

Artigo de Revisão/Review Article

A importância crescente do cordão umbilical – desafios actuais da terapia com células estaminais

The growing importance of the umbilical cord – current challenges of stem cell therapy

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

ABSTRACT

Umbilical cord blood, collected immediately after birth, contains a high number of haematopoietic stem cells. Currently, the main beneficiaries of haematopoietic stem cell therapies are patients who suffer from hemato-oncological diseases, like leukaemia or individuals with immunological diseases. Umbilical cord blood is a stem cell source with increasing importance, not only because of immediate availability, but also due to the intrinsic properties of these cells, such as a high proliferative capacity and immaturity. It is possible to expand cord blood haematopoietic stem cells in the laboratory, suggesting that in the future a higher number of patients could benefit from these cells. Recently, non-haematopoietic stem cells were isolated from umbilical cord blood. These cells have the capacity to differentiate into distinct lineages, such as bone, cartilage or even neural cells. Ongoing pre-clinical studies in animal models anticipate further applications of umbilical cord blood, outside the haematological context. Despite current challenges, the era of regenerative medicine holds great promise for the future.

APLICAÇÕES ACTUAIS DAS CÉLULAS DO CORDÃO UMBILICAL – CONTEXTO AUTÓLOGO E HETERÓLOGO

As células estaminais do sangue do cordão umbilical apresentam inúmeras aplicações terapêuticas ao nível das doenças hemato-oncológicas, sendo actualmente consideradas uma alternativa às células estaminais da medula óssea¹. Foram já realizados mais de 7000 transplantes com sangue do cordão umbilical, mais de um terço em indivíduos adultos². A grande maioria destes

transplantes foi efectuado num contexto heterólogo, ou seja, sendo o dador uma outra pessoa que não o paciente. No contexto heterólogo, as células estaminais do sangue do cordão umbilical são utilizadas em pacientes com diversas doenças tais como leucemias, linfomas, tumores sólidos e outras doenças, hereditárias ou adquiridas do sistema sanguíneo ou imunitário³. É o caso das imunodeficiências adquiridas severas, um grupo de doenças do sistema imunitário, que podem ser tratadas através de transplante com células estaminais

* Doutora em Biologia Molecular

** Bioquímico

*** Doutor em Bioquímica Médica

Conflitos de interesse: Os autores Margarida Vieira, Luís Gomes, André Gomes e Raul Santos pertencem aos quadros da empresa Crioestaminal. O autor Gonçalo Castelo-Branco é investigador do Karolinska Institute e consultor científico da Crioestaminal.

hematopoéticas. Recentemente, uma criança portuguesa com 14 meses, a quem foi diagnosticada uma imunodeficiência combinada severa recebeu um transplante com células estaminais do sangue do cordão umbilical do irmão, criopreservadas num banco privado português. Num contexto autólogo (em que o paciente utiliza as suas próprias células anteriormente criopreservadas), já foram tratadas também diversas doenças, como por exemplo anemia aplástica adquirida^{4,5}, certos tipos específicos de tumores sólidos (como neuroblastomas e retinoblastomas)⁶, síndrome de Shwachman-Diamond, deficiência imunitária da deaminase da adenosina (em combinação com terapia génica)⁷ e recentemente um caso de leucemia⁸. Tratou-se de uma criança diagnosticada com leucemia linfoblástica aguda aos três anos de idade que após quimioterapia apresentou uma recaída do sistema nervoso central. Na ausência de um dador compatível os médicos optaram por utilizar células estaminais do seu próprio sangue do cordão umbilical, que haviam sido criopreservadas à nascença num banco privado. Dois anos após o transplante, a criança mantém-se saudável e sem recaídas.

EXPANSÃO DE CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS

Um dos factores determinantes para o sucesso de um transplante é a quantidade de células estaminais transplantadas, directamente relacionada com o peso corporal do paciente. O volume de sangue do cordão umbilical recolhido durante o parto contém, regra geral, quantidades suficientes de células para utilizar em transplantes pediátricos, mas que podem não ser suficientes para um transplante no adulto. Diversas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a quantidade de células estaminais usadas no transplante⁹, tais como utilizar duas unidades compatíveis de sangue do cordão umbilical¹⁰, co-infundir células do sangue do cordão umbilical com células estaminais mesenquimais ou multiplicar em laboratório as células estaminais hematopoéticas^{11,12}. Vários laboratórios em todo o mundo encontram-se a otimizar protocolos de expansão para multiplicar as células estaminais do sangue do cordão umbilical, tendo em vista o seu uso alargado em pacientes adultos. Apesar dos resultados promissores, é necessário aguardar pelos resultados dos ensaios clínicos em curso.

Também em Portugal, um grupo de investigadores do Instituto Superior Técnico está a estudar quais as melhores condições para expandir as células estaminais hematopoéticas do sangue do cordão umbilical¹³. Neste projecto pretende-se desenvolver metodologias que permitam aumentar a quantidade de células estaminais existentes no sangue do cordão umbilical, mantendo as suas capacidades regenerativas e em simultâneo estudar a viabilidade das células expandidas após a criopreservação. É importante garantir que estas células mantêm a sua capacidade de proliferação mesmo depois de criopreservadas. Aumentar o número de células estaminais existentes no sangue do cordão umbilical permitirá alargar o seu uso a um maior número de pacientes, bem como utilizar as células estaminais em mais do que uma aplicação terapêutica.

CÉLULAS NÃO-HEMATOPOIÉTICAS NO SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL - AVANÇOS RECENTES

O sangue do cordão umbilical não possui apenas células estaminais hematopoéticas. Tal como a medula óssea, possui igualmente células estaminais mesenquimais¹⁴⁻¹⁷, que são células com a capacidade de se diferenciarem em linhagens mesodérmicas e dar origem a osso ou cartilagem, por exemplo.

Recentemente foi também isolada uma subpopulação de células estaminais pluripotentes a partir de sangue do cordão umbilical humano, as chamadas células estaminais somáticas não-restritas (USSCs)¹⁸. Estas células, com elevado potencial proliferativo, têm a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares, podendo originar células neuronais, ósseas, sanguíneas, hepáticas e cardíacas¹⁹. Num estudo pré-clínico recente as células USSCs foram transplantadas em suínos que sofreram um enfarte de miocárdio. Quatro semanas após o transplante foram detectadas células USSCs na zona afectada do miocárdio, observou-se ainda um aumento da taxa de perfusão na região e também uma melhoria da função cardíaca global²⁰.

Diversos autores têm descrito a obtenção de células não hematopoéticas, como p.ex. células neurais²¹⁻²³, hepatócitos²⁴⁻²⁶ células ósseas²⁷ ou células adiposas²⁸ a partir de células do sangue do cordão umbilical. Adicionalmente, o sangue do cordão umbilical contém

células progenitoras endoteliais, as quais se podem diferenciar em células da vasculatura, tendo potencial aplicação em enfartes do miocárdio, lesões dos membros inferiores e lesões da retina²⁹⁻³³.

Um grupo de investigadores do IPO de Lisboa está a isolar e a caracterizar as células progenitoras endoteliais presentes no sangue do cordão umbilical. Estas células são responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos³⁴ e podem vir a ser utilizadas na recuperação de danos vasculares, como os que ocorrem, por exemplo, nos pacientes diabéticos. A investigação está a ser conduzida há cerca de dois anos e baseia-se no estudo da neo-formação de vasos sanguíneos a partir de células precursoras isoladas do sangue do cordão umbilical. Numa fase inicial procurou definir-se os marcadores moleculares que permitem o isolamento e posterior caracterização destas células, derivadas do sangue do cordão umbilical. Depois foram identificados padrões de expressão genética que permitiram identificar fases distintas do processo de diferenciação dos progenitores endoteliais em células maduras. Estas informações poderão ser utilizados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas, e consequentemente mais específicas³⁵.

POTENCIAL CLÍNICO E DESAFIOS

A identificação de populações de células pluripotentes no sangue do cordão umbilical com capacidade de diferenciação em células de linhagens não-hemato-poéticas tem suscitado bastante interesse na comunidade científica. Alguns estudos em modelos animais sugerem que a gama de aplicações da terapia celular com as células estaminais do sangue do cordão umbilical poderá estender-se a outras doenças, como as doenças neurodegenerativas³⁶, doenças cardiovasculares^{37, 38} entre outras.

Recentemente foi descrita a produção *in vitro* de pequenos pedaços de tecido cardíaco³⁹ e também vasos sanguíneos artificiais⁴⁰ a partir de células isoladas do sangue do cordão umbilical e do próprio cordão. Um dos desafios actuais em cirurgia cardíaca pediátrica é o desenvolvimento de materiais para implante com capacidade de crescimento e regeneração. Neste estudo, usando células estaminais do sangue do cordão umbilical, foi possível sintetizar implantes de tecidos autólogos, que poderão constituir uma alternativa promissora aos

actuais dispositivos sintéticos usados para a correcção de deficiências cardíacas congénitas.

Num outro trabalho foi possível obter células musculares cardíacas funcionais a partir de células mesenquimais do sangue do cordão umbilical⁴¹. Os autores sugerem que a população de células mesenquimais existentes no sangue do cordão umbilical possui potencial cardiomiogénico. Este trabalho vem reforçar o potencial do sangue do cordão umbilical como fonte de células para terapia celular em cardiologia.

O potencial do sangue do cordão umbilical nas doenças neurodegenerativas tem também sido estudado. Dasari e colaboradores transplantaram células do sangue do cordão umbilical humanas em ratinhos com lesões na espinal-medula, verificando que estas células contribuem para melhorar a função motora dos animais⁴².

Com os avanços cada vez maiores na investigação com células estaminais, para além das doenças que actualmente já beneficiam do sangue do cordão umbilical, muitas outras poderão beneficiar de um transplante com células estaminais do sangue do cordão umbilical. O uso destas células poderá ser alargado, não só pela sua aplicabilidade para doenças hemato-oncológicas em pacientes de maior peso, mas também pela sua utilização, por exemplo, na área cardiovascular ou na regeneração de outros tecidos. Acredita-se que estas aplicações possam estar disponíveis daqui a alguns anos. O desafio, no futuro, passará também por definir e standardizar procedimentos seguros de isolamento e processamento das diferentes populações de células estaminais/progenitoras do sangue do cordão umbilical, para que seja possível transferir para o contexto de ensaio clínico os protocolos laboratoriais desenvolvidos.

BIBLIOGRAFIA

1. Barker JN, Wagner JE: Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. *Curr Opin Oncol* 2002;14:160-164.
2. Rubenstein P. Why cord blood? *Human Immun* 2006;67:398-404.
3. Gluckman E. Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transp* 2006;12:808-812.
4. Fruchtman SM, Hurler A, Dracker R, Isola L, Goldman B, Schneider BL, Emre S. The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transp* 2004;10(11):741-742.
5. Hough RE, MacMillen ML, Ramsay NKC, Wagner JE. Successful neutrophil recovery following autologous umbilical cord blood. *Blood* 2003;102(11):5306.
6. Ferreira E, Pasternak J, Bacal N, de Campos Guerra JC, Mitie Watanabe F. Autologous cord blood transplantation. *Bone Marrow Transp*

- 1999;24(9):1041.
7. Kohn DB, Weinberg KI, Nolte JA, Heiss LN, Lenarsky C, Crooks GM et al. Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nature Med* 1995;2(10):1017-1023.
 8. Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi SN. First report of autologous cord blood transplantation in the treatment of a child with leukemia. *Pediatrics* 2007;119(1):296-300.
 9. de Lima M, Shpall E. Strategies for widening the use of cord blood in hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006;91(5):584-588.
 10. Haspel RL, Ballen K. Double cord blood transplants: filling a niche? *Stem Cell Rev* 2006;2(2):81-86.
 11. Robinson SN, Ng J, Niu T, Yang H, McMannis JD, Karandish S et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transp* 2006;37(4):359-366.
 12. Parmar S, Robinson SN, Komanduri K, St John L, Decker W, Xing D et al. Ex vivo expanded umbilical cord blood T cells maintain naïve phenotype and TCR diversity. *Cytotherapy* 2006;8(2):149-157.
 13. Gonçalves R, da Silva CL, Ferreira BS, Lemos MA, Lemos F, Almeida-Porada G, Cabral JM. Kinetic analysis of the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Biotechnol Lett* 2006;28(5):335-40.
 14. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Bras J Haematolog.*2000;109:235-242.
 15. Romanov YA, Svitsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21(1):105-110.
 16. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22(4):625-34.
 17. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multi-potent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-1675.
 18. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200(2):123-35.
 19. Fallahi-Sichani M, Soleimani M, Najafi SM, Kiani J, Arefian E, Atashi A. In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine-associated genes into neuron-like cells. *Cell Biol Int* 2007;31(3):299-303.
 20. Kim B-O, Tian H, Prasongsukarn K, Wu J, Angoulvant D, Wnendt S, et al. Cell Transplantation Improves Ventricular Function After a Myocardial Infarction: a pré-clinical study of human USSC in a porcine model. *Circulation* 2005;112:96-104.
 21. Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domanska-Janik K. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 2006;15(3):391-406.
 22. Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 2002;115(10): 2131-8.
 23. Jang Y.K., Park J.J., Lee M.C., Yoon B.H., Yang Y.S., Yang S.E., Kim S.U. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res* 2004;75(4):573-84.
 24. Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;101(10):4201-8.
 25. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330(4):1153-61.
 26. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003;21(2):217-27.
 27. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcified Tissue Int* 2003;72(2):135-42.
 28. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transp* 2001;7(11):581-8.
 29. Eggermann J, Kliche S, Jarmy G, Hoffmann K, Mayr-Beyrle U, Debatin KM et al. Endothelial progenitor cell culture and differentiation in vitro: a methodological comparison using human umbilical cord blood. *Cardiovasc Res* 2003;58(2):478-86.
 30. Raffi S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9(6):702-712.
 31. Schmidt D., Breymann C., Weber A., Guenter C.I., Neuenschwander S., Zund G, Turina M., Hoerstrup S.P. Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts. *Ann Thorac Surg* 2004;78(6):2094-8.
 32. Ma N, Stamm C, Kaminski A, Li W, Kleine HD, Muller-Hilke B, Zhang L, Ladilov Y, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/scid-mice. *Cardiovasc Res* 2005;66(1):45-54.
 33. Ott I, Keller U, Knoedler M, Götz KS, Doss K, Fischer P et al. Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 2005;19(8):992-4.
 34. Finney MR, Greco NJ, Haynesworth SE, Martin JM, Hedrick DP, Swan JZ, et al. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12(5):585-93.
 35. Igraja C et al. Evidence for distinct molecular phenotypic stages during endothelial progenitor differentiation: identification of EPC molecular defects on diabetic patients (in press).
 36. Newman MB, Davis CD, Borlongan CV, Emerich D, Sanberg PR. Transplantation of human umbilical cord blood cells in the repair of CNS diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4(2):121-30.
 37. Chen HK, Hung HF, Shyu KG, Wang BW, Sheu JR, Liang YJ et al. Combined cord blood stem cells and gene therapy enhances angiogenesis and improves cardiac performance in mouse after myocardial infarction. *Eur J Clin Inv* 2005;35:677-686.
 38. Leor J, Guetta E, Chouraqui P, Guetta V, Nagler A. Human umbilical cord blood cells: a new alternative for myocardial repair? *Cytotherapy* 2005;7(3): 251-257.
 9. Schmidt D, Mol A, Neuenschwander S, Breymann C, Gossi M, Zund G, Turina M, Hoerstrup SP. Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27(5):795-800.
 40. Schmidt D, Asmis LM, Odermatt B, Kelm J, Breymann C, Gossi M, Genoni M, Zund G, Hoerstrup SP. Engineered living blood vessels: functional endothelia generated from human umbilical cord-derived progenitors. *Ann Thorac Surg* 2006;82(4):1465-71.
 41. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Miss, Uyama T, Okamoto K, et al. The Significant Cardiomyogenic Potential of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *Stem Cells* 2007; May 10 [Epub ahead of print]
 42. Dasari VR, Spomar DG, Gondi CS, Sloffer CA, Saving KL, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2007;24(2):391-410.