

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# Potencial terapêutico das células estaminais do cordão umbilical

Ana Filipa Fernandes Silva

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



# Potencial terapêutico das células estaminais do cordão umbilical

Ana Filipa Fernandes Silva

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada  
à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Orientadora: Doutora Isabel Bettencourt Moreira Silva, Professora auxiliar

2017

## Resumo

Na década de 80 demonstrou-se, pela primeira vez, que o cordão umbilical é uma fonte relevante de células hematopoiéticas transplantáveis. A partir daí, é considerado um importante reservatório de células, com potencial terapêutico para muitas situações clínicas. Embora o sangue do cordão umbilical seja utilizado essencialmente em doenças hematológicas, o espectro de patologias para as quais fornece terapia efetiva foi expandido de forma significativa, incluindo também condições não hematológicas.

O cordão umbilical é utilizado como fonte de terapia celular regenerativa e modulação imunológica. A colheita e criopreservação de células derivadas do cordão umbilical tornaram-se, assim, uma opção frequente. No entanto, levantam-se questões sobre o custo *versus* os benefícios dos bancos de células estaminais e, também, questões éticas e jurídicas complexas.

Esta monografia estuda questões relacionadas com a conservação de células derivadas do sangue e tecido do cordão umbilical e o grande potencial de aplicações clínicas atuais. Em particular, descrevem-se as questões práticas inerentes à colheita, processamento e conservação a longo prazo das células recolhidas do cordão umbilical, aos diferentes tipos de células estaminais existentes e suas atuais e potenciais aplicações clínicas. Torna-se, assim, evidente a tendência crescente de utilização destas células estaminais em cuidados de saúde em todo o mundo.

**Palavras-chave:** cordão umbilical, células estaminais, criopreservação, bancos de células, aplicações terapêuticas

## Abstract

In the 1980s it was found evidence that the umbilical cord is a relevant source of transplantable hematopoietic cells. Since then, it is now considered the most abundant reservoir of cells with therapeutic potential for many clinical cases. Although umbilical cord blood is used primarily in haematological diseases the spectrum of pathologies for which it provides effective therapy has been significantly expanded including non-haematological conditions.

Umbilical cord is used today as a source of regenerative cellular therapy and immune modulation. Harvesting and cryopreservation of umbilical cord-derived cells have thus become a frequent option. However, questions have been raised on the cost versus the benefits of stem cell banks and some complex ethical and legal issues are being discussed.

This monography examines the preservation of blood-derived cells and umbilical cord tissue and the great potential of its current clinical applications. It examines the practical issues of long-term collection, processing and conservation of umbilical cord harvested cells and describes the different types of existing stem cells and their current and potential clinical applications. It concludes that it is possible to see an increasing trend on the use of stem cells in health care around the world.

**Key words:** umbilical cord, stem cells, cryopreservation, cell banks, therapeutic applications

## Agradecimentos

Esta monografia é o culminar de uma longa sequência de acontecimentos, e são devidos agradecimentos a várias pessoas.

À professora doutora Isabel Bettencourt Moreira da Silva, pela coordenação deste projeto e pela ajuda cedida em todas as etapas da sua concretização.

À minha família e amigos, pelo seu empenho e incentivo moral na construção não só de mais esta etapa académica, mas também de toda a minha vida.

A todos os colegas de trabalho que generosamente permitiram que não faltasse às aulas e sempre se mostraram disponíveis para me ajudar na conciliação entre trabalho e estudos, e também pelo seu incentivo e apoio.

Ao companheiro Luís Silva, que me acompanhou desde o início em todo o percurso académico, me ajudou e apoiou como ninguém, e tornou melhores todos os estudos, todas as viagens e todos os dias difíceis. Este canudo também é teu.

## Siglas e Abreviaturas

BMP7 - Proteína óssea morfogenética 7

CD133 - Cluster of Differentiation 133

CD34 - Cluster of Differentiation 34

DLK-1/PREF1 - Delta, Homolog-like 1/Preadipocyte factor 1

DMSO - Dimetilsufóxido

HIF-1 $\alpha$  - Hypoxia-inducible factor 1-alpha

HLA-DR - Human Leukocyte Antigen-antigen D Related

IgE – Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

NOD2 - nucleotide-binding oligomerization domain containing 2

PGF - Placental growth factor

TGF- $\beta$  - Transforming growth factor beta

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

# Índice Geral

Resumo .....	2
Abstract.....	3
Agradecimentos .....	4
Siglas e Abreviaturas .....	5
Índice de Figuras .....	9
Índice de Tabelas .....	10
1.Introdução.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Materiais e Métodos .....	13
4.Células estaminais .....	14
4.1. Características das células estaminais.....	14
4.2. Fontes de células estaminais .....	15
4.3. Classificação das células estaminais .....	15
4.3.1 Quanto à origem.....	15
4.3.2. Quanto ao potencial de diferenciação .....	16
4.4. Diferenças e semelhanças entre células estaminais embrionárias e células estaminais adultas .....	17
4.5. Células estaminais pluripotentes induzidas .....	18
5. Células estaminais do cordão umbilical .....	18
5.1. Células estaminais hematopoiéticas.....	18
5.2. Células estaminais mesenquimais .....	19
5.3. Células progenitoras endoteliais .....	21
5.4. Células estaminais somáticas não restritas .....	21
5.5. Células estaminais <i>embryonic-like</i> .....	21
6. Colheita e conservação de células estaminais .....	22
6.1. Vantagens e Limitações .....	22
6.2. Processo de criopreservação .....	23
6.2.1. Colheita e transporte .....	23
6.2.2. Processamento.....	24
6.2.3. Criopreservação.....	24
6.2.3.1. Método de congelamento com DMSO por redução de glóbulos vermelhos.....	26

6.2.3.2. Método de congelamento com DMSO por redução plasmática.....	26
6.2.3.3. Método de congelamento lento .....	26
6.2.3.4. Método de vitrificação.....	27
6.2.4. Descongelamento e lavagem.....	28
7. Bancos de criopreservação .....	30
7.1. Em Portugal .....	30
7.1.1. Bancos privados .....	30
7.1.1. Banco público.....	30
7.2. Na Europa e no mundo .....	31
8. Questões éticas .....	32
9. Aplicações terapêuticas .....	34
9.1. Aplicações atuais .....	34
9.1.1 Tratamento de doenças isquémicas.....	34
9.1.2. Anemia Aplástica Severa e Síndrome Mielodisplásica Hipoplásica .....	35
9.1.3. Doenças metabólicas.....	35
9.1.3.1. Doença de Krabbe .....	35
9.1.3.2. Síndrome de Hurler .....	35
9.1.4. Leucemia mieloide .....	36
9.2. Aplicações em estudo .....	38
9.2.1. Doenças autoimunes.....	38
9.2.1.1. Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 1.....	38
9.2.1.2. Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.....	39
9.2.1.3. Artrite reumatoide .....	39
9.2.2. Doenças neurológicas .....	39
9.2.2.1. Doença de Alzheimer .....	40
9.2.2.2. Encefalopatia hipóxico-isquémica moderada ou grave.....	40
9.2.2.3. Paralisia cerebral .....	40
9.2.2.4. Autismo .....	41
9.2.3. Doenças respiratórias .....	41
9.2.3.1. Lesão pulmonar aguda.....	41
9.2.3.2. Asma.....	42
9.2.3.3. Displasia broncopulmonar.....	42
9.2.4. Doenças hepáticas .....	42

9.2.4.1. Cirrose hepática.....	42
9.2.5. Doenças inflamatórias intestinais.....	43
9.2.5.1. Colite ulcerosa e Doença de Crohn .....	43
9.2.6. Doenças cardiovasculares .....	43
9.2.6.1. Enfarte do miocárdio .....	43
9.2.6.2. Estenose arterial .....	44
9.2.7. Doenças hematológicas .....	44
9.2.7.1. Anemia aplásica severa .....	44
9.2.8. Neoplasias .....	45
9.2.8.1. Recuperação após tratamentos antineoplásicos.....	45
9.2.8.2. Glioblastoma .....	45
9.2.9. Regeneração de feridas .....	45
9.2.9.1. Feridas diabéticas .....	46
10. Conclusões e perspectivas .....	47
Referências bibliográficas .....	48

## Índice de Figuras

Figura 1. Características das células estaminais.....	15
Figura 2. Origem dos diferentes tipos de células estaminais.....	17
Figura 3. Esquema da formação das CEPis e suas aplicações.....	18
Figura 4. Célula estaminal progenitora hematopoiética como origem dos vários tipos de células da linhagem sanguínea. ....	20
Figura 5. Célula estaminal mesenquimatosa precursora de várias linhagens celulares..	20
Figura 6. Esquema das etapas básicas de processamento e criopreservação das células do cordão umbilical. ....	29

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Vantagens da criopreservação das células do sangue do cordão umbilical relativamente às da medula óssea. ....	23
Tabela 2. Comparação dos métodos de congelamento lento e vitrificação. ....	27
Tabela 3. Doenças em cujo tratamento podem ser utilizadas células estaminais do sangue do cordão umbilical. ....	36

# 1.Introdução

As células estaminais multipotentes do sangue do cordão umbilical são uma fonte promissora em medicina regenerativa. Têm a capacidade de autorrenovação, uma taxa de proliferação elevada e a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células especializadas.

Devido à sua capacidade de regenerar tecidos danificados, a utilização destas células em medicina regenerativa é bastante promissora e muitos estudos vão sendo feitos nesse sentido.

Neste trabalho são analisadas questões relacionadas com a colheita e conservação das células estaminais do cordão umbilical, com os tipos de bancos de criopreservação das células, bem como questões éticas relacionadas com este procedimento. São também abordadas as aplicações terapêuticas atuais e as potenciais aplicações clínicas, com base em estudos atuais. Pretende-se especificamente perceber a importância das células estaminais do cordão umbilical para a medicina do futuro, e quais as vantagens e desvantagens da sua conservação a longo prazo.

A base de pesquisa para este trabalho foram os inúmeros estudos que vão sendo feitos nesta área, publicados em distintas revistas e compêndios científicos, dando-se prioridade ao que de mais atual se tem publicado.

É uma área que levanta algumas controvérsias, e no que diz respeito às questões éticas, verifica-se a ausência de unanimidade de opiniões, pelo que os países assumem posições distintas quanto à pesquisa de células estaminais embrionárias. É, por isso, essencial a supervisão por uma comissão de ética, que acompanhe a evolução dos progressos científicos nesta área, de acordo com o estabelecido em cada país.

Algumas limitações foram observadas ao longo desta análise, nomeadamente a dificuldade de transposição dos resultados de estudos de aplicação terapêutica para a realidade humana, já que muitos estudos têm por base a experiência animal. Outras limitações referem-se aos efeitos adversos do uso de células estaminais em terapia, ao uso de amostras relativamente pequenas, com características de saúde específicas, e sob tratamentos específicos, o que limita os resultados obtidos, não sendo possível uma extrapolação geral. Mais estudos devem ser feitos para colmatar estas dificuldades.

## 2. Objetivos

Tendo em conta que nas últimas décadas o potencial das células estaminais do cordão umbilical tem sido tema de debate constante, tanto no meio científico como a nível da comunidade em geral, o objetivo desta monografia é investigar acerca do potencial terapêutico destas células.

Sendo uma área em constante desenvolvimento, pretende-se, especificamente, aferir das inovações que têm ocorrido neste campo, como tipos de células estaminais mais importantes, novas aplicações terapêuticas, novos métodos de manipulação celular e metodologias de criopreservação.

### 3. Materiais e Métodos

Este estudo consiste numa revisão bibliográfica especializada, realizada entre março e setembro de 2017. A consulta baseou-se em artigos nacionais e internacionais nas bases de dados Google Scholar, PubMed/Medline e Scielo através das palavras-chave: *umbilical cord blood*, *hematopoietic stem cells*, *mesenchymal stem cells*, *cryopreservation*, *cord blood banking*, *therapeutic applications of stem cells*, e da combinação destas palavras.

Foram incluídos artigos sobre células estaminais do cordão umbilical humanas e animais. Selecionaram-se os artigos mais recentes na área, incluindo artigos de distintas revistas científicas, muitos deles por serem artigos de revisão citados noutras publicações, e de empresas especializadas na área da criopreservação de células estaminais. Foram excluídos artigos anteriores a 2004.

## 4. Células estaminais

As células estaminais são células indiferenciadas, sem a especialização funcional característica das células adultas de um organismo vivo. <sup>(1,2)</sup> Têm a capacidade de se diferenciar em várias linhagens celulares, dando origem às células específicas de cada tecido e órgão do nosso corpo. Esta especialização funcional vai ocorrendo ao longo de toda a vida, sendo que cada célula estaminal ao dividir-se pode permanecer como célula estaminal ou diferenciar-se numa célula com uma função específica. <sup>(3,4)</sup>

Estas células existem desde o embrião até à idade adulta, sofrendo alterações biológicas ao longo de todos os estadios de desenvolvimento. <sup>(1)</sup>

Funcionam como um sistema interno de reparação de tecidos e órgãos danificados e de substituição de células mortas, como na substituição diária de células a nível do cabelo, da pele, do sangue e do intestino. <sup>(4,5)</sup>

A diferenciação celular ocorre por etapas, e os fatores que desencadeiam cada uma delas são de origem intracelular, como os genes que codificam para funções e estruturas das células, e origem extracelular, como moléculas existentes no meio, o contacto com células vizinhas ou substâncias químicas secretadas por células contíguas. <sup>(3,4)</sup>

As células em estado intermédio de diferenciação são designadas de células progenitoras, que já têm uma via irreversível de especialização a seguir, dependendo do tecido onde se encontram. <sup>(1)</sup>

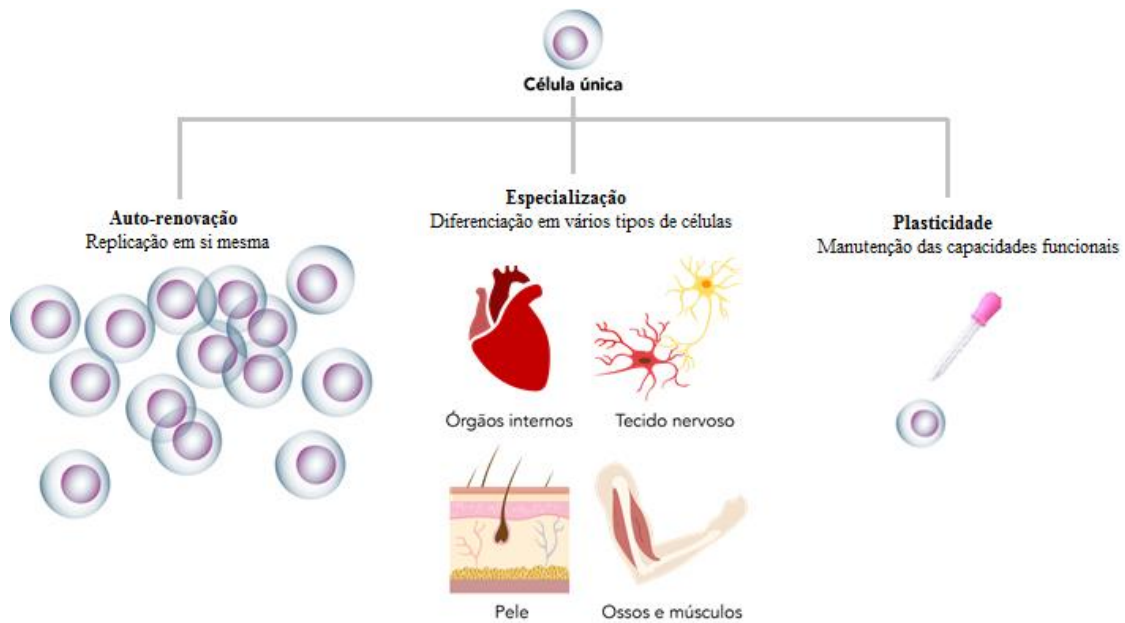
### 4.1. Características das células estaminais

As células estaminais possuem características únicas que as diferenciam de todas as outras células: a autorrenovação, a diferenciação em qualquer tipo de célula e a plasticidade. <sup>(3,5)</sup>

A autorrenovação é uma característica que permite que as células estaminais se dividam e renovem por períodos indefinidos. Ao contrário de algumas células que por norma não se replicam, como as células musculares, sanguíneas ou nervosas, as células estaminais têm a capacidade de proliferação contínua, podendo em laboratório dar origem a milhões de células estaminais, desde que não ocorra diferenciação, se forem replicadas por longos períodos de tempo. <sup>(1,4,5)</sup>

A capacidade de renovação em qualquer tipo de célula resulta do facto de as células estaminais serem indiferenciadas, não tendo estruturalmente funções específicas de nenhum tecido em particular. <sup>(2)</sup>

A plasticidade é também uma característica das células estaminais, observada em laboratório, permitindo que sejam manipuladas *in vitro* sem perderem as suas capacidades funcionais. Contudo, as células estaminais embrionárias são as que possuem maior potencialidade, ou seja, maior capacidade de diferenciação, competência que se vai perdendo à medida que se atinge o estado adulto. <sup>(1)</sup>



**Figura 1. Características das células estaminais. (Adaptado de 6)**

## 4.2. Fontes de células estaminais

São várias as fontes de células estaminais, sendo as principais o sangue e tecido do cordão umbilical, a medula óssea e o sangue periférico. Estão também presentes no tecido adiposo, mucosa nasal e polpa dentária. <sup>(1,2,4,5)</sup>

## 4.3. Classificação das células estaminais

### 4.3.1 Quanto à origem

As células estaminais podem ser classificadas de acordo com a sua origem em embrionárias, adultas e dos tecidos neonatais. As primeiras são células presentes nos primeiros estádios de desenvolvimento embrionário, sendo as que detêm maior potencial de diferenciação relativamente a todas as outras células estaminais. São totalmente indiferenciadas e delas derivam todas as células do organismo.

O ovo ou zigoto é a célula mais indiferenciada que existe. Dela resultam tecidos essenciais ao desenvolvimento do embrião, como a placenta e o cordão umbilical. A utilização de células embrionárias envolve questões éticas importantes, pelo que não são este tipo de células as utilizadas para a criopreservação. <sup>(2)</sup>

As células estaminais adultas, também designadas de somáticas, são células presentes no organismo adulto, em tecidos especializados. Têm menor capacidade de diferenciação, ou menor potencialidade, dando origem a células apenas da linhagem celular do tecido onde estão inseridos, como as da medula óssea, vasos sanguíneos do

sangue periférico, pele, fígado, músculo-esquelético, etc. Possuem uma função importante na reparação do tecido danificado onde se encontram.

As células do tecido neonatal podem ser consideradas células adultas, tendo em conta que se podem obter após o nascimento, mas têm características singulares, uma vez que o seu potencial de diferenciação é superior ao das células estaminais dos outros tecidos adultos. <sup>(1,2)</sup> Estas células são as utilizadas no processo de criopreservação, nomeadamente as células do sangue e tecido do cordão umbilical.

#### **4.3.2. Quanto ao potencial de diferenciação**

Quanto à capacidade de produzir novas linhagens celulares, ou potencialidade, as células estaminais classificam-se em unipotentes, multipotentes, pluripotentes ou totipotentes, por ordem crescente de competência. <sup>(1-3)</sup>

Durante a embriogénese verifica-se uma diminuição de potencialidade das células que constituem o embrião. As células embrionárias, nomeadamente o óvulo fertilizado e as células resultantes das suas primeiras divisões, os blastómeros, são as que têm maior potencial de diferenciação comparativamente a todas as outras células estaminais, e são por isso designadas de totipotentes. Perante certas condições, são capazes de originar um embrião viável, incluindo tecidos de suporte. Porém, após alguns dias, as células resultantes, o blastocisto, passam a ser pluripotentes, pois sozinhas não têm capacidade de dar origem a um embrião. <sup>(1-5)</sup>

O blastocisto é composto por uma camada externa de células, o trofoblasto, que dá origem aos tecidos extraembrionários como a placenta e saco amniótico. O trofoblasto engloba um conjunto de células que se designa de botão embrionário, composto por células pluripotentes, que dá origem ao epiblasto, precursor das três camadas germinativas embrionárias ectoderme, mesoderme e endoderme, de onde derivam todos os tecidos e órgãos. <sup>(7)</sup>

As células multipotentes derivam de células de um dos três folhetos germinativos referidos, e designam-se de multipotentes pois têm uma capacidade de diferenciação limitada às células do tecido onde se encontram. Estão presentes até ao 14º dia de desenvolvimento embrionário que corresponde à gastrulação. <sup>(1,3,4)</sup>

As células estaminais unipotentes são as células de tecidos adultos mais especializadas de todas, sendo que a sua capacidade de diferenciação ocorre apenas ao longo de uma linhagem. <sup>(4)</sup>

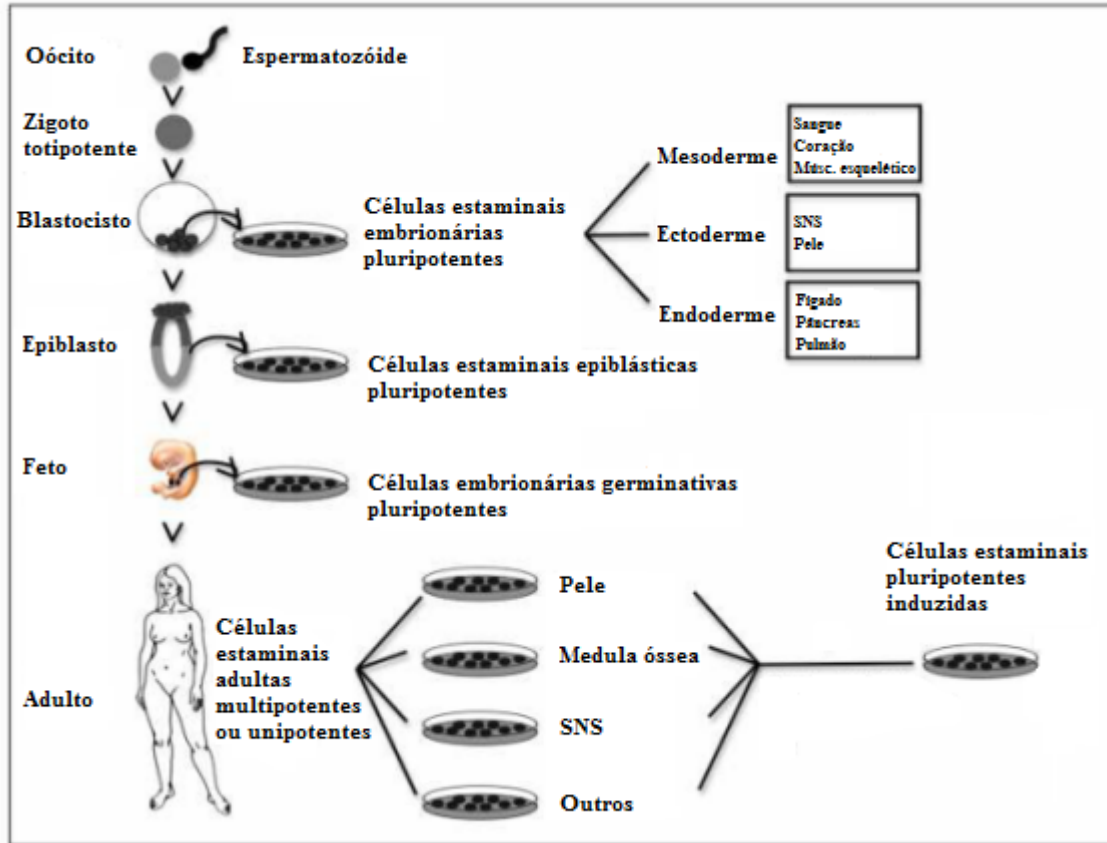


Figura 2. Origem dos diferentes tipos de células estaminais. (Adaptado de 7)

#### 4.4. Diferenças e semelhanças entre células estaminais embrionárias e células estaminais adultas

Um dos grandes interesses das células estaminais é o seu uso em terapias regenerativas. Neste sentido, uma das diferenças entre as células estaminais embrionárias e as células estaminais adultas é o número e o tipo de células diferenciadas que podem originar.

As células estaminais embrionárias, sendo pluripotentes, podem originar qualquer tipo de célula do organismo. Para além disso, a sua cultura *in vitro* é relativamente fácil, obtendo-se um número elevado de células importante em terapias de substituição.

A maioria das células estaminais adultas são multipotentes, logo a sua capacidade de diferenciação está limitada a tipos de células do tecido de origem. A sua cultura e isolamento são também mais difíceis, pois são raras nos tecidos maduros e ainda não foram elaborados métodos de expansão celular *in vitro*.

Outra característica de distinção destes dois tipos de células é a probabilidade de rejeição após transplante. Poucos ensaios têm sido feitos que comprovem a segurança de células estaminais transplantadas, no entanto são as células estaminais adultas as menos suscetíveis de causar rejeição após transplante. Isto porque são células

especializadas num tipo celular específico, bem como tecidos derivados destas células estaminais adultas, reintroduzidas no próprio paciente, logo a probabilidade de rejeição pelo sistema imunitário é menor. Isto reproduz uma grande vantagem uma vez que pode diminuir a necessidade de toma de fármacos imunossupressores cujos efeitos secundários são claramente nocivos. <sup>(4)</sup>

#### 4.5. Células estaminais pluripotentes induzidas

As CEPis de rato foram descritas pela primeira vez em 2006 e as CEPis humanas no final de 2007. Estas células demonstram características importantes pela expressão de marcadores de células estaminais, com capacidade de gerar células características das três camadas germinativas, capacidade que se designa de pluripotência. <sup>(4,7)</sup> São células adultas que foram geneticamente reprogramadas para um estado semelhante ao das células estaminais embrionárias. Têm a capacidade de autorrenovação e podem transformar-se em qualquer tipo de células. <sup>(7)</sup>

Podem ser obtidas a partir dos vários tipos celulares presentes no cordão umbilical, nomeadamente das células estaminais hematopoiéticas presentes no sangue ou das células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton. <sup>(4,7)</sup>

Extensa investigação decorre nesta área, para otimização de processos e possibilidade de futura utilização em medicina de transplante e regeneração de tecidos danificados no corpo humano. <sup>(4,8)</sup>

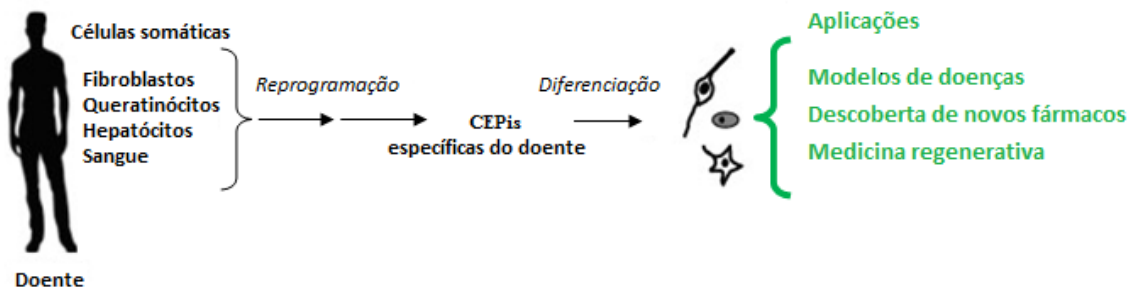


Figura 3. Esquema da formação das CEPis e suas aplicações. <sup>(7)</sup>

## 5. Células estaminais do cordão umbilical

### 5.1. Células estaminais hematopoiéticas

O sangue do cordão umbilical obtém-se do cordão umbilical do recém-nascido e da placenta logo após o momento do parto. Este sangue é rico essencialmente em células estaminais hematopoiéticas (CEHs) que têm a capacidade de diferenciação em qualquer célula da linhagem sanguínea. São semelhantes às células presentes na medula óssea, e por isso têm especial interesse como alternativa em transplantes hematopoiéticos. Têm no entanto algumas vantagens relativamente às células

hematopoiéticas da medula óssea: são mais imaturas, logo possuem maior vitalidade para proliferação, maior aceitabilidade no grau de compatibilidade HLA entre dador e doente, são mais acessíveis e apresentam melhor plasticidade, ou seja, preservam melhor a sua capacidade funcional após manipulação em laboratório. <sup>(2,5,8)</sup>

Caracterizam-se pelo marcador CD34+ <sup>(9)</sup> e CD133+. <sup>(10)</sup>

Na figura 4 é possível verificar a célula estaminal progenitora hematopoiética, pluripotente, com capacidade de se diferenciar em células multipotentes das séries mieloide e linfoide, e posterior especialização nas diferentes células do sistema sanguíneo e imunitário.

As CEHs ganharam especial relevo devido à potencialidade de utilização em tratamentos de inúmeras doenças relacionadas com os sistemas hematológico e imunitário e ainda em anemias, leucemias ou linfomas. <sup>(8)</sup>

A principal limitação do uso deste tipo de células estaminais é a baixa concentração conseguida, a nível do cordão umbilical. Por isso, são importantes métodos de expansão celular, *ex vivo*, de modo a conseguir um número de células compatíveis com o transplante. <sup>(10)</sup>

## 5.2. Células estaminais mesenquimais

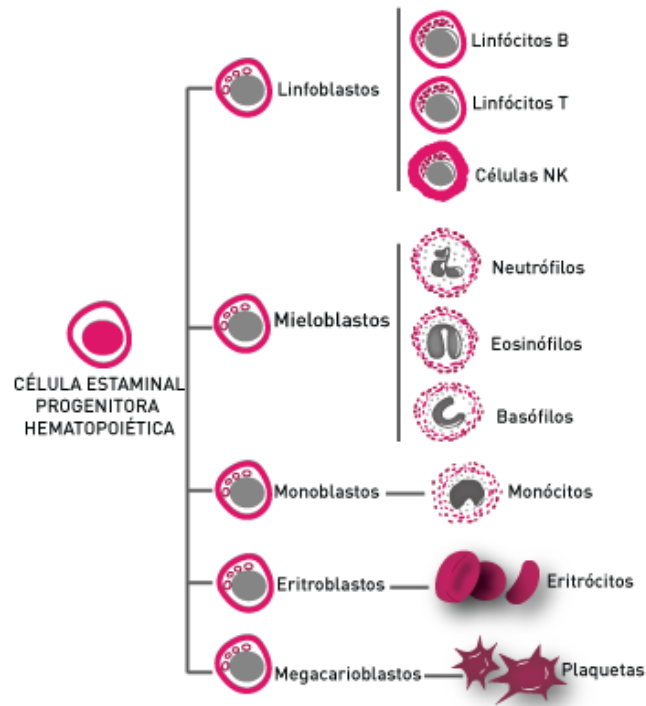
Estas células estão presentes tanto no sangue como no tecido do cordão umbilical, mas encontram-se em maior número neste último. Podem ser obtidas através de vários tecidos como a medula óssea ou tecido adiposo, mas é o tecido do cordão umbilical o que apresenta maiores vantagens no isolamento destas células, nomeadamente pela maior capacidade de diferenciação e maior taxa de divisão. O tamanho do cordão umbilical também facilita a manipulação o que leva a uma boa rentabilidade na obtenção deste tipo de células. <sup>(2)</sup>

As células estaminais mesenquimais (CEMs) são células multipotentes com grande potencial terapêutico, nomeadamente a nível da medicina regenerativa de tecidos e órgãos, pois têm um grande potencial de diferenciação, secretam fatores tróficos que levam à reestruturação dos tecidos e possuem propriedades imunorreguladoras. <sup>(11)</sup> As células estaminais mesenquimais não são originalmente imunossupressoras, mas adquirem esta propriedade em resposta à combinação com quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas imunossupressoras. <sup>(12)</sup> Esta característica faz com que estas células sejam promissoras no tratamento de doenças relacionadas com a imunidade e na doença do enxerto contra o hospedeiro. <sup>(11)</sup>

A capacidade de especialização é superior à das CEHs, e a capacidade de multiplicação e expansão em laboratório são também mais elevadas, o que permite mais do que uma utilização. <sup>(2)</sup>

A Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs um critério para definir células estaminais mesenquimais humanas, uma vez que não existe um marcador definido para estas células, descrevendo-as como positivas para os marcadores CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA-DR. <sup>(11,13)</sup>

Células estaminais mesenquimais da medula óssea, por exemplo, têm a capacidade de diferenciação em várias linhagens de tecidos mesenquimais como tecidos ósseo, adiposo, cartilagíneo, tendinoso, muscular e do estroma da medula (figura 5).<sup>(14)</sup>



**Figura 4. Célula estaminal progenitora hematopoética como origem dos vários tipos de células da linhagem sanguínea.**<sup>(8)</sup>



**Figura 5. Célula estaminal mesenquimal precursora de várias linhagens celulares.**<sup>(8)</sup>

### 5.3. Células progenitoras endoteliais

Células progenitoras ou precursoras são células com origem nas células estaminais que já possuem algum grau de diferenciação, na linhagem celular de origem. As que se diferenciam em células endoteliais, relacionadas com a formação dos vasos sanguíneos, são designadas de células progenitoras endoteliais (CPEs).<sup>(5)</sup>

Podem ser isoladas de vários tecidos, nomeadamente do sangue do cordão umbilical, medula óssea ou sangue periférico.<sup>(15)</sup>

São células com grande capacidade de proliferação, ao contrário das células endoteliais já maduras, importantes no fenómeno de angiogénese ou neovascularização, e por isso com grande potencial terapêutico a nível da medicina regenerativa e tratamento de doenças vasculares. No entanto, a baixa disponibilidade destas células é a maior limitação à sua utilização terapêutica e em investigação celular.<sup>(5,15)</sup>

### 5.4. Células estaminais somáticas não restritas

Estas células são um outro tipo de células estaminais multipotentes do sangue do cordão umbilical. São células raras em relação às células estaminais hematopoiéticas, mas podem expandir-se rapidamente. À semelhança das células estaminais mesenquimais, podem diferenciar-se nas linhagens dos tecidos ósseo e cartilágneo, não conseguindo, porém, a diferenciação adipogénica pela forte expressão do inibidor de adipócitos DLK-1/PREF1.<sup>(14)</sup>

Vários estudos mostram o potencial terapêutico das células estaminais somáticas não restritivas (CESNRs) na cicatrização óssea, na diminuição da doença do enxerto contra o hospedeiro, na reparação após enfarte do miocárdio e como veículos para terapia génica. Estão, por isso, sob investigação para uma série de aplicações terapêuticas.<sup>(14,16)</sup>

### 5.5. Células estaminais *embryonic-like*

Estas células definem-se como sendo capazes de originar células das três linhas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme.<sup>(9)</sup>

São células estaminais da medula óssea e outros tecidos adultos, que expressam marcadores de células de desenvolvimento embrionário precoce, como células estaminais embrionárias e primordiais pluripotentes,<sup>(17)</sup> tendo, no entanto, um potencial de diferenciação maior.<sup>(18)</sup>

Várias experiências mostram que certos tipos de células estaminais adultas podem diferenciar-se em células típicas de órgãos ou tecidos distintos da sua linhagem de origem, como por exemplo células derivadas da medula óssea que se diferenciam em células epiteliais pulmonares. A este fenómeno chama-se transdiferenciação, já observado em algumas espécies de vertebrados, e terão na origem estas células *embryonic-like*.<sup>(7)</sup>

São células móveis e foram detetadas no sangue periférico após enfarte do miocárdio, lesão de queimadura cutânea, acidente vascular cerebral e em pacientes com doença de Crohn, o que levanta a possibilidade de poderem participar na reparação de tecidos, ou que servem de reservatório de células estaminais adultas, ou que serão as suas precursoras.

A pluripotência destas células ainda não foi demonstrada *in vivo*, mais estudos devem ser feitos para confirmar esta propriedade e a sua importância em medicina regenerativa.<sup>(17)</sup>

## 6. Colheita e conservação de células estaminais

A criopreservação é a técnica que permite conservar as células estaminais por longos períodos de tempo sem que percam a sua viabilidade. Atualmente as células estaminais recolhidas do cordão umbilical são armazenadas sob condições controladas durante cerca de 25 anos, tempo durante o qual se mantêm exequíveis.<sup>(5)</sup>

### 6.1. Vantagens e Limitações

Criopreservar as células do cordão umbilical tem vantagens relativamente às células da medula óssea e do sangue periférico (tabela 1), mas a sua eficácia depende do número de células estaminais presentes no cordão umbilical que, sendo limitado, pode resultar numa recolha com um número de células inferior ao necessário para um tratamento. Esta limitação do número de células estaminais disponíveis no cordão umbilical, cinco a dez vezes inferior relativamente à medula óssea, leva também a um maior tempo de recuperação após transplante. A investigação atual procura técnicas que permitam aumentar o número de células estaminais das amostras recolhidas. Para além disso, a possibilidade de recolha de células estaminais do cordão umbilical para criopreservação é unicamente no momento do parto, enquanto da medula óssea são possíveis múltiplas recolhas.<sup>(5)</sup>

**Tabela 1. Vantagens da criopreservação das células do sangue do cordão umbilical relativamente às da medula óssea. (Adaptado de 5)**

	SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL	MEDULA ÓSSEA
DISPONIBILIDADE	Imediata, as células estaminais do sangue do cordão umbilical criopreservadas ficam prontas a ser utilizadas	Tempo de espera pode ser mais longo se for necessário encontrar um dador compatível
COMPATIBILIDADE	Maior tolerância, possibilidade de utilizar amostras mesmo quando a compatibilidade entre dador e paciente não é total	Menor tolerância, fazendo com que a probabilidade de encontrar um dador compatível seja menor
RISCO DE EFEITOS SECUNDÁRIOS	Menor, comparado com a medula óssea (doença do transplante contra o hospedeiro)	Maior, comparado com o sangue do cordão umbilical
RISCO E DESCONFORTO NA COLHEITA	A colheita é indolor e não apresenta riscos para a mãe ou para o bebé	A colheita envolve um procedimento cirúrgico simples com anestesia, mas invasivo, o que comporta sempre algum risco

## 6.2. Processo de criopreservação

O processo começa com o consentimento informado dos dadores de células do sangue do cordão umbilical, que uma semana antes ou depois do nascimento do bebé fazem testes de despiste de doenças infecciosas. <sup>(19)</sup>

### 6.2.1. Colheita e transporte

O tempo é um fator muito importante para o sucesso de todo o processo, pois a recolha tardia implica a ocorrência de coagulação sanguínea devido ao colapso dos vasos do cordão umbilical. A perda de fluxo sanguíneo, de pressão e a alteração de temperatura leva à formação de trombos, o que dificulta a extração de uma amostra viável.

O processo aplica-se à grande maioria dos partos, sejam vaginais ou por cesariana, induzidos ou não induzidos. É um procedimento não invasivo e não doloroso, que demora apenas alguns minutos, sendo um método simples de venipuntura, com recolha do sangue do cordão umbilical, ou recolha de tecido do cordão, para um recipiente estéril.

Durante esta etapa é possível ocorrer contaminação, essencialmente num parto vaginal onde o cordão umbilical contacta com fluidos vaginais ou derivados do cólon, que podem contaminar a amostra durante a punção venosa.

O saco estéril de recolha pode levar até 150 ml de sangue ou tecido do cordão umbilical e é armazenado num recipiente de forma segura para entrega. A sobrevivência das células depende do tempo e este sistema garante que condições como temperatura, pH, níveis de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>, entre outros, não afetem a amostra, sendo o transporte feito mediante condições controladas e registadas. <sup>(19)</sup>

### **6.2.2. Processamento**

Nesta fase de separação e processamento do sangue ou tecido do cordão umbilical, os métodos são em parte automatizados.

Numa primeira fase, na chegada ao laboratório, faz-se uma desinfeção da superfície do saco de recolha e encaminha-se para a sala limpa, de condições completamente estéreis. Aqui, procede-se à sedimentação e centrifugação dos glóbulos vermelhos, do que resulta uma suspensão rica em células mononucleares, onde se encontram as células estaminais pretendidas para criopreservação. Este procedimento de redução de volume por separação das hemácias é essencial, uma vez que permite a racionalização do espaço de armazenamento, tendo em conta o maior volume que estas células ocupam. Outras vantagens são a redução da quantidade de substância crioprotetora utilizada e diminuição da citotoxicidade obtida por descongelamento dos glóbulos vermelhos.

Por norma, utilizam-se métodos múltiplos que garantem a manutenção da viabilidade celular, que é monitorizada através de testes de controlo de qualidade ao longo de todo o processo. <sup>(19)</sup>

### **6.2.3. Criopreservação**

O processo de criopreservação foi evoluindo ao longo do tempo, e tem por base o armazenamento das células estaminais em nitrogénio em fase líquida ou de vapor, mantendo a viabilidade celular ao longo de vários anos.

O sucesso do processo depende de vários fatores:

#### **o Concentração celular**

A concentração de agente crioprotetor necessário neste processo depende do número de células criopreservadas, e pode resultar em toxicidade celular. O espaço de armazenamento necessário e o trabalho de lavagem da amostra antes da reinfusão também são fatores que limitam a concentração de células criopreservadas. <sup>(20)</sup>

Para este processo são aceitáveis no mínimo  $2,5 \times 10^7$  células nucleadas totais por quilograma de peso corporal do paciente. Verifica-se, porém, que apenas 10% das amostras atualmente preservadas contêm células suficientes para a transplantação num adulto. <sup>(19)</sup> Neste sentido, e para crianças maiores e adultos, transplantes do sangue do cordão umbilical duplos, que utilizam unidades de sangue do cordão umbilical de dois doadores, atenuam as limitações da dose celular, <sup>(21)</sup> e podem ter vantagens em doenças como leucemia aguda. <sup>(22)</sup>

○ **Agentes crioprotetores**

A criopreservação de células é um processo delicado que pode levar a danos celulares devido a vários fatores: mudança de fase da água a baixa temperatura, tanto a nível intra como extracelular; velocidade do procedimento que pode afetar as reações físico-químicas e biofísicas, ou ruptura osmótica causada por solutos concentrados.

De modo a minimizar estes efeitos, adiciona-se à suspensão celular uma substância crioprotetora, imediatamente antes do congelamento. Estas substâncias podem ser de dois tipos: permeáveis à membrana celular, como o DMSO ou o glicerol, ou não permeáveis como o 2-metil-2,4-pentanodiol ou polivinilpirrolidona.

Pelo seu baixo custo e toxicidade, o DMSO, solvente aprótico e polar, é dos mais comumente utilizados. Atua por redução da concentração eletrolítica da solução residual dentro da célula e ao seu redor, a qualquer temperatura. Como efeitos negativos são referidos o decréscimo da taxa de sobrevivência e a indução da diferenciação celular por metilação do DNA.

Atualmente, novas séries de substâncias estão a ser utilizadas com sucesso, conseguindo-se elevadas taxas de sobrevivência após congelamento e descongelamento. São misturas de várias substâncias como 10% de DMSO, glicose, um polímero e reguladores de pH. A concentração das substâncias crioprotetoras utilizadas deve ser otimizada de modo a conseguir a melhor taxa de sobrevivência celular possível. <sup>(19,23)</sup>

Estudos recentes de Martinetti et al <sup>(24)</sup> mostram a vantagem do uso da trealose, açúcar utilizado como crioprotetor, relativamente ao uso padrão de DMSO. Demonstrou-se, neste estudo, que a trealose 1M resultou numa crioproteção melhorada para CD34+, mantendo a viabilidade destas células e a sua capacidade de diferenciação após descongelamento.

○ **Temperatura**

Para o congelamento de células isoladas do cordão umbilical as temperaturas padrão utilizadas são -196 a -80°C. Tendo em conta a propagação de agentes infecciosos através da fase líquida dos tanques de nitrogénio, as condições ótimas de armazenamento são o vapor de nitrogénio a -156°C. <sup>(20)</sup>

○ **Taxa de congelamento**

Este é também um fator muito importante e amplamente debatido na literatura.

Na congelação a taxa controlada, as células estaminais são congeladas a uma velocidade de 1-2°C por minuto até uma temperatura de cerca de -40°C. De seguida realiza-se um congelamento mais rápido até aos -120°C, a um ritmo de cerca de 3-5°C por minuto.

No congelamento a taxa não controlada ocorre um primeiro arrefecimento até -4°C, sendo depois a amostra colocada num congelador a -80°C ou em nitrogénio em fase líquida. <sup>(20)</sup>

O congelamento propriamente dito faz-se por dois métodos essenciais usando o DMSO: redução de glóbulos vermelhos ou redução plasmática, ou pelos métodos de congelamento lento ou vitrificação.

Qualquer que seja o método utilizado, ocorre avaliação da viabilidade das células congeladas cerca de 72 horas após o congelamento. <sup>(20)</sup>

#### **6.2.3.1. Método de congelamento com DMSO por redução de glóbulos vermelhos**

Neste método o sangue do cordão é centrifugado com o objetivo de se obterem 21 ml de sangue contendo essencialmente glóbulos brancos, ao qual se adicionam 4 ml de DMSO a 50%. A suspensão celular obtida é congelada. <sup>(19)</sup>

#### **6.2.3.2. Método de congelamento com DMSO por redução plasmática**

Este procedimento inclui a remoção de todo o plasma da suspensão celular, e todas as células são congeladas em DMSO a 10%.

O processamento celular neste método é mais económico, ao contrário do armazenamento e do processo de descongelamento que é também mais complexo.

Em termos de rendimento, tendo em conta boas condições de descongelamento e lavagem das células, com este método conseguem-se obter tantas ou mais unidades formadoras de colónias, células nucleadas totais ou CD34+, e taxas mais elevadas de enxerto de células, o que leva a maior eficácia no tratamento de algumas doenças, como a  $\beta$ -talassemia. <sup>(19)</sup>

#### **6.2.3.3. Método de congelamento lento**

Este método baseia-se num plano de arrefecimento lento que leva a um efluxo rápido de água intracelular, evitando assim a formação de cristais de gelo, que levaria à destruição das células. O sucesso depende do tipo celular, uma vez que as células têm capacidades distintas de movimentar a água através da membrana plasmática.

O primeiro passo consiste na inclusão do agente crioprotetor que vai substituir a água do citoplasma que sofreu efluxo, com o objetivo de reduzir o dano celular e de ajustar a taxa de arrefecimento de acordo com a permeabilidade da membrana celular. A taxa de arrefecimento típica para este tipo de protocolo é de 1°C por minuto na presença de uma concentração inferior a 1,0M de crioprotetor, com o uso de um aparelho congelador de alto custo, com controlo da taxa de arrefecimento.

As vantagens deste método são o baixo risco de contaminação durante os processos e a não exigência de grandes técnicas de manipulação. No entanto, a possibilidade de formação de gelo extracelular pode diminuir o sucesso da técnica. <sup>(23,25)</sup>

#### 6.2.3.4. Método de vitrificação

Este procedimento é uma alternativa ao método de congelamento lento, sendo um processo no qual as suspensões celulares passam diretamente do estado aquoso para um estado vítreo, pela exposição ao nitrogénio líquido.

As células são expostas a altas concentrações de crioprotetor, numa proporção de 40 a 60% de peso/volume, com posterior arrefecimento rápido com nitrogénio. O sucesso deste processo depende do equilíbrio entre três fatores fundamentais: viscosidade da amostra, taxa de arrefecimento e aquecimento e volume da amostra.

Existem dois tipos de vitrificação: de equilíbrio, que envolve misturas de substâncias crioprotetoras e sua inclusão na suspensão celular, e a de não equilíbrio que usa taxas de congelamento extremamente altas, mas com menores concentrações da mistura de agentes crioprotetores.

A grande vantagem deste método é a elevada taxa de sobrevivência celular, devido ao baixo risco de danos ocorridos no processo de congelamento. Porém, existe maior risco de contaminação com agentes patogénicos e é uma técnica mais complexa a nível de manipulação. <sup>(23,25)</sup>

Na tabela 2 estão resumidas as características que diferenciam os métodos de congelamento lento e de vitrificação.

**Tabela 2. Comparação dos métodos de congelamento lento e vitrificação. (Adaptado de 23)**

CARACTERÍSTICAS	MÉTODO	
	CONGELAMENTO LENTO	VITRIFICAÇÃO
TEMPO NECESSÁRIO	Mais de 3h	Rápido, menos de 10 min
CUSTO	Elevado, necessário congelador	Baixo, sem necessidade de maquinaria especial
VOLUME DA AMOSTRA (µL)	100-250	1-2
CONCENTRAÇÃO DE CRIOPROTETOR	Baixa	Elevada
RISCO DE DANOS, INCLUINDO FORMAÇÃO DE CRISTAIS DE GELO	Elevada	Baixa
VIABILIDADE PÓS-DESCONGELAMENTO	Elevada	Elevada
RISCO DE TOXICIDADE DO CRIOPROTETOR	Baixa	Elevada
TIPO DE SISTEMA	Sistema fechado	Sistema aberto ou fechado
POTENCIAL CONTAMINAÇÃO COM AGENTES PATOGÉNICOS	Baixo	Elevado
MANIPULAÇÃO	Fácil	Difícil

#### 6.2.4. Descongelamento e lavagem

As células congeladas são rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C, suavemente agitadas e removidas quando os cristais de gelo se dissolvem.

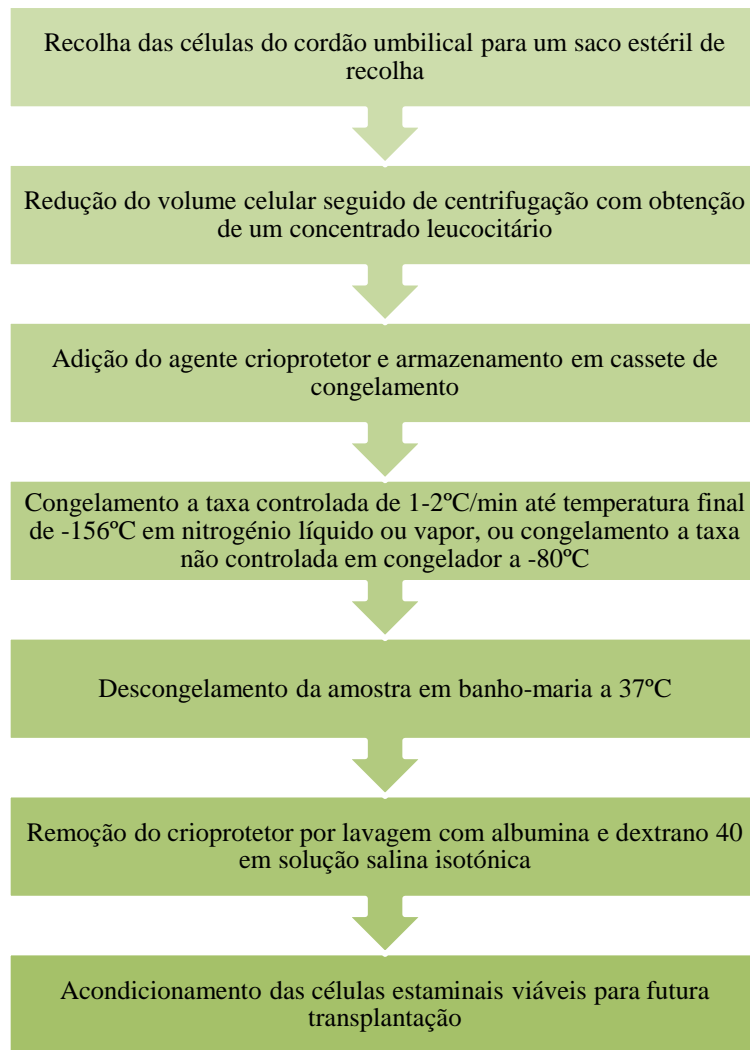
Posteriormente, avalia-se a viabilidade celular e a capacidade de diferenciação das células descongeladas. Um dos testes utilizados para esse fim é o teste de exclusão do azul de tripano. A percentagem de células viáveis após descongelamento é normalizada para células não criopreservadas, usando a seguinte equação: viabilidade celular (%) = número de células recuperadas após descongelamento × 100 / número de células não criopreservadas. <sup>(24)</sup>

Tendo em conta a toxicidade do DMSO em concentrações superiores a 1%, se em contacto com as células sanguíneas, por mais de 30 minutos, a 37°C, este deve ser removido logo após o descongelamento, de modo a evitar efeitos nefastos aos pacientes transplantados. <sup>(19)</sup>

Atualmente existem dispositivos automatizados de lavagem celular, no entanto, o protocolo de lavagem padrão é manual e segue o protocolo do New York Blood Center. Consiste na diluição, em duas fases, das células descongeladas com 2,5% de albumina de soro humano e 5% de dextrano 40, seguida de centrifugação durante 10 minutos a 10°C. Remove-se o sobrenadante e adiciona-se novamente a solução de albumina e dextrano, até uma concentração final de DMSO inferior a 1,7%.

Após este processo, faz-se o acondicionamento da unidade dadora antes do transplante, em recipientes apropriados para evitar contaminação, sendo importante a deteção de contaminação microbiológica antes da infusão. <sup>(20)</sup>

Na figura 6 estão representadas as fases principais de todo o processo de criopreservação celular.



**Figura 6. Esquema das etapas básicas de processamento e criopreservação das células do cordão umbilical. (Adaptado de 20)**

## 7. Bancos de criopreservação

Existe, atualmente, uma grande variedade de bancos para preservação de células estaminais. Esta prática teve início em hospitais ou instituições sem fins lucrativos, que processavam estas amostras e as forneciam quando necessário. Posteriormente, foram surgindo empresas privadas com o objetivo de armazenar células estaminais exclusivas dos seus clientes, para seu uso próprio ou familiar. <sup>(19)</sup>

### 7.1. Em Portugal

#### 7.1.1. Bancos privados

Presentemente existem em Portugal oito empresas privadas que recolhem e armazenam células estaminais do cordão umbilical: BebéCord, Bebevida, Bioteca (grupo CryoSave), Criobaby, Crioestaminal, Criovida, Cytothera e FutureHealthBiobank. Algumas recorrem a laboratórios estrangeiros ou de outras empresas para o processamento das amostras (BebéCord, Criobaby e FutureHealthBiobank).

Existe também o Instituto Valenciano de Infertilidade, com laboratório sediado em Lisboa, com amostras recolhidas em Espanha, cujo mercado não é exclusivo, pelo que as amostras poderão ser para uso universal. <sup>(26)</sup>

A Crioestaminal foi pioneira no país e na Península Ibérica, iniciando atividade em 2003, e conta com mais de 100 000 amostras de células estaminais criopreservadas. Em Março do corrente ano adquiriu a Cytothera, pertencente ao grupo farmacêutico Medinfar, alargando assim o seu grupo de investigação e desenvolvimento. <sup>(5)</sup>

Antes de 2009, não havia legislação que regulasse o funcionamento dos bancos privados em Portugal, sendo que muitos abriram atividade previamente a esse ano. Agora, com a legislação europeia já transposta para o nosso país, todos os bancos devem cumprir os requisitos da Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação.

A Lei nº 12, de 26 de março de 2009 <sup>(27)</sup>, estabelece o “regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana”, e a entidade responsável que regula e autoriza este setor atualmente é a Direção Geral de Saúde. <sup>(28)</sup>

#### 7.1.1. Banco público

Os bancos públicos estão sujeitos a regulamentações nacionais e podem ser credenciados para integrar redes internacionais. <sup>(29)</sup>

A Lusocord é o primeiro banco público português de células estaminais do cordão umbilical que funciona, desde 2009, nas instalações do Centro de

Histocompatibilidade do Norte <sup>(30)</sup>. Passou por um processo de reestruturação, que evitou o fim da sua atividade, integrando desde 2012 o Instituto Português do Sangue e Transplantação (IPST), e hoje conta com cerca de 460 amostras criopreservadas, disponíveis para transplante. Está prevista a certificação internacional, que permite a sua ligação à rede de bancos de criopreservação de todo o mundo. <sup>(31)</sup>

Os serviços de recolha e criopreservação são gratuitos, e as amostras ficam à disposição de todos os cidadãos. <sup>(30)</sup>

Caso a amostra não reúna os requisitos necessários para uso em transplantação, poderá ser usada em investigação científica ou controlo de qualidade. <sup>(32)</sup>

As vantagens de um banco público em relação aos privados são a disponibilidade imediata das amostras para utilização em transplantes, num grande número de doentes a nível mundial, e o facto de ser um procedimento gratuito, pois todas as despesas são suportadas pelo Ministério da Saúde. Em certas doenças, como leucemias e linfomas, não é recomendado o transplante autólogo, pois o defeito genético que provoca a patologia poderá estar presente nas células do sangue do cordão umbilical. Por este motivo, os transplantes realizados a partir de dadores não aparentados são preferíveis, e esta é outra vantagem de doação de amostras a um banco público. <sup>(32)</sup> A existência de bancos públicos nacionais permite também armazenar amostras de características genéticas representativas da população que pretendem cobrir. <sup>(33)</sup>

Por outro lado, o dador perde direitos sobre a amostra doada, que fica disponível para transplante em qualquer país que a solicite, que esteja inscrito nos registos internacionais da EuroCord. <sup>(32)</sup> Sediada em Paris, a Eurocord é uma organização sem fins lucrativos que estuda o transplante do sangue do cordão umbilical, terapias inovadoras e novas aplicações das células estaminais. Colabora com bancos de todo o mundo e o objetivo primário é ter os registos dos pacientes que receberam transplantes e analisar os resultados obtidos. <sup>(34)</sup>

Em resumo, os bancos públicos mostram vantagens pela utilização alogénica das amostras criopreservadas, não têm fins lucrativos, são de financiamento público e têm como base a solidariedade e o acesso igual para todos. Estes motivos, juntamente com a ligação em rede a outros bancos, também a nível internacional, aumenta a probabilidade de continuidade deste tipo de projeto. Por sua vez, os bancos privados apenas admitem utilização autóloga das amostras criopreservadas, são de financiamento privado, com fins lucrativos, o acesso à informação é desigual e competitiva, a qualidade é variável e por vezes desconhecida, ao contrário dos bancos públicos que são regulados por padrões internacionais de qualidade. <sup>(19,29,33)</sup>

## 7.2. Na Europa e no mundo

O primeiro banco público credenciado surgiu nos Estados Unidos, em 1992, no New York Blood Center. <sup>(35)</sup> Seguiram-se Paris, Milão, Dusseldorf, entre outras cidades.

Os bancos privados expandem-se rapidamente por todo o mundo, embora sejam proibidos nalguns países, como Itália. Em Espanha são permitidos bancos privados, mas as amostras ficam disponíveis para uso em banco público.

Para alguns países, de acordo com pareceres emitidos pelos respetivos comités nacionais de bioética, como França, Chipre, Itália ou Irlanda, o armazenamento privado de células estaminais do cordão umbilical, para uso autólogo, é inútil e prejudicial ao sistema público de doações. A recomendação do Conselho da Europa é de que “se forem estabelecidos bancos de sangue do cordão, estes devem ser baseados na doação altruísta e voluntária do sangue do cordão e usados para transplantes alogénicos e investigação relacionada”.<sup>(29,33)</sup>

Um outro modelo de banco de armazenamento de células do cordão umbilical é o banco familiar. Ocorre o armazenamento direcionado para famílias com grau de parentesco, para as quais pode ser clinicamente apropriado um transplante de células compatíveis. São poucos os países que admitem este conceito, que acaba por ser um prolongamento dos bancos privados. Estes países estabelecem listas oficiais de indicações para as quais o transplante de células estaminais hematopoiéticas provou ser efetivo e para o qual a colheita direcionada é apropriada.

Os transplantes que resultam deste modelo de bancos direcionados para familiares relacionados podem ter algumas vantagens, relativamente aos transplantes alogénicos, como a diminuição da doença do enxerto contra o hospedeiro, maior probabilidade de sobrevivência e a oportunidade de recolha de células da medula óssea do mesmo dador, em caso de recaída ou rejeição. Por estes motivos, será de esperar um aumento deste tipo de bancos familiares.<sup>(29)</sup>

Os bancos híbridos são outro modelo existente, como o Virgin Bank, no Reino Unido, e o StemCyte, nos Estados Unidos, Taiwan e Índia. Nestes sistemas, uma percentagem da amostra é armazenada para uso privado (direcionado para uso familiar), e outra parte para a rede pública.

Alguns modelos de bancos híbridos permitem aos pais doarem amostras para bancos públicos, mas mantêm direitos de propriedade durante um determinado período de tempo, que cubra eventuais necessidades da criança. Este modelo gera alguma controvérsia devido a preocupações éticas, científicas, económicas e sociais.<sup>(19,29)</sup>

## 8. Questões éticas

As questões éticas relacionadas com o armazenamento e utilização das células do sangue do cordão umbilical, nem sempre foram abordadas pelos comités e comissões nacionais de bioética. O primeiro a abordar este assunto foi o comité francês, Comité de Consulta Nacional de Ética para as Ciências da Vida e da Saúde. Um dos principais riscos referenciados, foi a implementação de bancos de células do sangue do cordão umbilical para uso exclusivamente autólogo, que contraria os princípios de igualdade e de solidariedade, sobre os quais uma sociedade se deve reger.<sup>(36)</sup>

As principais questões morais e deontológicas relacionadas com as células estaminais humanas dizem respeito à sua origem e uso em investigação.<sup>(37)</sup>

Elas podem obter-se não só a partir do sangue do cordão umbilical, de tecidos adultos e de produtos derivados de aborto, mas também de embriões excedentes que não foram implantados no útero em processos de fertilização artificial, embriões gerados especificamente para investigação, embriões em estado precoce de desenvolvimento, sem que se prejudique a sua evolução natural, ou a partir de processos de clonagem somática ou reprodutiva.<sup>(38)</sup>

Em relação às células estaminais do cordão umbilical, as principais questões legais e regulamentares que se colocam incluem vários critérios: consentimento informado, propriedade, indicações médicas, reivindicações relacionadas a benefícios médicos, uso alogénico *versus* uso autólogo, estruturas legais, bancos públicos *versus* bancos privados, sistemas de financiamento, acesso e organização, garantia de qualidade, rastreabilidade, custos relativos, publicidade, comercialização e patentes, proteção de dados pessoais, privacidade e confidencialidade e a relação entre doentes, médicos e bancos de criopreservação.<sup>(19,36)</sup>

No que diz respeito ao consentimento informado, para o armazenamento das células do sangue do cordão umbilical, uma das questões que se levanta é a propriedade. Algumas opiniões defendem que as células obtidas do sangue do cordão umbilical são propriedade da criança, outras que é propriedade da mãe.

Vários pareceres são proferidos neste sentido, não havendo unanimidade entre os meios filosófico, jurista, ético e científico sobre o estatuto do feto, no entanto, uma criança que está fora do corpo da mãe é reconhecida como pessoa jurídica, por todas as leis nacionais. Torna-se, assim, problemático o princípio de autonomia, tendo em conta que esta criança não tem capacidades de entendimento nem de fornecimento de consentimento informado.

Quem tem, então, o direito de consentimento? A mãe é obrigada a dar a sua aprovação, mas, admitindo que o sangue do cordão umbilical pertence ao bebé, é necessário considerar que a mãe aceita em nome deste, e não em seu próprio nome. O envolvimento do pai neste processo é também recomendável.

Por outro lado, em relação ao conteúdo do consentimento, é relevante que este inclua não só a colheita e armazenamento do sangue, mas também as suas possíveis utilizações.

É unânime que o consentimento informado deve ser obtido antes do momento do parto, e após a divulgação adequada da informação.

A relação dos médicos com os bancos públicos e privados do sangue do cordão umbilical deve ser divulgada durante o processo de consentimento informado. Não devem ser aceites incentivos financeiros, ou outros, para fornecer amostras aos bancos de criopreservação das células.<sup>(36)</sup>

O consentimento informado está também relacionado com o problema da proteção de dados pessoais.<sup>(36)</sup> A investigação em células estaminais embrionárias deve respeitar todos os procedimentos e supervisão de uma comissão de ética. Deve ser solidamente regulamentada, para que a progressão científica evolua paralelamente a

requisitos éticos rigorosos, conciliando a importância da investigação com o respeito pela vida humana. <sup>(38,39)</sup>

Em Portugal, este papel cabe ao Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida, estabelecido pela Lei 14/90, de 9 de Junho, da Assembleia da República, cuja missão é “acompanhar sistematicamente a evolução dos problemas éticos suscitados pelos progressos científicos nos domínios da biologia, da medicina ou da saúde em geral e das ciências da vida”. <sup>(40)</sup>

Segundo o relatório sobre investigação em células estaminais do Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida <sup>(38)</sup>, “a utilização de células estaminais de sangue do cordão umbilical para investigação tendo em vista o tratamento de casos de doença, não recolhe objeção quando se não verificam interesses, designadamente comerciais, que desviem os fins próprios da investigação e dos mesmos haja pleno esclarecimento e consentimento por parte dos progenitores do recém-nascido”.

## 9. Aplicações terapêuticas

Em 1989, Broxmeyer et al, demonstraram pela primeira vez que o cordão umbilical é uma fonte relevante de células hematopoiéticas transplantáveis. O primeiro transplante realizado com estas células, ocorreu no mesmo ano, numa criança com anemia de Fanconi. O dador foi um irmão com um sistema de antígenos leucocitários humano idêntico. <sup>(19)</sup> Após 12 meses, verificou-se que não havia sinais da doença, sendo que 98% do sistema linfático do doente tinha origem nas células dadoras.

Seguiram-se estudos que mostram a efetividade do uso destas células em doenças não hematológicas e em terapia celular regenerativa ou modulação imune. <sup>(19)</sup>

### 9.1. Aplicações atuais

#### 9.1.1 Tratamento de doenças isquémicas

Em Portugal, a Crioestaminal é a única empresa com quatro patentes registadas para tratamentos com células estaminais. Dizem respeito à formulação de um gel de fibrina, com células estaminais derivadas do sangue do cordão umbilical, para tratamento de feridas diabéticas, ou recuperação cardíaca após enfarte do miocárdio.

Pretende-se que as células estaminais, combinadas com células endoteliais delas derivadas, ou com ácido lisofosfatídico, sejam capazes de promover a regeneração e revascularização das áreas afetadas.

Nos próximos anos, serão postos em prática ensaios clínicos que irão sustentar o propósito destas patentes. <sup>(41)</sup>

### **9.1.2. Anemia Aplástica Severa e Síndrome Mielodisplásica Hipoplásica**

Em 2016, a Parent's Guide to Cord Foundation realizou, com sucesso, o 12º transplante autólogo com células derivadas do cordão umbilical, a uma criança com Anemia Aplástica. Devido à inexistência de dador de medula óssea compatível, optou-se pela utilização das células autólogas criopreservadas, num banco privado.

O transplante foi realizado com sucesso, e após 3 semanas verificou-se o restabelecimento da produção de células sanguíneas, com progressão favorável do quadro clínico. <sup>(42)</sup>

Recentemente, a 21 de Agosto deste ano, a Gamida Cell, líder mundial em terapias celulares e imunes para o tratamento de cancro e doenças órfãs genéticas, anunciou o seu primeiro transplante de uma amostra criopreservada, derivada de sangue do cordão umbilical não relacionado. O CordIn, produzido nesta empresa israelita, resulta de processos de expansão celular de células do cordão umbilical, por metodologias próprias, sendo posteriormente criopreservado. Terá benefícios em doentes com anemia aplástica severa (AAS) ou Síndrome mielodisplásico hipoplástico (SMD), distúrbios graves da medula óssea, que não possuam dador compatível disponível.

Mais estudos estão a ser desenvolvidos com este produto, nomeadamente estudos de fase 1/2 em pacientes com anemia falciforme. <sup>(43)</sup>

### **9.1.3. Doenças metabólicas**

#### **9.1.3.1. Doença de Krabbe**

Esta doença caracteriza-se pela deficiência da enzima galactocerebrosidase, ocorrendo falhas no processo de mielinização nos sistemas nervoso central e periférico, com consequente deterioração neurológica progressiva. O transplante de células estaminais hematopoiéticas mostrou benefícios em doentes em estádios iniciais da doença, com melhoria neurológica e aumento da sobrevivência global.

Um estudo de 2005 permitiu o diagnóstico e o tratamento precoce desta doença, num grupo de recém-nascidos, partindo de história familiar. Todos os neonatos sobreviveram e mostraram atividade enzimática normal. A mesma aplicação em bebés sintomáticos resultou em piores resultados neurológicos e de sobrevivência, o que dita a importância de avaliação precoce desta doença, com benefícios indiscutíveis no transplante antes do desenvolvimento dos sintomas. <sup>(44)</sup>

#### **9.1.3.2. Síndrome de Hurler**

Esta é uma doença causada por uma deficiência de  $\alpha$ -L-iduronidase, cujos sintomas começam por volta dos dois anos de idade. Ocorre deterioração grave e progressiva do sistema nervoso central, doença cardíaca, anormalidades esqueléticas, obstrução da córnea, hepatomegalia e morte na infância.

As células estaminais dadoras conseguiram repor os níveis enzimáticos, travando a progressão da doença, em 85% das crianças submetidas a transplante alogénico.<sup>(45)</sup>

#### 9.1.4. Leucemia mieloide

Estudos de 2002 mostraram remissão completa de leucemia mieloide numa doente jovem, após transplante alogénico de células estaminais mesenquimais e hematopoiéticas do progenitor.

Estudos posteriores usaram combinações de células estaminais mesenquimais e hematopoiéticas em doenças hematológicas malignas, mostrando ser um procedimento seguro, com redução dos efeitos adversos associados ao transplante, com recuperação da medula em todos os doentes estudados.<sup>(46)</sup>

Na tabela 4 estão resumidas as patologias onde podem ser utilizadas atualmente as células estaminais do cordão umbilical. Em certas doenças, como algumas deficiências medulares e tumores sólidos, são utilizadas células em transplantes autólogos. É o indicado para patologias adquiridas ao longo da vida, e não doenças existentes à nascença. Nas restantes, são utilizadas células estaminais em transplantes alogénicos, de familiares ou dadores não relacionados, metodologia indicada nas doenças de foro genético.

**Tabela 3. Doenças em cujo tratamento podem ser utilizadas células estaminais do sangue do cordão umbilical. (Adaptado de 47)**

<b>Doenças Oncológicas</b>	
Leucemia linfoblástica aguda	Anemia refratária
Leucemia mieloblástica aguda	Mielofibrose
Leucemia mieloide crónica	Mastocitose sistémica
Leucemia linfoide crónica	Síndrome linfoproliferativo autoimune
Leucemia mielomonocítica	Histiocitose familiar
Tumores sólidos (ex. neuroblastoma)	Histiocitose das células de langerhans
Linfoma de Hodgkin	Linfocitose hemofagocítica
Linfoma não-Hodgkin	Granulomatose linfomatosa
<b>Hemoglobinopatias</b>	
$\beta$ -talassémia major	$\alpha$ -talassémia major

$\beta$ -talassémia intermédia	Anemia falciforme
$\alpha$ -talassémia intermédia	
<b>Doenças Metabólicas</b>	
Adrenoleucodistrofia	Síndrome de Sandhoff
Doença de Gunther	Doença de Tay Sachs
Doença de Gaucher	Doença de Krabbe
Síndrome de Hunter	Leucodistrofia metacromática
Síndrome de Hurler	Gm1 gangliosidase
Síndrome de Hurler-Scheie	Doença de Wolman
Síndrome de Maroteaux-Lamy	Aspartilglucosaminúria
Síndrome de Sanfilippo	Síndrome de Morquio
Síndrome de Hermansky-Pudlak	Síndrome de Lesch-Nyhan
Mucopolidose tipo II, III	$\alpha$ -manosidose
Doença de Austin	Fucosidose
<b>Imunodeficiências</b>	
Síndrome de Omenn	Doença granulomatosa crónica
SCID com deficiência de adenosina Deaminase (ADA-SCID)	Síndrome linfoproliferativo ligado ao cromossoma X
SCID ligada ao cromossoma X	Deficiência IKK gama
Síndrome de ataxia-telangiectasia	Hipogamaglobulinemia
Síndrome de DiGeorge	Síndrome de Griscelli
Síndrome de Wiskott Aldrich	Síndrome de Nezelof
Agamaglobulinemia ligada ao cromossoma X	
<b>Deficiências medulares</b>	
Anemia aplástica	Hemoglobinúria paroxística noturna
Anemia aplástica adquirida	Doença de Glanzmann
Anemia de Fanconi	Trombocitopénia amegacariocítica
Anemia diseritropoiética congénita	Síndrome de Tar

Anemia de Blackfan-Diamond	Trombocitopénia neonatal severa
Anemia sideroblástica congénita	Dermatomiosite juvenil
Anemia hipolinfoproliferativa	Xantogranuloma juvenil
Aplasia eritróide pura	Pancitopenia
Neutropenia cíclica	Síndrome de Kostmanns
Neutropenia autoimune	Síndrome de Shwachman-Diamond
Síndrome de Evans	Síndrome de Pearson
<b>Outras</b>	
Osteopetrose	

## 9.2. Aplicações em estudo

O cordão umbilical é uma fonte única de células estaminais com múltiplas aplicações potenciais nos campos de medicina regenerativa e terapias celulares.

Muitos estudos estão a ser realizados nesta área, em animais e também humanos, que evidenciam resultados promissores em várias doenças, para as quais não existe ainda terapia eficaz. <sup>(48)</sup>

### 9.2.1. Doenças autoimunes

#### 9.2.1.1. Diabetes *Mellitus* tipo 1

A diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune causada por uma destruição das células  $\beta$  do ilhéu pancreático. A terapia passa, por isso, por ultrapassar a falta de células  $\beta$  produtoras de insulina, mas também pela interrupção da progressão da autoimunidade.

Estudos mostram que o tratamento com células T reguladoras autólogas CD4CD62L, derivadas de células estaminais do cordão umbilical, pode reverter a DM1 estabelecida. O sangue do cordão umbilical pode corrigir defeitos funcionais destas células T reguladoras, restaurando o seu potencial terapêutico para tratar a patologia.

Este tratamento não só eliminou a hiperglicemia e restaurou a arquitetura do ilhéu pancreático, através de um aumento acentuado da proliferação de células  $\beta$ , mas também diminuiu a autoimunidade através de alterações imunes sistémicas e regulação local nas ilhotas pancreáticas. <sup>(49)</sup>

Num estudo, de 2014, foram transplantadas células estaminais mesenquimais no pâncreas de ratos, de forma autóloga, aos quais foi induzida hiperglicemia. Os

resultados mostraram redução dos níveis glicêmicos, devido à recuperação de células  $\beta$  pancreáticas.<sup>(50)</sup> Este aumento de células  $\beta$  resultou de replicação, devido ao recrutamento de macrófagos pelas células estaminais transplantadas.

### **9.2.1.2. Diabetes *Mellitus* tipo 2**

A DM2 caracteriza-se pelo desenvolvimento de resistência à ação da insulina. São várias as complicações associadas, pelo que são fundamentais estratégias terapêuticas inovadoras que superem esta disfunção autoimune.

A utilização de células estaminais derivadas de sangue do cordão umbilical, num estudo de 2013, mostrou uma melhoria duradoura no controlo metabólico e redução de marcadores inflamatórios, em doentes diagnosticados com esta patologia. Provou-se ser possível, com esta terapia, controlar a disfunção imune e restaurar o equilíbrio imunológico, através da modulação de monócitos, macrófagos e outras células imunes, tanto no sangue periférico como nos tecidos, levando a uma reversão da resistência à insulina.<sup>(51)</sup>

### **9.2.1.3. Artrite reumatoide**

As terapias anti-inflamatórias existentes para a artrite reumatoide (AR), previnem ou atrasam a progressão da destruição articular e óssea, mas não regeneram os tecidos danificados. Neste sentido, foram feitos estudos com células estaminais mesenquimais que mostraram propriedades regenerativas.<sup>(12)</sup>

Um estudo de 2016, utilizou células estaminais mesenquimais, derivadas do sangue do cordão umbilical, em ratos aos quais foi induzida a doença. Verificou-se que as condições inflamatórias estimulam os efeitos imunossupressores destas células, e que estas respondem ao ambiente imunológico da doença.

O estudo concluiu que estas células mesenquimais podem atuar como moduladores celulares de macrófagos, atenuando a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e citocinas inflamatórias.

A administração sistêmica destas células mostrou ser uma alternativa terapêutica possível para a AR, com efeitos semelhantes ao Etanercept, um dos fármacos biológicos mais eficazes atualmente.<sup>(52)</sup>

## **9.2.2. Doenças neurológicas**

Sabe-se atualmente que as células estaminais podem originar neurónios, astrócitos e eventualmente oligodendrócitos, por manipulação genética. São, por isso, ferramentas endógenas úteis para possíveis tratamentos de patologias neurodegenerativas. É importante começar por alcançar meios de direcionar estas células de modo específico, percebendo quais os seus marcadores e caminhos de sinalização. Serão essenciais para a prevenção e recuperação de défices cognitivos,

associados não só ao processo de envelhecimento, mas também de doenças e lesões cerebrais.

Alterações na capacidade regenerativa de células estaminais adultas no hipocampo foram ligadas a várias doenças como epilepsia, déficit cognitivo relacionado à idade, depressão, doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington, entre outras. Isto indica que estas células endógenas podem ser manipuladas geneticamente ou farmacologicamente para promover a reparação cerebral.<sup>(53)</sup>

### **9.2.2.1. Doença de Alzheimer**

Evidências atuais mostram um papel importante da autofagocitose na doença de Alzheimer. Este processo tem um efeito neuroprotetor celular, por impedir a acumulação de substância  $\beta$ -amilóide, que é tóxica para os neurónios, levando a perda de comunicação nas sinapses.<sup>(54)</sup>

A utilização de células estaminais do cordão umbilical humano, por via intravenosa, em ratos, mostrou uma biodistribuição e retenção relativamente altas, tanto a nível cerebral, como em vários órgãos periféricos como fígado, rim e medula óssea.<sup>(55)</sup>

Outros estudos mostraram que estas células reduzem a neuropatologia associada à substância  $\beta$ -amilóide, em ratos. Análises ao tecido cerebral mostraram redução desta substância, tanto numa administração curta, de 2 meses, como numa a longo prazo, de 4 meses.

Foram utilizados monócitos derivados de células estaminais do cordão umbilical, por administração periférica, e os resultados mostraram melhores funções motoras, de aprendizagem e de memória.<sup>(56)</sup>

### **9.2.2.2. Encefalopatia hipóxico-isquémica moderada ou grave**

Esta patologia ocorre quando há hipoperfusão tecidual significativa e diminuição do aporte de oxigénio, de diversas etiologias. Resulta de lesões cerebrais ocorridas no útero ou no início da infância, tendo muitas vezes como causa um acidente vascular cerebral. Como consequência, mais de 30% dos bebés com esta patologia morrem ou ficam comprometidos em termos cognitivos e funcionais.<sup>(48,57)</sup>

Estudos mostraram resultados promissores em roedores, após injeção com células do cordão umbilical humanas não criopreservadas, melhorando as lesões resultantes de encefalopatia hipóxico-isquémica.<sup>(57)</sup>

### **9.2.2.3. Paralisia cerebral**

Após o momento do parto, e uma vez ocorrido dano cerebral, o transplante de células mononucleares derivadas de sangue do cordão umbilical humano, mostrou atenuar os efeitos consequentes de asfixia fetal ou perinatal. Este efeito foi resultado da incorporação das células em redor da lesão cerebral, após migração das mesmas para o

sistema nervoso central, com alívio dos efeitos neurológicos da paralisia cerebral, avaliado pela compensação funcional parcial observada. <sup>(58)</sup>

#### **9.2.2.4. Autismo**

O autismo é uma doença invasiva do desenvolvimento neurológico, que leva a desregulação imune e neural. A sua etiologia não está ainda definida e a terapia é essencialmente limitada a medidas comportamentais.

Estudos mostraram a segurança e eficácia da utilização de células mononucleares, de sangue de cordão umbilical humano, e células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical, no tratamento de crianças com autismo. Foi observado um aumento da perfusão cerebral e da regulação da disfunção imune. A sinergia destas células, administradas por infusão intravenosa e intratecal, levou a benefícios terapêuticos adicionais, com melhoria dos sintomas comportamentais e funcionais. <sup>(59)</sup>

#### **9.2.3. Doenças respiratórias**

##### **9.2.3.1. Lesão pulmonar aguda**

A lesão pulmonar aguda (LPA) é uma doença que leva à perda de integridade da membrana capilar alveolar, migração excessiva de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas e fator de necrose tumoral. As consequências são o desenvolvimento de síndrome de dificuldade respiratória aguda ou perda de algumas funções pulmonares. <sup>(60)</sup>

A enzima de conversão da angiotensina 2 (ECA2) previne lesões pulmonares, e estudos atuais sobre o seu uso terapêutico incluem o aumento da sua expressão. Num desses estudos, células estaminais mesenquimais do cordão umbilical (CEMCU), foram modificadas com a ECA2, por via de vetores lentivirais, e injetadas em ratos aos quais foi induzida LPA. Verificou-se uma redução dos níveis de radicais inflamatórios de oxigénio, e um efeito protetor sobre os tecidos pulmonares. O efeito sinérgico ECA2-CEMCU foi mais eficaz do que o uso isolado de ECA2 ou CEMCU. <sup>(61)</sup>

A administração intravenosa destas células estaminais permite a sua retenção a nível do pulmão, ou noutros órgãos com lesão hipóxico-isquémica, como fígado, rim ou coração <sup>(49)</sup>.

Outro estudo investigou o potencial terapêutico de células estaminais CD34+, isoladas de sangue do cordão umbilical humano, em ratos com LPA induzida. Os resultados mostram inibição da lesão vascular pulmonar, e a promoção da proliferação de células endoteliais que levam à recuperação da integridade vascular.

Mostrou-se, neste estudo, que o sangue do cordão umbilical humano são uma fonte importante de células estaminais CD34+, importantes para a prevenção e possível

tratamento da LPA, com a vantagem de serem células de fácil obtenção, sem defeitos de cultura *in vitro*, rápida expansão celular e baixa imunogenicidade. <sup>(62)</sup>

### **9.2.3.2. Asma**

Um estudo de 2017, mostrou que a administração de células estaminais mesenquimais, derivadas do sangue do cordão umbilical, inibiu os sintomas da asma, nomeadamente a reatividade exacerbada das vias aéreas e a acumulação de eosinófilos.

Ocorreu, também, uma diminuição significativa nos níveis séricos de IgE e IgG, juntamente com a produção de citocinas nos tecidos do pulmão e do baço, e um aumento de células T reguladoras. <sup>(63)</sup>

### **9.2.3.3. Displasia broncopulmonar**

Trata-se de um transtorno pulmonar crónico que afeta essencialmente bebés prematuros, com doença pulmonar grave ao nascer.

Estudos mostram que o transplante de células estaminais mesenquimais em animais imunocompetentes atenua a lesão pulmonar, melhorando sintomas como lesão alveolar, resposta inflamatória, apoptose aumentada e fibrose.

Num estudo, de 2014, realizou-se um transplante intratraqueal de células estaminais mesenquimais, derivadas de sangue do cordão umbilical, em recém-nascidos prematuros, indicando ser um método seguro. Houve melhorias no índice respiratório médio, na duração de intubação e na taxa de uso de esteroides pós-natais, pelo que a severidade da displasia broncopulmonar foi significativamente menor após transplante. <sup>(64)</sup>

## **9.2.4. Doenças hepáticas**

### **9.2.4.1. Cirrose hepática**

A cirrose hepática é uma doença progressiva, marcada pela destruição gradual do tecido hepático, como resultado de vários fatores como infeções virais, álcool, drogas ou outros químicos. Pode levar ao desaparecimento das funções do fígado.

As células mononucleares do sangue do cordão umbilical mostraram vantagens em terapia celular, em modelos de ratos com cirrose hepática. Num estudo realizado, os resultados mostraram melhoria significativa da histopatologia do tecido hepático dos ratos tratados, com diminuição da necrose hepatocelular e infiltração inflamatória.

A regeneração dos hepatócitos levou ao aumento de expressão de APE1/Ref-1, uma proteína importante na regulação do stress oxidativo, a nível das células, cuja inibição poderá estar envolvida na lesão hepática. Este estudo, de 2011, foi o primeiro a demonstrar o efeito protetor hepático desta proteína, cuja expressão aumentada previne a progressão da doença cirrótica. <sup>(65)</sup>

## **9.2.5. Doenças inflamatórias intestinais**

### **9.2.5.1. Colite ulcerosa e Doença de Crohn**

O fator de crescimento TGF- $\beta$  tem um papel importante na progressão e recuperação das doenças inflamatórias intestinais. Estudos mostram a vantagem da utilização de células estaminais mesenquimais, pelo aumento de produção deste fator pelos macrófagos, levando à reparação dos tecidos. <sup>(66)</sup>

Uma diminuição da função da proteína NOD2 está também associada à doença de Crohn. Esta proteína regula a inflamação intestinal, e a sua mutação ou ausência pode ser um fator determinante no desenvolvimento de colite.

Um estudo, com células estaminais do cordão umbilical, às quais foi induzida a expressão desta proteína, aumentou a resposta anti-inflamatória no colon de ratos, reduzindo a produção de citocinas inflamatórias, e aumentou a infiltração de células T reguladoras. <sup>(67)</sup>

## **9.2.6. Doenças cardiovasculares**

Na isquemia do miocárdio importa recuperar a função cardíaca, pela promoção da neovascularização e reparação do tecido lesado. A primeira via referida tem em conta a produção e secreção do fator de crescimento placentário PLGF. Os estudos realizados apresentam algumas limitações, nomeadamente a nível da diferenciação de células musculares cardíacas pelas células estaminais mesenquimais, mas os resultados mostram ocorrência de neovascularização num coração isquémico. <sup>(68)</sup>

Novos modelos de investigação devem ser criados para colmatar estas limitações.

### **9.2.6.1. Enfarte do miocárdio**

No enfarte do miocárdio (EM) ocorre perda de cardiomiócitos que leva a uma disfunção contrátil do coração. <sup>(46)</sup>

Nesta condição, gera-se um ambiente pobre em oxigénio e nutrientes, que é uma limitação à utilização de terapia celular, nomeadamente com células estaminais do cordão umbilical. É, portanto, necessário recorrer a fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), que promove a angiogénese e previne a apoptose das células endoteliais.

Num estudo, de 2017, foi induzida a expressão de FCEV em células estaminais derivadas do cordão umbilical, e fez-se o transplante destas células por via subcutânea, em ratos com esta patologia. Os resultados foram o aumento significativo da angiogénese na área afetada, diminuição da fibrose e do aumento da espessura muscular cardíaca. Estes fatores promovem a sobrevivência dos cardiomiócitos e a melhoria da função cardíaca geral.

Este estudo sugere, assim, que a utilização das células estaminais do cordão umbilical, por secreção de FCEV, é uma abordagem terapêutica efetiva para o tratamento do EM. <sup>(69)</sup>

#### **9.2.6.2. Estenose arterial**

Na estenose arterial ocorre uma oclusão do lúmen arterial de extensão variável, que muitas vezes requer um novo procedimento de revascularização. Estudos evidenciaram a contribuição importante de células estaminais, derivadas da medula óssea, na recuperação vascular após lesão. Nesta medida, podem evitar-se processos de reestenose, pela reparação precoce dos tecidos através de células estaminais. <sup>(46)</sup>

Pela similaridade entre as células da medula óssea e as células do cordão umbilical, poderá deduzir-se que estas conduzirão a resultados similares aos obtidos, neste estudo.

#### **9.2.7. Doenças hematológicas**

As células estaminais hematopoiéticas podem ser uma alternativa para o tratamento deste tipo de patologias, mas pode ocorrer rejeição, como a doença do enxerto contra o hospedeiro. Devido às propriedades imunossupressoras das células estaminais mesenquimais, estas poderão ser uma alternativa eficaz. As citocinas secretadas por estas células são também importantes para a hematopoiese, levando à recuperação da medula após tratamentos com quimio ou radioterapia. <sup>(46)</sup>

##### **9.2.7.1. Anemia aplásica severa**

Estudos numa paciente em fase terminal com esta patologia, resistente às terapias convencionais, mostraram melhorias após transplante com células estaminais mesenquimais, sem efeitos secundários registados. Os sintomas presentes antes do transplante, como ausência de tecido hematopoiético, hemorragia intersticial, edema ou necrose dos adipócitos, desapareceram, e observaram-se vantagens na utilização combinada de células estaminais mesenquimais e hematopoiéticas. <sup>(46)</sup>

Um estudo utilizou o efeito do transplante de células estaminais hematopoiéticas do sangue periférico, com células estaminais mesenquimais do sangue do cordão umbilical, no tratamento de anemia aplásica severa (AAS). Este transplante combinado, em 5 pacientes com a patologia, levou a reconstituição hematopoiética, mostrando ser uma possível abordagem terapêutica para a AAS. No entanto, mais estudos devem ser feitos, com amostras mais representativas. <sup>(70)</sup>

## **9.2.8. Neoplasias**

### **9.2.8.1. Recuperação após tratamentos antineoplásicos**

Uma outra área de aplicação de células estaminais mesenquimais diz respeito à recuperação de doentes com neoplasia, após tratamentos de quimioterapia. A 32 doentes com cancro de mama avançado ou metastático, a fazer altas doses de quimioterapia e transplante de células de sangue periférico, foram administradas, de forma autóloga e por via intravenosa, culturas de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea. Os resultados mostraram recuperação hematopoética imediata em 70%, evidenciando um benefício importante do uso destas células durante tratamentos com altas doses de quimioterapia. <sup>(46)</sup>

Devido à similaridade entre as células da medula óssea e as células do cordão umbilical, pode deduzir-se que estas conduzirão a resultados similares aos obtidos neste estudo, e que serão, por isso, uma mais-valia na recuperação após tratamentos antineoplásicos.

### **9.2.8.2. Glioblastoma**

Nesta forma de tumor maligno cerebral, a investigação mostrou que células estaminais mesenquimais podem migrar para a zona afetada, através de vetores lentivirais projetados por métodos de engenharia. Isto representa um grande avanço, no sentido em que estudos contíguos podem utilizar esta engenharia vetorial para conseguir resultados promissores na recuperação de tecidos afetados, e na morte de células tumorais residuais e invasivas. <sup>(71)</sup>

Um estudo investigou a utilização de células estaminais mesenquimais, derivadas do cordão umbilical, em modelos de ratos, aos quais foi induzido esta forma grave de tumor. Ocorreu inibição do crescimento do tumor, ocorrendo apoptose das células tumorais. Este processo ocorreu devido à expressão, pelas células estaminais, do ligando indutor de apoptose relacionado com TNF, proteína que funciona como um ligando que induz o processo apoptótico. <sup>(72)</sup>

## **9.2.9. Regeneração de feridas**

As células estaminais mesenquimais secretam várias moléculas bioativas, com capacidade imunossupressora, proporcionando um microambiente favorável à regeneração de vários tipos de feridas de tecidos adultos. Essas moléculas bioativas inibem a apoptose e estimulam a angiogénese e a mitose das células dos tecidos, capacidades conhecidas como trofismo celular.

A taxa de sucesso na regeneração dos tecidos danificados depende de fatores como a idade do indivíduo, extensão do dano tecidual e concentração de células estaminais mesenquimais. <sup>(73)</sup>

### 9.2.9.1. Feridas diabéticas

As feridas diabéticas, como a úlcera do pé diabético, pelas suas características complexas, requerem medidas terapêuticas efetivas, ainda inexistentes nos dias de hoje. As taxas de cura são baixas, levando frequentemente a amputação, o que resulta numa maior morbidade e dor para pacientes e familiares. Sendo uma doença cuja incidência aumenta todos os anos, torna-se iminente a procura de novas medidas que ajudem na cicatrização de feridas nestes doentes.

Vários fatores contribuem para a cicatrização difícil deste tipo de feridas: isquemia, hipoxia, resposta inflamatória anormal, elevada carga microbiana, neuropatia periférica, expressões anormais de fatores de crescimento endotelial e um excesso de produtos resultantes do metabolismo em condições diabéticas, que são os produtos finais da glicação avançada. Estudos mostram a importância destes produtos na modificação de células do tecido da pele, matriz extracelular e citocinas, e na promoção do atraso da cicatrização pela inibição da expressão de fibroblastos e colagénio. Assim, a aplicação de agentes inibitórios destes produtos pode levar ao tratamento de feridas diabéticas. <sup>(74)</sup>

A utilização de células estaminais mesenquimais do cordão umbilical, com potencial de diferenciação múltipla, mostrou progressos neste tipo de medicina regenerativa. <sup>(74)</sup> Estudos em diabéticos tipo 2 mostraram os efeitos positivos da utilização destas células estaminais, pela sua diferenciação em queratinócitos e pela expressão de fatores que levam à secreção de moléculas importantes para a reparação tecidual. <sup>(75)</sup>

Um outro processo benéfico demonstrado por estudos, na utilização de células estaminais mesenquimais em feridas diabéticas, foi a indução de autofagocitose celular, processo que permite remover proteínas ou aminoácidos anormais, tóxicos para a célula, promovendo dessa forma a reparação celular. <sup>(74)</sup> Embora possa levar à morte celular, a autofagocitose é um processo que contraria muitas vezes a apoptose e leva à sobrevivência celular em ambiente hostil. <sup>(60)</sup>

Nas feridas diabéticas, a expressão de fatores, como o HIF-1 $\alpha$ , é significativamente reduzida. Células estaminais mesenquimais da geleia de Wharton humana conseguiram levar à cicatrização de feridas em ratos, pelo aumento da expressão deste e de outros fatores, em fibroblastos de pele humana, diminuindo as bordas da ferida, e acelerando as taxas de re-epitelização e neovascularização, por um mecanismo de sinalização parácrina. <sup>(76)</sup>

## 10. Conclusões e perspectivas

O sangue do cordão umbilical contém vários tipos de células estaminais que são de grande interesse em várias áreas da medicina regenerativa. Com o decorrer da investigação nesta área, verifica-se um aumento do potencial de aplicação clínica das células estaminais do sangue do cordão umbilical.

São várias as vantagens da utilização destas células, como a ausência de risco para o dador, ausência de problemas éticos associados, baixo risco de doença do enxerto contra o hospedeiro e fácil e rápida disponibilidade. Uma vantagem adicional, é que a correspondência HLA não precisa ser tão próxima quanto a necessária para os transplantes da medula óssea.

As características únicas destas células, sustentadas pelos estudos decorridos, mostram capacidade de migração para locais de lesão tecidual e propriedades imunossupressoras importantes para transplantes alogénicos bem-sucedidos.

Mais estudos devem ser feitos, para averiguar da eficácia da terapêutica com células estaminais em humanos, pois muitos ensaios clínicos estão limitados à experiência animal. Esta limitação da transposição dos resultados deve-se, principalmente, à existência de marcadores únicos e exclusivos de espécie.

O uso de células estaminais em terapia não é isento de efeitos adversos potencialmente graves, e o que pode ser uma vantagem em terapia genética, pode também ser um problema, nomeadamente por serem utilizados potenciais vetores bacterianos e virais, podendo levar a infeções ou reações alérgicas graves e compromisso sério do sistema imunológico.

De salientar a importância da consolidação de bancos públicos, com fins altruístas, cuja ligação em rede permite um acesso global e rápido de amostras criopreservadas, segundo altos padrões de qualidade.

Acredita-se que as células estaminais do cordão umbilical venham a desempenhar um papel cada vez mais marcante na medicina do futuro, oferecendo uma nova esperança para doenças sem terapia eficaz nos dias de hoje.

## Referências bibliográficas

1. Bebevida. Células estaminais: como são classificadas. [Internet]. Lisboa: AppyLab; 2013 [cited 2017 Março 20]. Disponível em: <http://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/como-sao-classificadas>
2. BebéCord. Células estaminais. [Internet]. Lisboa: BebéCord; 2017 [cited 2017 Março 20]. Disponível em: <http://www.bebecord.pt/celulas-estaminais/>
3. International Society for Stem Cell Research. Stem Cell Facts. [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 20];[5 páginas]. Disponível em: <http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4>
4. National Institutes of Health. Stem Cell Information. [Internet]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services; 2016 [cited 2017 Mar 20]. Disponível em: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm>
5. Crioestaminal. Tudo sobre as células estaminais. [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2017 Mar 20]. Disponível em: <https://www.crioestaminal.pt/celulas-estaminais/>
6. Bioteca. O que são as células estaminais? [Internet]. Lisboa: Cryo-Save; 2014 [cited 2017 Mar 20]. Disponível em: <http://www.bioteca.pt/celulas-estaminais>
7. Correia L. Células estaminais pluripotentes induzidas no estudo de mecanismos de doença e avaliação de novas terapias [dissertação]. Coimbra: Universidade de Coimbra; 2013.
8. Criovida. O que são células estaminais? [Internet]. Maia: Criovida; 2017 [cited 2017 Mar 20]. Disponível em: <http://www.criovida.pt/celulas-estaminais/>
9. Cabeleira A, Vieira M, Matos T, Gomes A, Rivera D. O sangue do cordão umbilical em medicina regenerativa: uma revisão dos avanços científicos mais recentes. Acta Obstet Ginecol Port. [Internet]. 2010 [cited 2017 Ago 24];4(2):81-87. Disponível em: [http://www.fspog.com/fotos/editor2/2010-2\\_artigo\\_de\\_revisao\\_1.pdf](http://www.fspog.com/fotos/editor2/2010-2_artigo_de_revisao_1.pdf)
10. Mossahebi-Mohammadi M, Atashi A, Kaviani S, Soleimani M. Efficient Expansion of SALL4-Transduced Umbilical Cord Blood Derived CD133+Hematopoietic Stem Cells. Acta Med Iran. 2017 Mai;55(5):290-296. PubMed PMID: 28724268.
11. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. J Immunol Res. 2015;2015:394917. doi:10.1155/2015/394917. PubMed PMID: 25961059; PubMed Central PMCID: PMC4417567.
12. Lee WJ, Hah YS, Ock SA, Lee JH, Jeon RH, Park JS, et al. Cell source-dependent in vivo immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and synovial fluid of minipigs. Exp Cell Res. 2015 Mai 1;333(2):273-88. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.03.015.

13. Matsukura Y, Muneta T, Tsuji K, Koga H, Sekiya I. Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase After Meniscus Injury. *Clin Orthop Relat Res.* 2014 Mai;472(5):1357-1364. doi:10.1007/s11999-013-3418-4. PubMed PMID: 24338094; PubMed Central PMCID: PMC3971249.
14. Ghaniati F, Santourlidis S. Effect on Multipotency and Phenotypic Transition of Unrestricted Somatic Stem Cells from Human Umbilical Cord Blood after Treatment with Epigenetic Agents. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7643218. doi: 10.1155/2016/7643218. PubMed PMID: 26788071; PubMed Central PMCID: PMC4691642.
15. Mou Y, Yue Z, Zhang H, Shi X, Zhang M, Chang X, et al. High quality *in vitro* expansion of human endothelial progenitor cells of human umbilical vein origin. *Int J Med Sci.* 2017;14(3): 294-301. doi: 10.7150/ijms.18137. PubMed PMID: 28367090; PubMed Central PMCID: PMC5370292.
16. Soleimani M, Khorsandi L, Atashi A, Nejaddehbashi F. Chondrogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Blood-Derived Unrestricted Somatic Stem Cells on A 3D Beta-Tricalcium Phosphate-Alginate-Gelatin Scaffold. *Cell J.* 2014 Fev 3;16(1):43-52. PubMed PMID: 24518974.
17. Kassmer SH, Krause DS. Very small embryonic-like cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Mol Reprod Dev.* 2013 Ago;80(8):10.1002/mrd.22168. doi:10.1002/mrd.22168. PubMed PMID: 24018851; PubMed Central PMCID: PMC3740022.
18. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, et al. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia.* 2014 Mar;28(3):473-484. doi:10.1038/leu.2013.255. PubMed PMID: 24018851; PubMed Central PMCID: PMC3948156.
19. Roura S, Pujal JM, Gálvez-Montón CG, Bayes-Genis A. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1): 123. doi: 10.1186/s13287-015-0113-2. PubMed PMID: 26133757; PubMed Central PMCID: PMC4489204.
20. Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. *Am J Hematol.* 2007;82(6):463-472. doi: 10.1002/ajh.20707. PubMed PMID: 17266054; PubMed Central PMCID: PMC2075525.
21. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet.* 2011 Ago;28(8):669-676. doi:10.1007/s10815-011-9577-x. PubMed PMID: 21617932; PubMed Central PMCID: PMC3170109.
22. Verneris MR, Brunstein CG, Barker J, MacMillan ML, DeFor T, McKenna DH, et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood.* 2009 Nov 5;114(19):4293-4299.

- doi:10.1182/blood-2009-05-220525. PubMed PMID: 19706886; PubMed Central PMCID: PMC2774557.
23. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res.* 2017 Mar;6(1):12-18. doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001. PubMed PMID: 28462139; PubMed Central PMCID: PMC5395684.
24. Martinetti D, Colarossi C, Buccheri S, Denti G, Memeo L, Vicari L. Effect of trehalose on cryopreservation of pure peripheral blood stem cells. *Biomed Rep.* 2017;6(3):314-318. doi: 10.3892/br.2017.859. PubMed PMID: 28451392; PubMed Central PMCID: PMC5403297.
25. Imaizumi K, Nishishita N, Muramatsu M, Yamamoto T, Takenaka C, Kawamata S, et al. A Simple and Highly Effective Method for Slow-Freezing Human Pluripotent Stem Cells Using Dimethyl Sulfoxide, Hydroxyethyl Starch and Ethylene Glycol. *PLoS One.* 2014 Feb;9(2):e88696. doi: 10.1371/journal.pone.0088696. PubMed PMID: 24533137; PubMed Central PMCID: PMC3922972.
26. Faria N. Seis bancos privados e três empresas comerciais com milhares de amostras criopreservadas. *Público [Internet].* 2016 Jul [cited 2017 Jul 27];7(18):[cerca de 1 p.]. Disponível em: <https://www.publico.pt/2016/07/03/sociedade/noticia/seis-bancos-privados-e-tres-empresas-comerciais-com-milhares-de-amostras-criopreservadas-1736841>
27. Regime jurídico da qualidade e segurança relativa ao tratamento de tecidos e células de origem humana, Lei nº 12 (Mar 26, 2009).
28. Cabo A. Banco de células estaminais: A falta de legislação foi “inadmissível”. *Boletim da Ordem dos Advogados [Internet].* 2012 Fev [cited 2017 Jul 20];(87):21-23. Disponível em: <http://www.oa.pt/upl/%7Be72e095f-6640-4531-889b-60121fa7b557%7D.PDF>
29. Petrini C. Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *J Blod Med.* 2014;5:87-97. doi: 10.2147/JBM.S64090. PubMed PMID: 24971040; PubMed Central PMCID: PMC4069132.
30. DGS. Parto: Colheita de Células estaminais do cordão umbilical [Internet]. Lisboa: Programa Nacional de Saúde Reprodutiva; 2016 [cited 2017 Jul 27]. Disponível em: <http://www.saudereprodutiva.dgs.pt/gestao-de-noticias/parto-colheita-de-celulas-estaminais-do-cordao-umbilical.aspx>
31. Maia A. Banco público pode avançar este ano para certificado internacional. *DN [Internet].* 2017 Mai [cited 2017 Jul 27];[cerca de 1 p.]. Disponível em: <http://www.dn.pt/portugal/interior/banco-publico-pode-avancar-este-ano-para-certificado-internacional-6259006.html>

32. Ministério da Saúde [Internet]. Porto: Centro de Histocompatibilidade do Norte: Lusotransplante; 2016 [cited 2017 Jul 27]. Disponível em: <http://www.chnorte.min-saude.pt/files/FA450008.pdf>
33. Sequeiros J, Neves MCP. Relatório sobre os bancos de sangue do cordão umbilical, tecido do cordão umbilical e placenta [dissertação]. Lisboa: Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida; 2012.
34. Eurocord. Who we are. [Internet]. 2015 [cited 2017 Jul 30]. Disponível em: <http://www.eurocord.org/about-eurocord.php>
35. New York Blood Center [Internet]. New York: NYBC Family; 2017 [cited 2017 Ago 02]. Disponível em: <http://nybloodcenter.org/about-us/nybc-overview/nybc-family/>
36. Petrini C. Umbilical cord blood collection, storage and use: ethical issues. *Blood Transfus.* 2010 Jul;8(3):139-148. doi:10.2450/2010.0152-09. PubMed PMID: 20671872; PubMed Central PMCID: 2906192.
37. Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. *J Clin Invest.* 2010 Jan 4; 120(1): 71-75. doi: 10.1172/JCI40435. PubMed PMID: 20051638; PubMed Central PMCID: 2798696.
38. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Relatório sobre investigação em células estaminais. [Internet]. 2005 [cited 2017 Ago 8]. Disponível em: [http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1273054467\\_P047\\_RelatorioCE\\_VersaoFinal.pdf](http://www.cneqv.pt/admin/files/data/docs/1273054467_P047_RelatorioCE_VersaoFinal.pdf)
39. Ramos A. Investigação com células estaminais-abordagem ética. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* [Internet]. 2008 [cited 2017 Ago 8]; 2: 29-32. Disponível em: <http://revistas.ulusofona.pt/index.php/rlcmv/article/view/1116>
40. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Legislação. [Internet]. 2017 [cited 2017 Ago 9]. Disponível em: <http://www.cneqv.pt/legislacao.php>
41. Crioestaminal. Patentes registadas. [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2017 Ago 22]. Disponível em: <http://www.crioestaminal.pt/patentes-registadas/>
42. Bebevida. Aplicações terapêuticas e potencial terapêutico. [Internet]. Lisboa: AppyLab; 2013 [cited 2017 Ago 24]. Disponível em: <http://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/aplicacoes-terapeuticas>
43. Gamida Cell. News Press Releases: Gamida Cell Announces First Patient Transplanted in Phase 1/2 Study of CordIn for Severe Aplastic Anemia and Hypoplastic MDS. [Internet]. 2017 [cited 2017 Ago 22]. Disponível em: [http://www.gamida-cell.com/press\\_release/gamida-cell-announces-first-patient-transplanted-in-phase-12-study-of-cordin-for-severe-aplastic-anemia-and-hypoplastic-mds/](http://www.gamida-cell.com/press_release/gamida-cell-announces-first-patient-transplanted-in-phase-12-study-of-cordin-for-severe-aplastic-anemia-and-hypoplastic-mds/)

44. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, et al. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med*. 2005 Mai 19;352(20):2069-81. doi: 10.1056/NEJMoa042604.
45. Staba SL, Escolar ML, Poe M, Kim Y, Martin PL, Szabolcs P, et al. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med*. 2004 Mai 6;350(19):1960-9. doi: 10.1056/NELMoa032613.
46. Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2007 Abr;211(1):27-35. doi: 10.1002/jcp.20959.
47. Crioestaminal. Aplicações atuais: Doenças tratáveis. [Internet]. Cantanhede: Crioestaminal; 2017 [cited 2017 Ago 24]. Disponível em: <http://www.crioestaminal.pt/aplicacoes-atuais/>
48. Sun J, Allison J, McLaughlin C, Sledge L, Waters-Pick B, Wease S, et al. Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: a pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion*. 2010 Set;50(9):10.1111/j.1537-2995.2010.02720.x. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02720.x. PubMed PMID: 20546200; PubMed Central PMCID: PMC3816574.
49. Zhao Y, Lin B, Darflinger R, Zhang Y, Holterman MJ, Skidgel RA. Human Cord Blood Stem Cell-Modulated Regulatory T Lymphocytes Reverse the Autoimmune-Caused Type 1 Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. *Unutmaz D, ed. PLoS ONE*. 2009;4(1):e4226. doi:10.1371/journal.pone.0004226. PubMed PMID: 19156219; PubMed Central PMCID: PMC2627485.
50. Cao X, Han ZB, Zhao H, Liu Q. Transplantation of mesenchymal stem cells recruit trophic macrophages to induce pancreatic beta cell regeneration in diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Ago;53:372-9. doi: 10.1016/j.biocel.2014.06.003.
51. Zhao Y, Jiang Z, Zhao T, Ye M, Hu C, Zhou H, et al. Targeting insulin resistance in type 2 diabetes via immune modulation of cord blood-derived multipotent stem cells (CB-SCs) in stem cell educator therapy: phase I/II clinical trial. *BMC Med*. 2013;11:160. doi:10.1186/1741-7015-11-160. PubMed PMID: 23837842; PubMed Central PMCID: PMC 3716981.
52. Shin T-H, Kim H-S, Kang T-W, Lee B-C, Lee H-Y, Kim Y-J, et al. Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis*. 2016 Dec;7(12):e2524. doi:10.1038/cddis.2016.442. PubMed PMID: 28005072; PubMed Central PMCID: PMC 5260999.
53. Encinas JM, Fitzsimons CP. Gene regulation in adult neural stem cells. *Current challenges and possible applications. Adv Drug Deliv Ver*. 2017 Jul 25; pii: S0169-409X(17)30123-0. doi: 10.1016/j.addr.2017.07.016.

54. Shin JY, Park HJ, Kim HN, Oh SH, Bae JS, Ha HJ, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase  $\beta$ -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*. 2014 Jan 1;10(1):32-44. doi: 10.4161/auto.26508. PubMed PMID: 24149893; PubMed Central PMCID: PMC4389879.
55. Ehrhart J, Darlington D, Kuzmin-Nichols N, Sanberg CD, Sawmiller DR, Sanberg PR, et al. Biodistribution of Infused Human Umbilical Cord Blood Cells in Alzheimer's Disease-Like Murine Model. *Cell Transplant*. 2016;25(1):195-9. doi: 10.3727/096368915X689604.
56. Darlington D, Li S, Hou H, Habib A, Tian J, Gao Y, et al. Human umbilical cord blood-derived monocytes improve cognitive deficits and reduce amyloid- $\beta$  pathology in PSAPP mice. *Cell Transplant*. 2015;24(11):2237-50. doi: 10.3727/096368915X688894.
57. Cotten CM, Murtha AP, Goldberg RN, Grotegut CA, Smith PB, Goldstein RF, et al. Feasibility of Autologous Cord Blood Cells for Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Pediatr*. 2014 Mai;164(5):973-979. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.11.036. PubMed PMID: 24388332; PubMed Central PMCID: PMC3992180.
58. Meier C, Middelani J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, et al. Spastic Paresis After Perinatal Brain Damage in Rats Is Reduced by Human Cord Blood Mononuclear Cells. *Pediatric Res*. 2006 Feb;59(2):244-249. doi: 10.1203/01.pdr.0000197309.08852.f5.
59. Lv Y-T, Zhang Y, Liu M, Qiuwaxi J, Ashwood P, Cho SC, et al. Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J Transl Med*. 2013;11:196. doi:10.1186/1479-5876-11-196. PubMed PMID: 23978163; PubMed Central PMCID: PMC3765833.
60. Zhou Z, You Z. Mesenchymal stem cells alleviate LPS-induced acute lung injury in mice by MiR-142<sup>a</sup>-5p-controlled pulmonary endothelial cell autophagy. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(1):258-66. doi: 10.1159/000438627.
61. Min F, Gao F, Li Q, Liu Z. Therapeutic effect of human umbilical cord mesenchymal stem cells modified by angiotensin-converting enzyme 2 gene on bleomycin-induced lung fibrosis injury. *Mol Med Rep*. 2015 Abr;11(4):2387-2396. doi:10.3892/mmr.2014.3025. PubMed PMID: 25435005; PubMed Central PMCID: PMC 4337478.
62. Huang X, Sun K, Zhao YD, Vogel SM, Song Y, Mahmud N, et al. Human CD34+ Progenitor Cells Freshly Isolated from Umbilical Cord Blood Attenuate Inflammatory Lung Injury following LPS Challenge. *PLoS One*. 2014;9(2):e88814. doi:10.1371/journal.pone.0088814. PubMed PMID: 24558433; PubMed Central PMCID: PMC 3928308.
63. Kang SY, Park DE, Song WJ, Bae BR, Lee JW, Sohn KH, et al. Immunologic regulatory effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in

- a murine ovalbumin asthma model. *Clin Exp Allergy*. 2017 Jul;47(7):937-945. doi: 10.1111/cea.12920.
64. Chang YS, Ahn SY, Yoo HS, Sung SI, Choi SJ, Oh WI, et al. Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase 1 dose-escalation clinical trial. *J Pediatr*. 2014 Mai;164(5):966-972.e6. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.12.011.
65. Bassiouny AR, Zaky AZ, Abdulmalek SA, Kandeel KM, Ismail A, Moftah M. Modulation of AP-endonuclease1 levels associated with hepatic cirrhosis in rat model treated with human umbilical cord blood mononuclear stem cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(7):692-707. PubMed PMID: 22076170; PubMed Central PMCID: PMC 3209610.
66. Liu W, Zhang S, Gu S, Sang L, Dai C. Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF $\beta$ 1. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(3):858-865. doi: 10.1159/000369743.
67. Kim HS, Shin TH, Lee BC, Yu KR, Seo Y, Lee S, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 signaling to COX2. *Gastroenterology*. 2013 Dec;145(6):1392-403.e1-8. doi: 10.1053/j.gastro.2013.08.033.
68. Zhang J, Wu Y, Chen A, Zhao Q. Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(3):1219-29. doi: 10.1159/000373945.
69. Cho H, Kim P, Chang H, Shen Y, Bonsra K, Kang B, et al. Targeted Genome Engineering to Control VEGF Expression in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Implications for the Treatment of Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(3):1040-1051. doi:10.1002/sctm.16-0114. PubMed PMID: 28186692; PubMed Central PMCID: PMC 5442764.
70. Xu LX, Cao YB, Wang ZH, Liu ZY, Liu B, Zhao DD, et al. Efficacy of haploidentical allogeneic bone marrow hematopoietic stem cell transplantation combined with umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells for severe aplastic anemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011 Oct;19(5):1241-5. PubMed PMID: 2200980.
71. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, Hingtgen S, Van de Water AJ, Mohapatra G, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Mar 24;106(12):4822-4827. doi: 10.1073/pnas.0806647106. PubMed PMID: 19264968; PubMed Central PMCID: PMC2660771.
72. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, Salazar G, Yamashita T, et al. Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit, But Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote, Glioblastoma Multiforme Proliferation. *Stem Cells Dev*. 2013;22(9):1370-1386. doi:10.1089/scd.2012.0486. PubMed PMID: 23231075; PubMed Central PMCID: PMC 3696928.

73. Caplan AL. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):341-7. doi: 10.1002/jcp.21200.
74. Han Y, Sun T, Tao R, Han Y, Liu J. Clinical application prospect os umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on clearance os advanced glycation end products through autophagy on diabetic wound. *Eur J Med Res.* 2017;22:11. doi: 10.1186/s4000-017-0253-1. PubMed PMID: 28340602; PubMed Central PMCID: PMC5366161.
75. Fong CY, Tam K, Cheyyatraivendran S, Gan SU, Gauthaman K, Armugam A, et al. Human Wharton's jelly stem cells and its condicioned medium enhance healing of excisional and diabetic wounds. *J Cell Biochem.* 2014 Fev;115(2):290-302. doi: 10.1002/jcb.24661.
76. Amo AI, Amini-Nik S, Blit PH, Al-Shehab M, Belo C, Herer E, et al. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(1):28. doi: 10.1186/scrt417. PubMed PMID: 24564987; PubMed Central PMCID: PMC4055091.