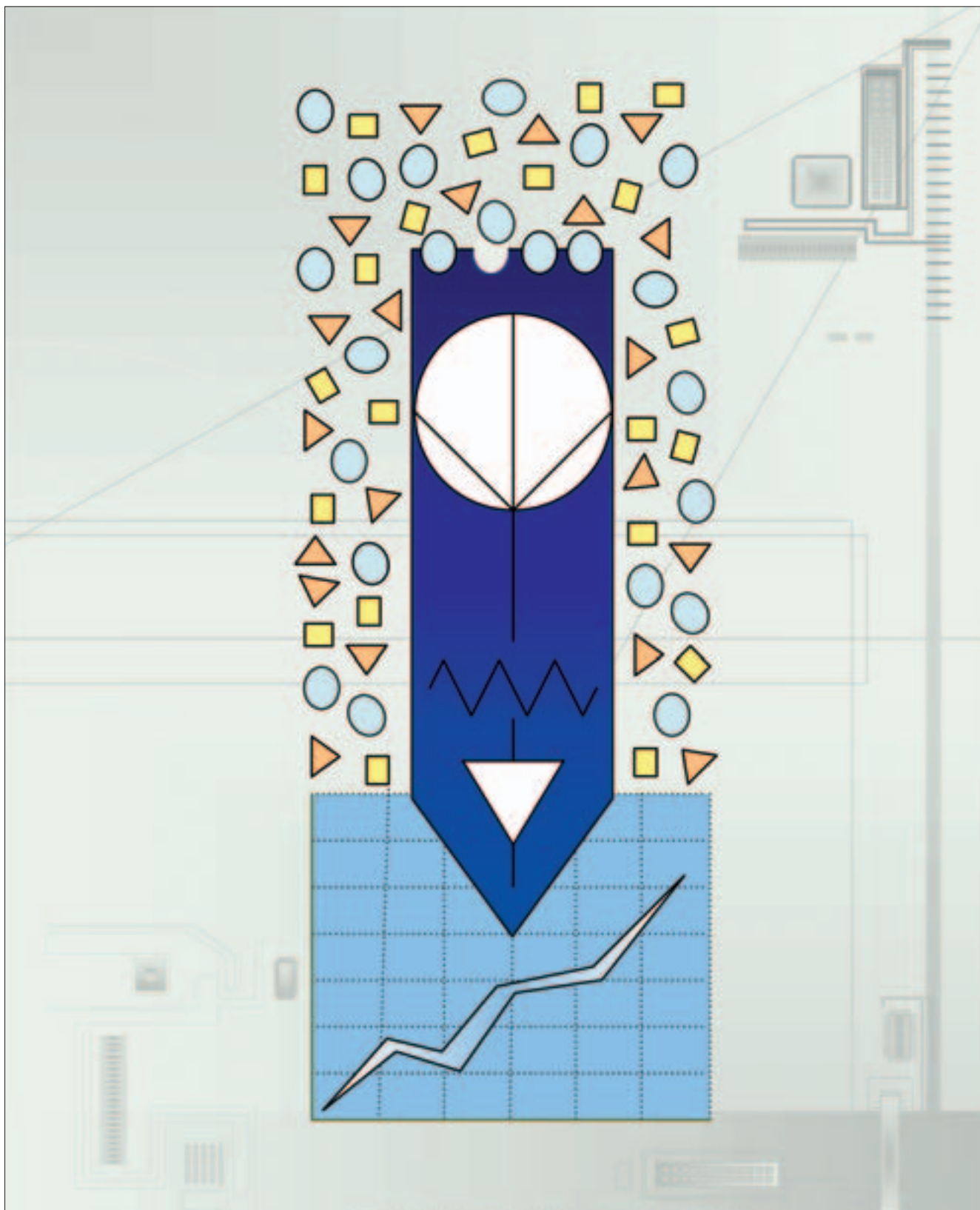


BOLETIM DE

biotecnologia

Orgão oficial da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia \\\ [spbt](#) \\\ Número 79 \\\ Dezembro de 2004 \\\ Publicação Quadrimestral ISSN 1645-5878



Índice

EMPREENDEDORISMO	
Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical	3
<small>AUTORES:</small> Luís Gomes, Margarida Viera, Gonçalo Castelo-Branco, André Gomes e Raul Santos	
<hr/>	
AVANÇOS E APLICAÇÕES - ALIMENTAR	
Biossensores: Modernas Ferramentas para Monitorização e Controlo Analítico	12
<small>AUTORES:</small> Maria Gabriela Almeida	
<hr/>	
AVANÇOS E APLICAÇÕES - SAÚDE	
Nanotecnologia	24
<small>AUTORES:</small> João Pedro Conde	
<hr/>	
RECURSOS	
Centros de Recursos Biológicos (BRCs): Novas Exigências para as Coleções de Culturas	30
<small>AUTORES:</small> Nelson Lima	
<hr/>	
ÉTICA	
Relação Homem-Natureza: O princípio responsabilidade	37
<small>AUTORES:</small> Joana Araújo e Michel Renaud	
<hr/>	
NOTÍCIAS	
Eventos e Cursos	43

Células Estaminais do Sangue do Cordão Umbilical

AUTORES:

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

INSTITUIÇÃO:

Crioestaminal - Instituto Pedro Nunes, Coimbra.

E-MAIL: info@crioestaminal.pt

Abstract

Crioestaminal is a biotechnology company whose main activity is the collection and cryopreservation of cord blood stem cells. This tissue contains hematopoietic stem cells (SC), mesenchymal SC and endothelial SC. Hematopoietic SC share some similar properties with the stem cells from the bone marrow, being therefore used in therapeutical procedures directed towards several hematological/oncological diseases. Being collected just after the birth of the individual, they have unique characteristics when compared with the stem cells isolated from the adult bone marrow. These characteristics allow, for instance, a hematopoietic reconstitution, upon transplantation, similar to the one resulting from bone marrow transplantation (even if the available number of SC in the cord blood is lower) and also a higher tolerance to HLA histocompatibility. Mesenchymal SC have the capacity of differentiation in different cellular types like bone cells or cartilage, with some studies indicating their in hepatocytes or neurons. Umbilical cord blood has equally endothelial SC, with potential applications in neovascularization. These SC might allow the broadening of the use of the umbilical cord blood for other contexts, apart from the hematological.

KEYWORDS: umbilical cord blood, hematopoietic Stem Cells (SC), bone marrow, transplant, mesenchymal Stem Cells (SC).

Resumo

A *Crioestaminal* é uma empresa de biotecnologia cuja principal actividade é a recolha e criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical. Este tecido contém células estaminais (CE) hematopoiéticas, CE mesenquimais e CE endoteliais. As CE hematopoiéticas apresentam algumas propriedades semelhantes às CE presentes na medula óssea, sendo assim igualmente utilizadas em procedimentos terapêuticos direccionados para diversas doenças hematológicas/oncológicas.

Sendo colhidas logo após o nascimento do indivíduo, possuem características únicas, comparativamente às células isoladas a partir da medula óssea adulta. Estas características permitem, por exemplo, uma reconstituição hematopoiética, após transplantação, semelhante à resultante do transplante de medula óssea (apesar do número de CE disponíveis no sangue do cordão umbilical ser inferior) e ainda uma maior tolerância na histocompatibilidade HLA (*Human Leukocyte Antigen*). As CE mesenquimais têm a capacidade de diferenciação em tipos celulares como células ósseas, cartilagem, havendo estudos indicando igualmente a sua diferenciação em hepatócitos ou neurónios. O sangue do cordão umbilical possui igualmente CE endoteliais, com possíveis aplicações em neovascularização. Estas CE poderão alargar a utilização do sangue do cordão umbilical para outros contextos que não o hematológico.

PALAVRAS-CHAVE: sangue do cordão umbilical, Células Estaminais (CE) hematopoiéticas, medula óssea, transplantação, Células Estaminais (CE) mesenquimais.

A actividade da Crioestaminal

A *Crioestaminal - Criopreservação de células estaminais, Lda.* é uma empresa de biotecnologia que presta serviços na área da saúde, nomeadamente o serviço de isolamento e criopreservação de células estaminais (CE) do sangue do cordão umbilical. Estas células têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, tendo igualmente a capacidade de se auto-renovar e dividir indefinidamente. A criopreservação das CE do sangue do cordão umbilical tem como objectivo a sua eventual utilização no tratamento de diversas doenças ao longo da vida do próprio recém-nascido e também dos seus familiares. O isolamento das CE e a sua criopreservação são feitos em parceria com a *Cryo-Save* nos seus laboratórios na Bélgica, 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.

Figura 1:

1. Um saco estéril de recolha de sangue (250ml) contendo anticoagulante CPD e uma agulha 16G
2. Mola que impede a saída do sangue depois de efectuada a recolha
3. Quatro toalhetes desinfectantes com álcool
4. Compressas de gaze
5. Pano absorvente (obrigatório para o transporte)
6. Saco de plástico hermético com fecho rápido
7. Dois sacos de gel para acondicionamento e protecção térmica do sangue
8. Bolsa plástica para colocação do documento de identificação (contém código de barras para colar no saco de recolha quando é feita a colheita e autocolante para selar a caixa)
9. Caixa com interior de esferovite para protecção térmica e mecânica do sangue durante o transporte para o laboratório



Atenção

É extremamente importante que o conjunto de materiais que se encontra selado (materiais de 1 a 7), apenas seja aberto pela equipa de parto, imediatamente antes do nascimento do bebé.



Figura 2:

Preparar a desinfeção do cordão umbilical nos locais onde será picado. Retirar o saco estéril de recolha do sangue da sua embalagem.



Figura 3:

Remover a protecção da agulha.



Figura 4:

Apertar o cordão umbilical com dois *clamps*, o mais perto possível do abdómen do recém-nascido uma vez que as células estaminais migram rapidamente para o recém-nascido. Cortar o cordão umbilical entre os dois *clamps* e remover o bebé do ambiente estéril.



Figura 5:

Picar a veia do cordão umbilical na área previamente desinfetada com a agulha do saco estéril de recolha de sangue (1 do conteúdo do kit), o mais próximo possível do clamp e homogeneizar o sangue com o anticoagulante.

Deverá ser recolhido o maior volume de sangue possível. Poderá ser necessário picar o cordão umbilical em mais do que uma zona, procedendo sempre à desinfecção da zona de recolha antes de picar o cordão umbilical.



Figura 6:

Após a recolha, empurrar o sangue ainda presente no tubo para o interior do saco, remover a agulha e apertar o tubo com uma mola e dar pelo menos 2 nós.



Figura 7:

Inverter o saco cuidadosamente, várias vezes, de forma a misturar o sangue com o anticoagulante.



Figura 8:

Colocar o saco com o sangue dentro do saco de plástico hermético e, de seguida, dentro da caixa, entre os dois sacos de gel, para o transporte.

Verificar se o formulário de identificação com os dados referentes ao bebé e a guia de transporte estão devidamente preenchidos.

Dobrar o formulário de identificação, colocá-lo na bolsa plástica e de seguida no interior da caixa.

Seguir o procedimento de envio.

A *Cryo-Save* é uma conceituada empresa europeia com uma vasta experiência no isolamento e criopreservação de CE, que presta este serviço em vários países (Reino Unido, Bélgica, Alemanha, Luxemburgo, Holanda, Suíça, Áustria, Irlanda, Hungria, Suécia, Dinamarca, Noruega e Grécia). À semelhança do que acontece nos referidos países, os pais interessados em usufruir deste 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.

Este kit deverá ser levado pelos pais para a maternidade/hospital para poder ser feita a recolha do sangue do cordão umbilical pela equipa de parto, imediatamente após o nascimento da criança. Esta recolha é totalmente indolor e não apresenta qualquer risco, nem para a mãe nem para o bebé. O sangue deve ser recolhido no ambiente estéril da sala de parto, imediatamente após o nascimento (natural ou cesariana) e antes da expulsão da placenta (sem alteração nos procedimentos normais de parto).

Depois de recolhido, o sangue é transportado para o laboratório de isolamento e criopreservação de CE. O transporte é feito pela DHL, líder de mercado no transporte expresso e com uma vasta experiência no transporte internacional, garantindo que em aproximadamente 48 horas o sangue do cordão umbilical é entregue no laboratório de criopreservação. Assim que o sangue do cordão umbilical é entregue no laboratório, 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 CE 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 seus clientes 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^{3,17,18}. Quando o número de células mononucleadas presente na amostra é inferior a 200 milhões, o seu número será provavelmente demasiado baixo para transplantação. Neste caso, as células são criopreservadas para serem expandidas no futu-

ro 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 serão criopreservadas. Toda a informação acerca das células estaminais é armazenada na nossa base de dados em nome do bebé. A cada amostra é atribuída uma etiqueta identificadora com um código de barras exclusivo, sendo garantida a sua confidencialidade. As células estaminais são guardadas num equipamento próprio para o efeito, em azoto líquido a 196°C negativos. Quando for necessário, as células são retiradas sem que as outras amostras sofram variações de temperatura. 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 requeiram por escrito. Para além destas actividades, a *Crioestaminal* está neste momento a iniciar as suas actividades de investigação, com o objectivo de alargar as aplicações terapêuticas do sangue do cordão umbilical. Estas actividades focam-se em protocolos de expansão e diferenciação de CE mesenquimais e endoteliais (ver Perspectivas Futuras) e cingem-se neste momento a protocolos de colaboração com grupos de investigação portugueses, embora a *Crioestaminal* preveja no decorrer de 2005 iniciar a sua actividade de investigação própria.

Transplante com CE da medula óssea e do sangue do cordão umbilical em doenças hematológicas

O transplante de células estaminais hematopoiéticas da medula óssea é uma das terapias disponíveis para doenças hematológicas/oncológicas. O procedimento terapêutico envolve normalmente duas fases:

- a) O paciente é tratado com doses de radiação ou quimioterapia que levam à morte das células doentes, mas também de células normais da medula óssea;
- b) A infusão de células estaminais hematopoiéticas leva ao restabelecimento das células sanguíneas e do sistema imunitário permitindo, na maioria dos casos, a recuperação do paciente. No entanto, o transplante de medula óssea pode apresentar limitações na sua aplicação devido a factores como:
 - a) encontrar um dador compatível de medula óssea (relativamente aos antigénios dos leucócitos humanos - HLA);
 - b) risco de reacções imunológicas dador/paciente, tais como a rejeição do transplante e a doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD);
 - c) risco de infecções oportunistas.¹

Diversos estudos têm demonstrado que o sangue do cordão umbilical, quando recolhido imediatamente após o parto, contém células estaminais que permanecem viáveis após criopreservação por um período de pelo menos 15 anos.⁴⁻⁷ Após quimio-radioterapia mieloablativa, o transplante de células estaminais (CD34+) criopreservadas pode repôr e substituir funcionalmente o reportório hematopoiético.¹

Em 1988, uma equipa de cientistas franco-americana efectuou em Paris o primeiro transplante de CE do cordão umbilical numa criança com anemia de Fanconi.² Uma amostra compatível de sangue do cordão umbilical de um familiar foi recolhida e transplantada. Um ano mais tarde, 98% do sistema linfático do doente era originário das células do dador.² Este procedimento clínico pioneiro veio despertar o interesse (e consequentemente a investigação) sobre o potencial das CE do sangue do cordão umbilical no tratamento de diversas doenças.

Em 1993, foi efectuado o primeiro transplante de CE do cordão umbilical de um dador não relacionado com o paciente.³ Até 2003 foram realizados mais de 2500 transplantes com CE do sangue do cordão umbilical (94 dos quais com amostras criopreservadas por diferentes bancos privados)¹⁰, a grande maioria efectuado num contexto heterólogo, ou seja, sendo o dador uma outra pessoa que não o paciente.^{1,3,10,52} Neste contexto, as CE do sangue do cordão umbilical podem ser utilizadas em diversas doenças tais como leucemias, linfomas, tumores sólidos e outras doenças hereditárias ou adquiridas do sistema sanguíneo ou imunitário.^{11,12}

Num contexto autólogo (em que o paciente utiliza as suas próprias células anteriormente criopreservadas), as aplicações, embora presentemente em menor número, abrangem doenças como retinoblastoma, neuroblastoma⁵¹ e anemia aplástica adquirida^{53,57}. No caso de leucemias e linfomas, a utilização autóloga dependerá do quadro clínico do paciente. Nestas e noutras doenças genéticas e/ou congénitas, a utilização autóloga das células estaminais poderá estar limitada devido ao risco das células já estarem afectadas com a patologia. No entanto, um estudo recente indica que a eliminação das células doentes, que possam estar a contaminar a amostra de sangue recolhida do cordão umbilical, poderá alargar a gama de doenças tratadas num contexto autólogo,¹⁸ tal como tem ocorrido com a utilização de sangue periférico mobilizado.

Comparação do sangue do cordão umbilical com a medula óssea como fonte de células estaminais hematopoiéticas

A quantidade de CE hematopoiéticas transplantadas é fundamental para a capacidade de regeneração do sistema sanguíneo, pelo que o peso do paciente determina o número de CE necessárias para o transplante.^{3,17,18}

O volume de sangue de cordão umbilical normalmente recolhido é inferior ao volume processado a partir da medula óssea de um adulto, pelo que o número de CE hematopoiéticas obtidas a partir do cordão umbilical é inferior. Assim sendo, a taxa de sucesso dos transplantes com células do cordão é maior em crianças do que em adultos (com maior peso corporal), embora já tenham sido realizados mais de 500 transplantes em adultos.^{19-23,53} Ademais, já em Novembro de 2004, foram publicados 2 artigos na revista *New England Journal of Medicine* com análises retrospectivas de transplantes de sangue do cordão umbilical em pacientes adultos com leucemias, referindo esta técnica como alternativa aceitável ao transplante da medula óssea.⁶⁰⁻⁶² Outra condicionante da transplantação com sangue do cordão umbilical é o tempo de recuperação mielóide, mais lento relativamente ao transplante com medula óssea (o que pode originar um aumento nas complicações iniciais pós-transplante).⁵³

Por outro lado, as CE do sangue do cordão umbilical possuem uma capacidade superior de proliferação e de expansão, comparativamente com as CE da medula óssea.^{1,3,8} Estas características únicas permitem que a reconstituição do sistema hematopoiético de pacientes, após tratamento mieloablativo, se efectue com um número de células nucleadas do sangue do cordão umbilical 10 vezes inferior ao número de células derivadas da medula óssea.^{1,3} Além disso, as CE do cordão umbilical permitem uma melhor reconstituição do sistema hematopoiético.⁹

A criopreservação de células estaminais do sangue do cordão umbilical apresenta, por si só, outras vantagens relativamente à medula óssea, tais como:

- a) disponibilidade imediata das células para transplantação;
- b) ausência de risco para o dador;
- c) menor risco de infecção com agentes infecciosos como o citomegalovírus (CMV) e o vírus Epstein-Barr (menos de 0,1% dos recém-nascidos saudáveis são positivos para CMV, contra 10-60% dos dadores adultos voluntários)³;

d) menor risco de doença do transplante contra o hospedeiro (GVHD) aguda, comparativamente a transplantes com células estaminais adultas da medula óssea;^{32,33} e e) tolerância de 1 a 2 discrepâncias no teste de compatibilidade HLA, o que permite a doação das células estaminais a um grupo mais alargado de pacientes.^{3,32} Dadas estas características das CE do sangue do cordão umbilical, algumas instituições públicas e privadas tomaram a iniciativa de criar bancos de criopreservação de células estaminais do sangue cordão umbilical, de modo a possibilitar a realização de mais transplantes heterólogos e autólogos com estas células.¹¹

Perspectivas Futuras

Dado uma das condicionantes do cordão umbilical ser o número limitado de CE, existem actualmente vários centros de investigação a desenvolver em procedimentos que permitam aumentar o número de CE hematopoiéticas, fazendo uso de diferentes combinações de factores de crescimento *ex vivo*.²⁴⁻²⁸

Têm sido desenvolvidos diversos métodos de proliferação, tendo as células expandidas características semelhantes às CE originais. Já foram efectuados vários transplantes com sucesso, recorrendo a células expandidas²⁸⁻³¹.

Em Dezembro de 2003, iniciaram-se nos Estados Unidos da América as fases I/II de ensaios clínicos com CE do cordão umbilical amplificadas em laboratório, em doentes com leucemias e outros cancros hematológicos.⁵⁴ Estes avanços poderão levar a, no futuro, o transplante em adultos atingir níveis de sucesso semelhantes aos transplantes pediátricos.

Embora no presente a aplicação das CE do sangue do cordão umbilical se restrinja fundamentalmente a doenças sanguíneas e cancerígenas, experiências em modelos animais sugerem que, no futuro, a gama de aplicações da terapia celular com estas células poderá alargar-se a doenças de foro não imunológico ou sanguíneo, como as doenças neurodegenerativas, diabetes, disfunções hepáticas e lesões vasculares.⁴⁷⁻⁵⁰

O sangue do cordão umbilical não possui somente CE hematopoiéticas. Tal como a medula óssea, possui igualmente CE mesenquimais, com a capacidade de

se diferenciarem em linhagens mesodérmicas.^{34,35} Em 2002, foi isolada uma subpopulação de CE mesenquimais pluripotentes da medula óssea, ou seja, CE capazes de se diferenciar em diferentes tipos celulares do organismo adulto, desde hepatócitos a neurónios.³⁶ CE mesenquimais com propriedades similares foram recentemente identificadas no sangue do cordão umbilical.^{55, 58}

Estas CE do sangue do cordão umbilical podem deste modo transformar-se não só em células do sistema hematopoiético, mas igualmente em células de outras linhagens celulares, como células neuronais,^{37-40,55,56} células do fígado,^{41,42,55} células ósseas,⁴³ ou células adiposas,⁴⁴.

O sangue do cordão umbilical contém igualmente CE endoteliais, as quais se podem diferenciar em células da vasculatura, tendo potencial aplicação em enfartes do miocárdio, lesões dos membros inferiores e lesões da retina.^{45,46,59}

A terapia genética das CE poderá ainda alargar a aplicabilidade do sangue do cordão umbilical a outro tipo de doenças, como doenças metabólicas hereditárias. Este tipo de abordagem foi utilizada com sucesso em crianças com deficiência imunitária da adenosina desaminase (ADA).

Em 1993, investigadores do Hospital Pediátrico da Universidade da Califórnia em Los Angeles introduziram uma cópia normal do gene defectivo nas células CD34+ do sangue do cordão umbilical e realizaram transplantes autólogos destas células modificadas. As crianças, recebendo tratamento farmacológico adicional, mantêm-se saudáveis, apesar do seu sangue conter apenas uma pequena fracção de células com o gene normal.^{14,15,16}

Conclusão

As CE do sangue do cordão umbilical apresentam, desde já, inúmeras aplicações terapêuticas a nível de doenças hematológicas/oncológicas, justificando-se assim a sua criopreservação para uso autólogo ou heterólogo. A possibilidade de expansão, a capacidade de diferenciação em tipos celulares de outras linhagens embrionárias e a terapia génica abrem portas à aplicação de células do sangue do cordão umbilical a outras patologias que não hematológicas.

Referências

1. LEWIS, I.D. (2002) Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Intern Med J* 32: 601-609.
2. 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. *Eng J Med* 321: 1174-8.
3. BARKER, J.N. *et al.* (2002) Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol* 14: 160-164.
4. BROXMEYER, H. *et al.* (1992) Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *P Natl Acad Sci USA* 89: 4109-4113.
5. BROXMEYER, H. E., COOPER, S. (1997) High-efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years. *Clin Exp Immunol* 107 (1): 45-53.
6. MUGISHIMA, H., HARADA, K., CHIN, M., SUZUKI, T., TAKAGI, K., HAYAKAWA, S., SATO, K., KLEIN, J. P., GALE, R. P. (1999) Effects of long-term cryopreservation on hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Bone Marrow Transpl* 23 (4): 395-6.
7. BROXMEYER, H. E., SROUR, E. F., HANGOC, G., COOPER, S., ANDERSON, S. A., BODINE D.M. (2003) 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.
8. LEWIS, I. D., VERFAILLIE, C. M. (2000) Multilineage expansion potential of primitive hematopoietic progenitors. Superiority of umbilical cord blood compared to mobilized peripheral blood. *Exp Hematol* 28: 1087-9.
9. FRASSONI, F. *et al.* (2003) Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir as compared to bone marrow transplantation. *Blood* in press
10. <http://www.parentsguidecordblood.com>, A parent's guide to cord blood banks with emphasis on how to evaluate private bank services.
11. BALLEEN, K. *et al.* (2001) Current status of cord blood banking and transplantation in the United States and Europe. *Biol Blood Marrow Tr* 7: 653-645.
12. LENNARD, A. L., JACKSON, G. H. (2000) Clinical review: Stem cell transplantation. *Brit Med J* 321: 433-37.
13. LEE, N. S., CHEONG, H. J., KIM, S. J., KIM, S. E., KIM, C.K., LEE, K. T., PARK, S. K., BAICK, S. H., HONG, D. S., PARK, H. S., WON, J. H. (2003) Ex vivo purging of leukemia cells using tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand in hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 17 (7):1375-83.
14. KOHN, D. B., WEINBERG, K. I., NOLTA, J. A., HEISS, L. N., LENARSKY, C., CROOKS, G. M., HANLEY, M. E., ANNETT, G., BROOKS, J. S., EL-KHOUREY, A., *et al.* (1995) Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1 (10):1017-23.
15. KOHN, D. B. *et al.* (1998) T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34+ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 4 (7):775-80.
16. SCHMIDT, M., CARBONARO, D. A., SPECKMANN, C., WISSLER, M., BOHNSACK, J., ELDER, M., ARONOW, B. J., NOLTA, J. A., KOHN, D. B., VON KALLE, C. (2003) Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9 (4): 463-8.
17. BARKER, J. N. *et al.* (2001) Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood* 97: 2957-2961.
18. MORETTA, A. *et al.* (2001) Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. *Exp Hematol* 29: 371-379.
19. LAPORTE, J. P., GORIN, N., RUBINSTEIN, P. *et al.* (1996) Cord blood transplantation from unrelated donor in an adult with chronic myelogenous leukemia. *Eng J Med* 335: 167-70.
20. SANZ, M. A. *et al.* (2002) Unrelated donor umbilical cord blood transplantation in adults. *Leukemia* 16 (10): 1984-91.
21. BARKER, J. N. *et al.* (2003) Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced intensity conditioning. *Blood* 102 (5):1915-9.

22. SANZ, G. F. (2001) Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 98 (8): 2332-2338.
23. LAUGHLIN, M. J. *et al.* (2001) Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical cord blood from unrelated donors. *New Engl J Med* 344 (24): 1815-1822.
24. COLTER, D., CLASS, R. *et al.* (2000) Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (7): 3213-18.
25. MAYANI, H., LANSDORP, P. (1998) Biology of human umbilical cord blood - derived hematopoietic stem / progenitor cells. *Stem Cells* 16: 153-65.
26. ROBMANITH, T. *et al.* (2001) Interleukin 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells and maintains the engraftment potential of SCID repopulating cells. *Stem Cells* 19: 313-320.
27. LAM, A. C. *et al.* (2001) 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): 1567-1576.
28. REIFFERS, J. *et al.* (1999) Abrogation of post-myeloablative chemotherapy neutropenia by ex vivo expanded autologous CD34 positive. *Cells Lancet* 354: 1092-3.
29. PAQUETTE, R. L. *et al.* (2000) Ex vivo expanded unselected peripheral blood: progenitor cells reduce posttransplantation neutropenia, thrombocytopenia, and anemia in patients with breast cancer. *Blood* 96: 2385-90.
30. SHPALL, E. J. *et al.* (1999) Transplantation of adult and pediatric cancer patients with cord blood progenitors expanded ex vivo. *Blood* 94: 712-19.
31. MCNIECE, I. *et al.* (2000) Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Exp Hematol* 28: 1181-6.
32. HOWS, J. M. (2001) Status of umbilical cord blood transplantation in the year 2001. *J Clin Pathol* 54: 428-434.
33. GLUCKMAN, E., ROCHA, V., BOYER-CHAMARD, A. *et al.* (1997) Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *New Eng J Med* 337: 373-81.
34. ERICES, A. *et al.* (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Brit J Haematol* 109: 235-242.
35. ROMANOV, Y. A. (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21 (1): 105-10.
36. JIANG, Y. *et al.* (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (6893): 41-9.
37. BUZANSKA, L. *et al.* (2003) Neural stem cell line derived from human umbilical cord blood - morphological and functional properties. *J Neurochem* 85 (2):33.
38. SANCHEZ-RAMOS, J. R. (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69 (6): 880-93.
39. BICKNESE, A. R. *et al.* (2002) Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. *Cell Transplant* 11 (3): 261-4.
40. BUZANSKA, L. (2002) Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 115 (10): 2131-8.
41. WANG, X. *et al.* (2003) 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.
42. KAKINUMA, S. *et al.* (2003) Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 21 (2): 217-27.
43. ROSADA, C. *et al.* (2003) The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue Int* 72 (2): 135-42.
44. GOODWIN, H. S. *et al.* (2001) 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.
45. EGGERMANN, J. *et al.* (2003) Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 58 (2): 478-86.
46. RAFFI, S., LYDEN, D. (2003) Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9 (6): 702-712.

47. PESCE, M., ORLANDI, A., IACHININOTO, M. G., STRAINO, S., TORELLA, A. R., RIZZUTI, V., POMPILIO, G., BONANNO, G., SCAMBIA, G., CAPOGROSSI, M. C. (2003) Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res* 93 (5): 51-62.
48. GARBUZOVA-DAVIS, S., WILLING, A. E., ZIGOVA, T., SAPORTA, S., JUSTEN, E.B., LANE, J.C., HUDSON, J. E., CHEN, N., DAVIS, C. D., SANBERG, P. R. (2003) 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.
49. SAPORTA, S., KIM J. J., WILLING, A. E., FU, E. S., DAVIS, C. D., SANBERG, P. R. (2003) 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.
50. WANG, X., GE, S., McNAMARA, G., HAO, Q. L., CROOKS, G. M., NOLTA, J. A. (2003) 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.
51. FERREIRA, E., PASTERNAK, J., BACAL, N., DE CAMPOS GUERRA, J. C., MITIE WATANABE, F. (1999) Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transpl* 24 (9): 1041.
52. COHEN, Y. & NAGLER, A. (2004) Cord blood biology and transplantation, *Israel Med Assoc J* 6: 39-46.
53. COHEN, Y. & NAGLER, A. (2003) Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical-cord blood. *Leukemia Lymphoma* 44 (8): 1287-99.
54. <http://www.viacellinc.com/index.asp> - website for ViaCell, Inc., a cellular medicine company that owns and operates Viacord, a umbilical cord blood stem cell storage company.
55. LEE, O. K., KUO T. K., CHEN, W.M., LEE, K. D., HSIEH, S. L., CHEN, T. H. (2004) Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood* 103: 1669 - 75
56. JANG, Y. K., PARK, J. J., LEE, M. C., YOON, B. H., YANG, Y. S., YANG, S. E., KIM, S. U. (2004) Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 75 (4): 573-84.
57. FRUCHTMAN, S. M., HURLET, A., DRACKER, R., ISOLA, L., GOLDMAN, B., SCHNEIDER, B. L., EMRE, S. (2004) The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow T* 10 (11): 741-2.
58. KOGLER, G., SENSKEN, S., AIREY, J. A., TRAPP, T., MUSCHEN, M., FELDHAHN, N., LIEDTKE, S., SORG, R. V., FISCHER, J., ROSENBAUM, C., GRESCHAT, S., KNIPPER, A., BENDER, J., DEGISTIRICI, O., GAO, J., CAPLAN, A. I., COLLETTI, E. J., ALMEIDA-PORADA, G., MULLER, H. W., ZANJANI, E., WERNET, P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200 (2): 123-35.
59. SCHMIDT, D., BREYMAN, C., WEBER, A., GUENTER, C. I., NEUENSCHWANDER, S., ZUND, G., TURINA, M., HOERSTRUP, S. P. (2004) Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Ann Thorac Surg* 78 (6): 2094-8.
60. LAUGHLIN, M. J., EAPEN, M., RUBINSTEIN, P., WAGNER, J. E., ZHANG, M. J., CHAMPLIN, R. E., STEVENS, C., BARKER, J. N., GALE, R. P., LAZARUS, H. M., MARKS, D. I., VAN ROOD, J. J., SCARADAVOU, A., HOROWITZ, M. M. (2004) Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *New Engl J Med* 351 (22): 2265-75.
61. ROCHA, V., LABOPIN, M., SANZ, G., ARCESE, W., SCHWERDTFEGER, R., BOSI, A., JACOBSEN, N., RUUTU, T., DE LIMA, M., FINKE, J., FRASSONI, F., GLUCKMAN, E. (2004) Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group; Eurocord-Netcord Registry. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *New Engl J Med* 351 (22): 2276-85.
62. SANZ, M. A. (2004) Cord-blood transplantation in patients with leukemia—a real alternative for adults. *New Engl J Med* 351 (22): 2328-30.