departamento de I&D, Crioestaminal –
Biocant Park, Cantanhede.

CÉLULAS ESTAMINAIS – ORIGEM E POTENCIALIDADES

Células estaminais são, por definição, células que se podem diferenciar em diversas linhagens celulares, tendo igualmente a capacidade de se auto-renovar, dividindo-se indefinidamente. As células estaminais podem ser classificadas em função da sua origem e/ou da sua capacidade de diferenciação em dois tipos principais: embrionárias e não embrionárias. As células estaminais embrionárias são pluripotentes, podendo diferenciar-se nas três camadas germinativas embrionárias (endoderme, mesoderme e ectoderme) e dar origem a todos os tipos de células. As células estaminais não embrionárias, também conhecidas como células estaminais adultas, encontram-se em muitos tecidos do organismo adulto sendo, regra geral, multipotentes. Alguns tecidos neo-natais, como a placenta ou o sangue do cordão umbilical, contêm também populações de células estaminais adultas (pois são obtidas após o nascimento), com um elevado potencial proliferativo e características pluripotentes.¹

A capacidade das células estaminais se diferenciarem em vários tipos de células, podendo substituir células lesadas ou destruídas e regenerar tecidos danificados, explica o grande interesse na utilização destas células no contexto da terapia celular. As células estaminais hematopoiéticas são aquelas que têm tido maior relevância a nível prático, particularmente em doenças nas quais é necessário regenerar o sistema sanguíneo e imunológico do doente.² No indivíduo adulto estas células estaminais estão maioritariamente localizadas na medula óssea, e originam todas as células que constituem o sangue e sistema imunitário, podendo diferenciar-se em linfócitos (B e T), eritrócitos, plaquetas, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e macrófagos. O sangue do cordão umbilical é também uma importante fonte destas células, razão pela qual se tornou, nos últimos anos, numa alternativa à medula óssea nos transplantes de células estaminais hematopoiéticas.³

O SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Até há cerca de três décadas, o cordão umbilical era considerado como apenas mais um excedente do parto. Em 1974 Knudtson descreveu pela primeira vez a existência de células progenitoras hematopoiéticas no sangue do cordão umbilical.⁴ A possibilidade de utilizar células estaminais do sangue do cordão umbilical nos transplantes hematopoiéticos, em alternativa à medula óssea, contribuiu para que se olhasse para esta fonte de células estaminais de uma outra forma, tendo actualmente um protagonismo reconhecido.³

A utilização do sangue do cordão umbilical nos transplantes de células estaminais hematopoiéticas, apresenta diversas vantagens quando comparada com outras fontes, das quais se destacam:

- 1) A sua recolha não apresenta qualquer risco para a mãe nem para o bebé;
- 2) Uma vez que as amostras são criopreservadas, a sua disponibilidade é imediata;
- 3) Existe um baixo risco de transmissão de vírus;
- 4) Menor risco de doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD);
- 5) Possibilidade de utilizar amostras com maior discrepância de HLA (*Human Leucocyte Antigen*);
- 6) São células neonatais e por isso possuem uma ontogenia primitiva, não tendo sido expostas a desafios imunológicos;
- 7) Têm um maior potencial proliferativo.

A maior limitação associada aos transplantes de sangue do cordão umbilical reside no número limitado de células que é possível isolar a partir de algumas amostras, uma vez que o volume de sangue que é colhido é limitado. Uma vez que o número de células transplantadas é importante para a recuperação do paciente, estão em curso diversos estudos que visam aumentar a quantidade de células estaminais usadas num transplante.⁵ Já foram efectuados vários transplantes com sucesso, recorrendo a células expandidas.⁶

Os estudos publicados nos últimos anos demonstram que, para além de células estaminais hematopoiéticas, o sangue do cordão umbilical contém também uma mistura de diferentes tipos de células estaminais que vão desde células mais

Este artigo num relance

- O sangue do cordão umbilical possui células estaminais hematopoiéticas que permanecem viáveis após criopreservação, por um longo período de tempo.
- A criopreservação das células estaminais do sangue do cordão umbilical (normalmente descartado após o parto) permite que estas possam ser utilizadas no futuro, em caso de necessidade.
- Na actualidade, o sangue do cordão umbilical é uma alternativa à medula óssea para transplante de células estaminais hematopoiéticas em doenças hematológicas.
- A utilização das células estaminais do sangue do cordão umbilical em pacientes com diabetes tipo 1 e certos tipos de lesões cerebrais está a ser avaliada.
- Os estudos em curso indicam que no futuro o sangue do cordão umbilical irá desempenhar um papel cada vez mais importante na terapia celular e medicina regenerativa

primitivas com características semelhantes às células estaminais embrionárias a células mais diferenciadas, tais como células estaminais mesenquimais e células progenitoras endoteliais. Em consequência desta diversidade, é possível, a partir de uma amostra de sangue do cordão umbilical, diferenciar vários tipos de células diferentes, tais como células neuronais, células epiteliais, cardiomiócitos, células ósseas, células pancreáticas entre outras. Desta forma, as células estaminais do sangue do cordão umbilical apresentam também um elevado potencial fora do contexto das doenças hemato-oncológicas.⁷

APLICAÇÕES ACTUAIS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL - TRANSPLANTES DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS

Em 1988, uma equipa franco-americana realizou o primeiro transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical para tratar uma criança com anemia de Fanconi.⁸ Nesse transplante, foi utilizada uma amostra compatível de sangue do cordão umbilical de um familiar anteriormente recolhida e criopreservada. Um ano mais tarde, 98% do sistema linfático do doente

era originário das células do dador. Desde então foram realizados mais de 14 000 transplantes com sangue do cordão umbilical, cerca de metade em indivíduos adultos.⁹ A grande maioria destes transplantes foi efectuado num contexto alogénico, ou seja, sendo o dador uma outra pessoa que não o paciente. Num contexto autólogo, o sangue do cordão umbilical foi utilizado para tratar, por exemplo, anemia aplástica adquirida,¹⁰ certos tipos específicos de tumores sólidos (como neuroblastomas e retinoblastomas)¹¹ síndrome de Shwachman-Diamond, deficiência imunitária da deaminase da adenosina (em combinação com terapia génica)¹² e leucemia.¹³ Neste último caso, uma criança diagnosticada com leucemia linfoblástica aguda recebeu células estaminais do seu próprio sangue do cordão umbilical, que haviam sido criopreservadas à nascença. Dois anos após o transplante, a criança mantém-se saudável e sem recaídas. A lista de doenças em que existe indicação de transplante com sangue do cordão umbilical está indicada no Quadro 1.

As células estaminais do sangue do cordão umbilical têm sido utilizadas maioritariamente em doenças hemato-oncológicas, sobretudo para tratamento de doenças oncológicas, tais como leucemias, linfomas, tumores sólidos, mas também no tratamento de doenças não malignas tais como deficiências metabólicas hereditárias (p.ex., Doença de Krabbe, Síndrome de Hurler), hemoglobinopatias, anemias, imunodeficiências, entre outras.¹⁴ Em 2007 uma criança portuguesa de 14 meses foi submetida a um transplante com células estaminais de sangue do cordão umbilical para tratar uma imunodeficiência primária grave. Os médicos recorreram às células estaminais do sangue do cordão umbilical do irmão que tinham sido criopreservadas pela Criolestamina. O transplante foi realizado com sucesso, tendo a criança desenvolvido um sistema imunitário funcional.

A CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Após o sucesso do 1º transplante com sangue do cordão umbilical, algumas instituições públicas e privadas tomaram a iniciativa de criar bancos

FIGURA 1



No laboratório o sangue do cordão umbilical é processado em sistema fechado.

para possibilitar o armazenamento de amostras de sangue do cordão umbilical, que de outra forma seriam eliminadas após o parto.

A recolha do sangue do cordão umbilical é realizada na última fase do parto, geralmente antes da expulsão da placenta, não interferindo com os restantes procedimentos do parto, nem apresentando qualquer risco nem para a mãe nem para o bebé. Após o cordão ter sido “clampado” e cortado, procede-se à recolha do sangue do cordão umbilical para um saco estéril. No fim da recolha, o saco de sangue é devidamente selado e acondicionado de forma a não sofrer variações de temperatura. O transporte para o laboratório de criopreservação é realizado à temperatura ambiente. Segundo um artigo recente, as células devem ser mantidas à temperatura ambiente até serem processadas e recomenda-se que o processamento seja feito entre as 24h e 48h após a colheita.¹⁵ No laboratório de criopreservação as amostras são testadas quanto a contaminantes (vírus e bactérias) e as células estaminais são isoladas por um processo de centrifugação que permite concentrar

QUADRO 1

Doenças em que podem ser utilizadas células estaminais do sangue do cordão umbilical

<p>Doenças oncológicas</p> <p>Leucemia linfoblástica aguda (LLA)</p> <p>Leucemia mielóide aguda (LMA)</p> <p>Leucemia mielóide crônica (LMC)</p> <p>Leucemia mielomonocítica</p> <p>Tumores sólidos (ex. neuroblastoma ou retinoblastoma)</p> <p>Doença de Hodgkin</p> <p>Linfomas não-Hodgkin</p> <p>Anemia Refractária</p> <p>Mielofibrose</p> <p>Mastocitose sistêmica</p> <p>Síndrome linfoproliferativa autoimune</p> <p>Histiocitose familiar</p> <p>Histiocitose das células de Langerhans</p> <p>Linfohistiocitose hemofagocítica</p> <p>Granulomatose linfomatosa</p> <p>Síndrome infantil da monossomia do cromossoma 7</p> <p>Deficiências medulares</p> <p>Anemia aplástica</p> <p>Anemia de Fanconi</p> <p>Anemia diseritropoiética congênita</p> <p>Anemia de Blackfan-Diamond</p> <p>Anemia sideroblástica congênita</p> <p>Anemia hipolinfoproliferativa</p> <p>Aplasia eritróide pura</p> <p>Neutropenia cíclica</p> <p>Neutropenia autoimune (severa)</p> <p>Síndrome de Evans</p> <p>Hemoglobinúria paroxística nocturna</p> <p>Doença de Glanzmann (desordem plaquetária)</p> <p>Trombocitopénia amegacariocítica</p> <p>Síndrome de TAR (Trombocitopénia sem rádio)</p> <p>Trombocitopénia neonatal severa</p> <p>Dermatomiosite juvenil</p> <p>Xantogranuloma juvenil</p> <p>Pancitopenia</p> <p>Síndrome de Kostmanns</p> <p>Síndrome de Schwachman-Diamond</p> <p>Hemoglobinopatias</p> <p>Beta talassémia major</p> <p>Beta talassémia intermédia</p>	<p>Alfa talassémia intermédia (Doença da hemoglobina H)</p> <p>Alfa talassémia major (Hydrops fetalis)</p> <p>Anemia falciforme</p> <p>Imunodeficiências</p> <p>Imunodeficiência combinada severa (SCID), entre as quais:</p> <p> Síndrome de Omnen</p> <p> SCID com deficiência de Adenosina Deaminase (ADA-SCID)</p> <p> SCID ligada ao cromossoma X</p> <p>Síndrome de Ataxia-telangiectasia</p> <p>Síndrome de DiGeorge</p> <p>Síndrome de Wiskott Aldrich</p> <p>Agamaglobulinemia ligada ao cromossoma X</p> <p>Doença granulomatosa crônica</p> <p>Deficiência IKK gama</p> <p>Hipogamaglobulinemia</p> <p>Síndrome linfoproliferativa ligado ao cromossoma X</p> <p>Doenças metabólicas</p> <p>Adrenoleucodistrofia</p> <p>Doença de Gunther</p> <p>Doença de Gaucher</p> <p>Síndrome de Hunter (MPS-II)</p> <p>Síndrome de Hurler (MPS-I)</p> <p>Síndrome de Hurler-Scheie</p> <p>Síndrome de Maroteaux-Lamy (MPS-VI)</p> <p>Síndrome de Sanfilippo (MPS-III)</p> <p>Síndrome de Hermansky-Pudlak</p> <p>Mucopolidose tipo II, III</p> <p>Alfa manosidose</p> <p>Síndrome de Neimann Pick</p> <p>Síndrome de Sandhoff</p> <p>Doença de Tay Sachs</p> <p>Doença de Krabbe</p> <p>Leucodistrofia metacromática</p> <p>Fucosidose (Doença da deficiência de fucosidose)</p> <p>GM1 Gangliosidase</p> <p>Doença de Wolman</p> <p>Outras doenças</p> <p>Osteopetrose</p>
---	--

Esta lista foi elaborada a partir do artigo científico Moise KJ "Umbilical Cord Stem Cells" *Obstet Gynecol* 2005;106:1393-1407, do site do Programa Nacional de Dadores de Medula dos EUA (www.marrows.org) e do site www.parentesguidecordblood.com.

FIGURA 2



As células estaminais são concentradas num volume final de 25 ml.

FIGURA 3



As células estaminais são guardadas em recipientes abastecidos por azoto líquido.

as células numa fracção com menor quantidade de glóbulos vermelhos (Figuras 1 e 2). Após análise da quantidade e viabilidade de células estaminais de cada amostra, estas são congeladas na presença de um criopreservante. As amostras são depois armazenadas em contentores abastecidos por azoto líquido que está a uma temperatura de 196°C negativos, aí permanecendo até serem necessárias (Figura 3). As células, nestas condições, mantêm-se viáveis durante vários anos.

O POTENCIAL DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL - DESENVOLVIMENTOS CIENTÍFICOS RECENTES

A possibilidade de aplicação do sangue do cordão umbilical em doenças não hematológicas tem suscitado bastante interesse. Este interesse deve-se principalmente à identificação, no sangue do cordão umbilical, de diversas populações de células estaminais, algumas das quais com uma elevada plasticidade e apresentando características muito semelhantes às células estaminais embrionárias.¹⁶ No entanto, ao contrário das células estaminais de tecidos embrionários ou fetais, a utilização clínica das células estaminais do sangue do cordão umbilical (consideradas células adultas) não levanta quaisquer questões éticas ou morais.

O transplante das células do sangue do cordão umbilical em modelos animais de diabetes, enfarte do miocárdio ou AVC revelou melhorias

funcionais nos animais tratados.¹⁷ A utilidade clínica do sangue do cordão umbilical para este tipo de doenças terá ainda de ser confirmada em humanos. Actualmente estão em curso dezenas de ensaios clínicos para testar a eficácia de terapias autólogas com células estaminais adultas (isoladas por exemplo da medula óssea) em doenças cardíacas¹⁸. É provável que as células estaminais existentes no sangue do cordão umbilical tenham propriedades semelhantes às da medula óssea, no contexto de doença cardíaca. Num estudo de 2005, Ma e colaboradores concluíram que o sangue do cordão umbilical induz angiogénese em ratinhos que sofreram previamente um enfarte de miocárdio. Nos animais tratados com sangue do cordão umbilical verificou-se ainda uma diminuição da área do enfarte, indicando um potencial benefício das células do sangue do cordão umbilical nestas situações.¹⁹

Uma das patologias para a qual está a ser avaliada a utilização de sangue do cordão umbilical já em humanos é a diabetes tipo 1. O objectivo do ensaio clínico em curso, a decorrer desde 2005, é estudar o potencial do sangue do cordão umbilical autólogo para minimizar o ataque auto-imune do organismo e restaurar a produção de insulina, indispensável no controle dos níveis de glucose no sangue.²⁰ Foram examinadas 20 crianças com diabetes tipo 1, de idades compreendidas entre

os dois e os sete anos. Sete crianças receberam uma infusão intravenosa de células estaminais isoladas a partir do seu próprio sangue do cordão umbilical, criopreservado à nascença. As restantes receberam tratamento normal com insulina. Nas crianças tratadas com sangue do cordão umbilical observou-se um aumento das células T reguladoras (células com papel central na regulação da resposta imune). Adicionalmente, estas crianças apresentavam melhorias nos níveis de glucose no sangue, necessitando de menores doses diárias de insulina. Face aos resultados promissores, os investigadores pretendem agora alargar o estudo a mais doentes, para explorar os benefícios da terapia com sangue do cordão umbilical na diabetes tipo 1.

Recentemente foi iniciado um outro ensaio clínico com o objectivo de avaliar a segurança e eficácia de infusão autóloga de células do cordão umbilical de recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal.¹⁸ Para além deste ensaio, que se encontra a recrutar pacientes, nos últimos três anos foram várias as amostras libertadas de bancos privados para utilização autóloga em crianças com paralisia cerebral e outro tipo de lesões cerebrais. As amostras têm sido solicitadas pela Duke University, do estado da Carolina do Norte. Há relatos de melhorias significativas nalguns pacientes no período pós-infusão, não estando ainda publicados os resultados destas transfusões autólogas de sangue do cordão umbilical.

CONCLUSÕES

No panorama actual é evidente a importância do sangue do cordão umbilical como fonte de células estaminais hematopoiéticas para transplante. No contexto pediátrico, o sangue do cordão umbilical já se estabeleceu como a opção de eleição para transplante de células estaminais hematopoiéticas, tendo ultrapassado a utilização de medula óssea para tratamento de diversas do-

enças hemato-oncológicas. Os estudos em curso, quer em modelos animais, quer em pacientes humanos, sugerem que as aplicações clínicas com células estaminais do sangue do cordão umbilical poderão estender-se a outras doenças, como por exemplo as doenças cardíacas, doenças do cérebro ou diabetes tipo 1, demonstrando o potencial destas células em terapia celular e medicina regenerativa. □

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bajada, S, Mazakova, I, Richardson, JB & Ashammakhi, N (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2, 169-183.
- Copelan E (2006) Hematopoietic stem-cell transplantation. *New Eng J Med* 354 (17): 1813 – 1826.
- Rocha V, Gluckman E (2006) Clinical use of umbilical cord blood hematopoietic stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 12:34-41.
- Knudtson, S (1974) In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 43, 357-361.
- Haylock, DN & Nilsson, SK (2007) Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2, 324-335.
- de Lima M, McMannis J, Gee A, et al. (2008) Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant* 41, 771-778.
- van de Ven, C, Collins, D, Bradley, MB, Morris, E & Cairo, MS (2007) The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 35, 1753-1765.
- 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. *N Engl J Med* 321, 1174-1178.
- Kurtzberg J (2009) Update on umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Pediatr*. 21(1):22-9.
- Fruchtman SM, Hurler A, Dracker R, Isola L, Goldman B, Schneider BL, Emre S. (2004) The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transp*. 10 (11): 741-742.
- Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Mitie Watanabe F. (1999) Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transp*. 24 (9): 1041.
- Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM et al. (1995) Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nature Med*. 2(10):1017-1023
- Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi SN. (2007) First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics*. 119(1):296-300
- Brunstein, CG, Setubal, DC & Wagner, JE (2007) Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 137, 20-35
- Moldenhauer A, Wolf J, Habermann G, et al. (2007) Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. *Bone Marrow Transplant* 40, 837-842.
- McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, et al. (2005) Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*. 38(4):245-55
- Harris, DT & Rogers, I. (2007) Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2, 301-309.
- www.clinicaltrials.gov.
- Haller MJ, Viener HL, Wasserfall C, et al. (2008) Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol* 36, 710-715
- Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, et al (2005). Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res*. 66(1):45-54.

Empresa proprietária e detentora dos direitos para Portugal: Ad Médic - Adm. e Publicações Médicas, Lda. • Directora: Paula Cordeiro Administração, Redacção, Maquetização e Paginação • Calçada de Arroios, 16 C - Sala 3 • 1000-027 Lisboa • Telef. 21 842 97 10 Fax. 21 842 97 19 • e-mail: admedic@mail.telepac.pt • www.admedic.pt • Os artigos publicados nesta edição da *Patient Care* têm direitos reservados (2009) para a Ad Médic, Lda. a qual não se responsabiliza pelas opiniões expressas dos autores. Proibida a reprodução total ou parcial, sob qualquer forma, sem prévia autorização escrita.



PROTEGEMOS O FUTURO.

Quando em 2003 nos tornámos na 1ª empresa em Portugal a fazer a CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS, poucos eram aqueles que sabiam do que estávamos a falar. Estávamos conscientes que havia um longo caminho a percorrer, da mesma forma que tínhamos uma convicção inabalável no potencial desta nova tecnologia.

Hoje, 5 anos e 25 mil clientes depois, a criopreservação é já um termo comum no vocabulário de uma mulher grávida.

Este crescimento tem sido acompanhado por uma aposta no desenvolvimento de projectos de investigação, no sentido de alargar o âmbito de aplicações terapêuticas das células estaminais do sangue do cordão umbilical - actualmente são já mais de 60 as aplicações possíveis e as perspectivas para os próximos anos são bastante animadoras.

ESTA REALIDADE NÃO TERIA SIDO POSSÍVEL SEM O APOIO DOS PROFISSIONAIS DE SAÚDE, QUE, CADA VEZ MAIS, TÊM PROCURADO ESCLARECER OS PAIS SOBRE A IMPORTÂNCIA DESTE SERVIÇO.

QUEREMOS CONTINUAR AO SEU LADO, A AJUDAR A PROTEGER A SAÚDE DAS CRIANÇAS.

JUNTOS, PROTEGEMOS O FUTURO.