

# CÉLULAS ESTAMINAIS DO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL – QUE FUTURO?

Teresa Matos\*, Margarida Vieira\*\*, André Gomes\*\*\*

Nas últimas décadas o sangue do cordão umbilical tem sido cada vez mais utilizado como fonte alternativa de células estaminais hematopoiéticas para pacientes que não têm dadores de medula óssea compatível. Em muitos casos, sobretudo em pacientes pediátricos, o cordão umbilical está a tornar-se na fonte preferida de células estaminais hematopoiéticas para transplante, mesmo em situações em que existam dadores de medula compatíveis .

O cordão umbilical foi durante muito tempo considerado como apenas mais um excedente do parto, tendo começado a ser visto com outros olhos apenas há pouco mais de 3 décadas. Em 1974 Knudtzon descreveu pela primeira vez a existência de células progenitoras hematopoiéticas no sangue do cordão umbilical. Desde então o interesse de médicos e investigadores à volta deste tecido tem crescido consideravelmente, tendo actualmente adquirido um protagonismo reconhecido.

Os últimos trabalhos publicados demonstram que para além de células estaminais hematopoiéticas (HSC), o sangue do cordão umbilical contém também uma mistura de diferentes tipos de células estaminais que vão desde células mais primitivas com características semelhantes às células estaminais embrionárias (as USSC - unrestricted somatic stem cells) a células mais diferenciadas tais como células estaminais mesenquimais (MSC) e células progenitoras endoteliais (EPC). Em consequência desta diversidade as células estaminais do sangue do cordão umbilical podem diferenciar-se em células de diversos tecidos tais como células neuronais, epiteliais, cardíacas, ósseas, pancreáticas entre outras. Assim para além das actuais aplicações no tratamento de doenças hematopoiéticas, as células estaminais do sangue do cordão umbilical apresentam um elevado potencial para doenças não hematopoiéticas, nomeadamente ao nível da medicina regenerativa.

## **PORQUÊ O CORDÃO UMBILICAL?**

Como já foi referido, tem crescido a utilização do sangue do cordão umbilical como fonte alternativa de células estaminais hematopoiéticas

para transplante, principalmente devido às numerosas vantagens apresentadas por esta fonte de células estaminais, quando comparada com outras fontes. Entre as vantagens apresentadas pelo sangue do cordão umbilical podemos destacar algumas tais como: 1) a sua recolha não apresenta qualquer risco para a mãe e 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; 6) maior concentração de células estaminais. Para além destas vantagens, pelo facto de serem células neonatais possuem uma ontogenia primitiva, não tendo sido expostas a desafios imunológicos, e têm também um maior potencial proliferativo.

No entanto existem algumas limitações na utilização destas células: 1) pequena quantidade de células disponíveis, pois o volume recolhido é reduzido; 2) indisponibilidade de doses adicionais do mesmo dador; 3) maior tempo de recuperação necessário após o transplante, o que pode levar a um maior risco de infecções pós-transplante.

Diversas estratégias têm sido utilizadas para ultrapassar estas limitações, como por exemplo a multiplicação em laboratório das células isoladas. Vários estudos têm sido desenvolvidos na área da expansão de células estaminais do sangue do cordão umbilical. São já alguns os transplantes realizados com células expandidas, encontrando-se neste momento vários ensaios clínicos em curso onde são utilizadas células expandidas para tratar várias doenças.

## **SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL – APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS**

O primeiro transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical foi realizado em 1988 por uma equipa franco-americana para tratar uma criança com anemia de Fanconi. Nesse transplante,

\* Doutorada em Biologia Celular

\*\* Doutorada em Biologia Molecular

\*\*\* Licenciado em Bioquímica, Doutorando em Biologia Molecular e Celular

foi utilizada uma amostra compatível (relativamente aos antígenos dos leucócitos humanos-HLA) 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 e até 2007 foram realizados mais de 9000 transplantes com sangue do cordão umbilical, mais de um terço em indivíduos adultos. A grande maioria destes transplantes foi efectuado num contexto alogénico, ou seja, sendo o dador uma outra pessoa que não o paciente.

Até ao momento, as células estaminais do sangue do cordão umbilical têm sido utilizadas maioritariamente em doenças hemato-oncológicas sobretudo para tratamento de doenças malignas, 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. Neste contexto, em 2007 uma criança portuguesa de 14 meses foi sujeita 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 Crioestaminal. O transplante foi realizado com sucesso, tendo a criança registado melhorias significativas.

## **CRIOPRESERVAÇÃO DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL – DESDE A RECOLHA AO ARMAZENAMENTO**

No sentido de fornecer amostras para transplante e após o sucesso do 1.º transplante com sangue do cordão umbilical, algumas instituições públicas e privadas tomaram a iniciativa de criar bancos para possibilitar o armazenamento e a disponibilidade de amostras de sangue do cordão umbilical.

Entre os bancos públicos destacam-se os pertencentes à rede Netcord, tais como o de New York, Barcelona e Dusseldorf. Em Portugal não existe, até à data, nenhum banco público de sangue do cordão umbilical, que se dedique à recolha e criopreservação de amostras de sangue do cordão umbilical. Os bancos de sangue do cordão umbilical públicos armazenam unidades de sangue do cordão umbilical doadas pelos pais – estas unidades passam a estar disponíveis para uso alogénico ou

ainda para fins de investigação. Os bancos privados armazenam unidades de sangue do cordão umbilical para uso autólogo ou alogénico, no contexto familiar. As amostras armazenadas são propriedade do dador, não estando disponíveis para uso geral nem para investigação científica.

A recolha é realizada na última fase do parto, geralmente antes da expulsão da placenta, não interferindo significativamente com os restantes procedimentos do parto, nem apresentando qualquer risco quer para a mãe quer para o bebé. Após a recolha do sangue do cordão umbilical para o saco de sangue, este é devidamente selado e acondicionado de forma a não sofrer variações de temperatura. O transporte para o laboratório de criopreservação é depois realizado por profissionais especializados, sendo efectuado à temperatura ambiente no prazo de 24 à 48h. 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. 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 as células numa fracção com menor quantidade de glóbulos vermelhos. Após serem analisadas quanto à quantidade e viabilidade de células estaminais as amostras são então congeladas na presença de um criopreservante (DMSO-Dimetilsufóxido). As amostras são depois armazenadas em contentores contendo azoto líquido, a uma temperatura de 196°C negativos, permanecendo armazenadas até serem necessárias, mantendo-se viáveis durante vários anos.

## **CÉLULAS ESTAMINAIS DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL – POTENCIAL EM MEDICINA REGENERATIVA**

A existência de diversas populações de células estaminais torna esta fonte de células bastante atractiva do ponto de vista da sua aplicação noutros contextos terapêuticos.

A possibilidade de aplicação do sangue do cordão umbilical em doenças não hematológicas tem suscitado bastante interesse, tendo sido desenvolvidos vários ensaios pré-clínicos em modelos animais. O transplante das células do sangue do cordão umbilical em modelos animais de

diabetes, doenças cardíacas tais como enfarte do miocárdio, doenças neuronais tais como AVC ou doença de Alzheimer revelou melhorias funcionais nos animais tratados. A utilidade clínica do sangue do cordão umbilical para este tipo de doenças terá ainda de ser confirmada em humanos, mas estes ensaios demonstram o potencial terapêutico destas células. Alguns ensaios clínicos foram já iniciados, sendo necessário aguardar pelos resultados a longo prazo para concluir da eficácia e segurança destas novas abordagens terapêuticas.

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 neuronais ou diabetes tipo 1.

### *Doença cardíaca*

As doenças cardíacas são responsáveis pela morte de uma elevada percentagem da população mundial. Uma vez que os indivíduos afectados por estas doenças são principalmente adultos, não existem de momento ensaios clínicos utilizando sangue do cordão umbilical para tratar este tipo de doenças. No entanto, alguns trabalhos indicam que o transplante autólogo de medula óssea traz benefícios no tratamento de pacientes com doenças cardíacas. É provável que as células estaminais existentes no sangue do cordão umbilical tenham propriedades semelhantes às da medula óssea, no contexto de doença cardíaca. A avaliar pelos resultados obtidos em animais, o sangue do cordão umbilical terá um papel importante na regeneração cardíaca, contribuindo para as melhorias funcionais observadas nos animais testados. 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. Um outro estudo recente vem apoiar os resultados já obtidos. Neste estudo realizado em porcos, os autores demonstram que o transplante de uma população de células estaminais de sangue do cordão umbilical, em modelos de isquémia do miocárdio, melhora a função ventricular, e previne a formação de ferida e a dilatação do ventrículo. Os

autores sugerem que esses efeitos se devem a uma acção parácrina por factores libertados pelas células injectadas, uma vez que não se observa qualquer diferenciação destas .

### *Doenças Neuronais*

As doenças Neuronais incluem uma grande variedade de patologias com etiologias distintas, no entanto são já vários os ensaios pré-clínicos desenvolvidos no sentido de utilizar a terapia com células estaminais de sangue do cordão umbilical em modelos animais de várias dessas patologias. Foram observadas melhorias consideráveis em modelos de AVC, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, traumatismo craniano, entre outros.

Está actualmente em curso um ensaio clínico para a encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal. Este ensaio está a ser coordenado pela Duke University, e tem como objectivo avaliar a segurança e eficácia de infusão autóloga (do próprio paciente) de células do cordão umbilical de recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquémica neonatal. Os recém-nascidos serão submetidos a 3 ou 4 infusões a partir do sangue do cordão umbilical recolhido à nascença, tendo de se realizar a primeira infusão às 8h ou entre as 12 e 24 h de vida da criança. Este é um ensaio que foi iniciado recentemente não existindo ainda qualquer tipo de informação acerca de como está a decorrer.

Para além deste ensaio, que se encontra a recrutar pacientes, no último ano 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. A Dra Joanne Kuertzberg, uma conceituada oncologista pediatra, é a pessoa responsável pelo procedimento clínico, que segundo a própria é uma abordagem bastante experimental. Há relatos de melhorias significativas nalguns pacientes no período pós-infusão, aguardando-se a publicação formal dos resultados iniciais deste estudo.

### *Diabetes tipo 1*

A diabetes tipo 1 é uma doença de natureza auto-imune na qual as células produtoras de insulina são destruídas pelo sistema imunitário do próprio paciente. A utilização autóloga do sangue do cordão umbilical em crianças com diabetes tipo 1 está a ser estudada, no âmbito de um ensaio clínico aprovado

pela FDA (entidade que regula o medicamento nos EUA). O ensaio foi iniciado há cerca de dois anos por investigadores da Universidade da Florida, EUA, em conjunto com a Juvenile Diabetes Research Foundation e o National Institutes of Health (NIH), com o objectivo de estudar o potencial do sangue do cordão umbilical para minimizar o ataque auto-imune do organismo e restaurar a produção de insulina, indispensável no controle dos níveis de glucose no sangue. De acordo com os resultados iniciais, o sangue do cordão umbilical parece ter um efeito benéfico em crianças com diabetes tipo 1. Foram examinadas 20 crianças com diabetes tipo I, 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.

Desconhece-se actualmente quais os mecanismos que estão por detrás dos efeitos observados, mas alguns autores sugerem que as células estaminais do sangue do cordão umbilical quando infundidas nos tecidos se diferenciam em ilhéus de Langerhans. A apoiar esta ideia foi recentemente publicado um estudo que demonstra que as células mesenquimais do sangue do cordão umbilical humano se podem diferenciar, *in vitro*, em ilhéus de Langerhans funcionais .

## CONCLUSÕES

O sangue do cordão umbilical foi durante muito tempo considerado como um excedente do parto sendo descartado, mas dado o crescente aumento das aplicações com células estaminais do sangue do cordão umbilical recolhidas à nascença, faz todo o sentido proceder à criopreservação destas células. Actualmente, o sangue do cordão umbilical tem vindo a ser utilizado de modo efectivo em alternativa aos transplantes de medula óssea para

tratamento de diversas doenças hemato-oncológicas. Adicionalmente, perante os resultados dos ensaios clínicos e tratamentos experimentais em curso tudo indica que no futuro o sangue do cordão umbilical irá desempenhar um papel fundamental na terapia celular e medicina regenerativa. É por isso importante divulgar a importância de não desprezar esta fonte de células estaminais e contribuir para o desenvolvimento da investigação nestas áreas.

## REFERÊNCIAS:

- Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14:356-363.
- Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood.* 1974;43:357-361.
- Van de Ven C, Collins D, Bradley MB, Morris E, Cairo MS. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol.* 2007;35:1753-1765.
- Brunstein CG, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 2007;137:20-35.
- Samuel GN, Kerridge IH, O'Brien TA. Umbilical cord blood banking: public good or private benefit? *Med J Aust.* 2008;188:533-535.
- McNiece I. Ex vivo expansion of hematopoietic cells. *Exp Hematol.* 2004;32:409-410.
- Shpall EJ, Quiñones R, Giller R, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2002;8:368-376.
- Clinicaltrials.gov.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321:1174-1178.
- Cetrulo CL, Cetrulo KJ. Placental and pregnancy stem cells: everyone is, or should be, interested in the placenta. *Stem Cell Rev.* 2006;2:79-80.
- Staba SL, Escolar ML, Poe M, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med.* 2004;350:1960-1969.
- Ballen K, Broxmeyer HE, McCullough J, et al. Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2001;7:635-645.
- Ballen KK. New trends in umbilical cord blood transplantation. *Blood.* 2005;105:3786-3792.
- <https://office.de.netcord.org>.
- Moldenhauer A, Wolf J, Habermann G, Genter G, Kiesewetter H, Salama A. Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40:837-842.
- 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.* 2004;325:665-669.
- Goldberg JL, Laughlin MJ, Pompili VJ. Umbilical cord blood stem cells: implications for cardiovascular regenerative medicine. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:912-920.
- Leor J, Guetta E, Chouraqui P, Guetta V, Nagler A. Human umbilical cord blood cells: a new alternative for myocardial repair? *Cytotherapy.* 2005;7:251-257.
- Taguchi A, Soma T, Tanaka H, et al. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest.* 2004;114:330-338.
- Nikolic WV, Hou H, Town T, et al. Peripherally Administered Human Umbilical Cord Blood Cells Reduce Parenchymal and Vascular beta-Amyloid Deposits in Alzheimer Mice. *Stem Cells Dev.* 2008;17:423-440.
- Dohmann HF, Perin EC, Takiya CM, et al. Transendocardial autologous bone marrow mononuclear cell injection in ischemic heart failure: postmortem anatomicopathologic and immunohistochemical findings. *Circulation.* 2005;112:521
- Perin EC, Geng YJ, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation.* 2003;107:935-938.
- Chen HK, Hung HF, Shyu KG, et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after acute myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.* 2005;35:677-686.
- 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.* 2005;19:992-994.
- Ma N, Stamm C, Kaminski A, et al. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res.* 2005;66:45-54.
- Ghodsizad A, Niehaus M, Koegler G, et al. Transplanted human cord blood derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilation and scar formation after acute myocardial infarction. *Heart.* 2008.
- Ende N, Chen R. Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med.* 2002;33:173-180.
- Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant.* 2002;11:275-281.
- Harris DT, Rogers I. Umbilical cord blood: a unique source of pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007;2:301-309.
- <http://parentsguidecordblood.org/content/usa/medical/autocbt.shtml?navid=30>.
- Haller MJ, Wiener HL, Wasserfall C, Brusko T, Atkinson MA, Schatz DA. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. *Exp Hematol.* 2008;36:710-715.
- Haller MJ, Cooper SC, Brusko T. Autologous cord blood transfusion associated with prolonged honeymoon in a child with type 1 Diabetes. *Diabetes.* 2005;53 (Suppl 1):Poster A485.
- Gao F, Wu DQ, Hu YH, et al. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl Res.* 2008;151:293-302.