



Inês Filipa Gomes Rodrigues

## Criopreservação das células estaminais do sangue e tecido do cordão umbilical: limitações e aplicações

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Cláudia Margarida Gonçalves Cavadas e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Inês Filipa Gomes Rodrigues

# Criopreservação das células estaminais do sangue e tecido do cordão umbilical: limitações e aplicações

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
Orientada pela Professora Doutora Cláudia Margarida Gonçalves Cavadas e apresentada à  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Inês Filipa Gomes Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2010143638, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

---

*(Inês Filipa Gomes Rodrigues)*

## **AGRADECIMENTOS**

O percurso parecia longo mas rapidamente culminou neste derradeiro ponto da minha vida académica. Tenho de agradecer a todos os que me acompanharam e que desempenharam um papel importante na sua concretização. Deste modo, um grande obrigada:

Aos meus pais e irmã por todo o amor, carinho, confiança e apoio que me deram ao longo desta caminhada, sem eles nada disto seria possível.

À restante família que sempre estiveram presentes com uma palavra de incentivo, em especial à minha avó que estará para sempre comigo.

À Professora Cláudia Cavadas, por toda a ajuda e disponibilidade.

Aos amigos de sempre e aos que comigo trilharam este caminho em Coimbra partilhando momentos inesquecíveis que comigo levarei para a vida.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, todo o corpo docente e não docente, por terem contribuído para o meu enriquecimento tanto académico como pessoal.

E por fim, a Coimbra!

## ÍNDICE

Resumo .....	4
Abstract .....	5
Abreviaturas.....	6
I. Introdução.....	7
II. Definição de células estaminais .....	8
III. Células estaminais mesenquimais .....	8
IV. Criopreservação .....	10
V. Ensaios pré-clínicos .....	12
a. Enfarte agudo do miocárdio em murganhos .....	12
b. Artrite em ratos.....	13
VI. Ensaios clínicos.....	13
VII. Limitações .....	19
VIII. Conclusão .....	20
IX. Bibliografia.....	21

## RESUMO

Atualmente, a criopreservação de células estaminais do sangue e tecido do cordão umbilical é um assunto que ainda gera algumas questões a nível da sua aplicabilidade.

Estão disponíveis diversos artigos científicos bem como ensaios clínicos em curso que exploram as suas aplicações nomeadamente em doenças autoimunes devido às propriedades imunoreguladoras das células estaminais mesenquimais que constituem o tecido e o sangue do cordão umbilical.

Apesar de os resultados serem promissores, é importante referir que ainda existem limitações que necessitam de ser ultrapassadas sendo a investigação um ponto essencial nesse processo.

Com esta monografia pretende-se demonstrar as propriedades e o potencial para aplicação terapêutica em diversas doenças das células estaminais mesenquimais bem como as barreiras que esta transplantação enfrenta para que seja considerada um tratamento efetivo.

## **ABSTRACT**

Nowadays, the cryopreservation of stem cells from umbilical cord blood and tissue is a subject that still raises some issues in terms of its applicability.

Various scientific articles and ongoing clinical trials explore their applications in particular in autoimmune diseases due to immune-regulatory properties of mesenchymal stem cells from umbilical cord tissue are available.

Despite the promising results, it is important to note that there are some limitations which need to be overcome and clinical investigation is an essential point in this process.

With this paper we will describe the properties and the potential of mesenchymal stem cells for therapeutic use in various diseases as well as the obstacles that this transplantation faces to be considered an effective treatment.

## ABREVIATURAS

CD – *Cluster of differentiation*

CE – Células Estaminais

CEM – Células Estaminais Mesenquimais

CEM-CU – Células Estaminais Mesenquimais oriundas do cordão umbilical

CMSCU – Células Mononucleares do Sangue do Cordão Umbilical

CU – Cordão Umbilical

DMARDs – Agentes anti-reumáticos modificadores da doença

EAM – Enfarte agudo do miocárdio

GVHD – Doença do enxerto contra o hospedeiro

HLA-G5 – Antígeno Leucocitário Humano G5

IDO – Indolamina 2-3-dioxigenase

IFN-gama – Interferão gama

IL – Interleucina

ISCT – *International Society for Cellular Therapy*

PGE2 – Prostaglandina E2

TGF – *Transforming Growth Factor*

TNF alfa – Fator de necrose tumoral alfa



## **I. INTRODUÇÃO**

Cada vez mais a criopreservação das células estaminais do cordão umbilical é um assunto a ter em conta quando se espera um filho. Esta é uma questão entre muitas com que os novos pais se debatem que vê o seu processo de decisão baralhado com a vasta oferta disponível e a imensa informação divulgada.

Uma das opções mais recentes oferecida é a criopreservação do próprio tecido do cordão umbilical em acréscimo à recolha do sangue disponível há vários anos. É de realçar que estas soluções apresentadas variam no seu custo, ou seja, há um acréscimo do preço aquando da recolha simultânea para além de que diferentes métodos de processamento da amostra também têm impacto monetário.

Assim sendo, é imprescindível ter conhecimento das limitações e vantagens, nomeadamente em que situações clínicas poderá ser benéfica a utilização das células do tecido do cordão umbilical.

## II. DEFINIÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS

A primeira população de células estaminais foi identificada na medula óssea de um rato adulto por McCulloch and Till em 1960 estabelecendo-se assim as principais propriedades destas células, autorrenovação, podendo dividirem-se indefinidamente e a capacidade de diferenciação em diversas linhagens celulares segundo as condições a que estão sujeitas [1].

As células estaminais (CE) podem ser classificadas de acordo com a sua origem ou capacidade de diferenciação.

Sendo assim, as CE podem ser classificadas como embrionárias ou adultas sendo que as primeiras são isoladas do blastocisto, 4 a 5 dias após a fertilização e são capazes de se diferenciar nas três camadas germinativas embrionárias (endoderme, mesoderme e ectoderme) e dar origem a todos os tipos de células, isto é, são totipotentes [2].

As células estaminais adultas já possuem algum grau de diferenciação uma vez que se encontram em diversos tecidos e são um reservatório para a substituição de células danificadas ou envelhecidas o que revela a sua multipotência [2]. A principal função das células estaminais adultas é a manutenção e reparação dos tecidos específicos e órgãos onde se encontram.

O tecido do cordão umbilical é constituído maioritariamente por Células Estaminais Mesenquimais que são consideradas adultas apesar de possuírem uma elevada capacidade de multiplicação e diferenciação em várias linhagens celulares [3].

## III. CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS

Em 2006, a *International Society for Cellular Therapy* definiu que para classificar as células estaminais mesenquimais (CEM), estas necessitam de demonstrar as seguintes características:

1. Quando mantidas em frascos de cultura de forma a se multiplicarem e proliferarem, estas aderem ao material plástico;
2. Expressam antigénios de superfície, nomeadamente CD73, CD90 e CD105 e não expressam CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79a, CD19 e HLA-DR;
3. Quando expostas a meios de cultura adequados, apresentam a capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares podendo originar células de tecido ósseo, cartilagem e tecido adiposo [4].

As CEM podem ser isoladas de diferentes tecidos, como a medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, placenta e cordão umbilical. A medula óssea era considerada a fonte principal destas células para a sua aplicação clínica e experimental, o que implica que a maior parte do conhecimento acerca destas deriva de estudos de CEM recolhidas da medula óssea.

Apesar de apresentar desvantagens como a diminuição significativa com a idade, a sua recolha constitui um método invasivo que pode originar infeções, hemorragias e dor [5].

O cordão umbilical e o sangue do cordão umbilical constituem fontes de células estaminais mesenquimais. Apesar de serem consideradas células estaminais adultas são células jovens e por isso, com um potencial de multiplicação e de diferenciação.

Por este conjunto de razões, nos últimos anos, o cordão umbilical, como fonte de células estaminais mesenquimais, tem-se tornado uma possível alternativa à transplantação de medula óssea devido à sua composição em células estaminais hematopoiéticas e mesenquimais uma vez que apesar de partilharem as mesmas propriedades, as CEM-CU adultas são geralmente consideradas como uma população mais primitiva apresentando uma maior capacidade de regeneração e proliferação [6].

As CEM-CU possuem propriedades imunoreguladoras que podem resultar de contacto celular ou através da secreção de diversos fatores solúveis.

As propriedades imunossupressoras destas células tornaram-se na maior vantagem para o potencial uso clínico, que se revelam particularmente interessantes no caso de doenças autoimunes. Estas células são fracamente imunogénicas devido à baixa expressão de moléculas de MHC-classe I e a não expressão de HLA-DR [6]. Comparativamente com as células oriundas da medula óssea de dadores inevitavelmente mais velhos, as CEM-CU expressam significativamente níveis mais baixos de HLA I mas por outro lado, exibem uma maior concentração intracelular de HLA-G, uma molécula imunossupressora [7].

As CEM-CU não expressam as moléculas co-estimulatórias da ativação de linfócitos T CD40, CD80 E CD86 e não provocam uma resposta proliferativa por parte de linfócitos T *in vitro*, podendo-se inferir a sua baixa imunogenicidade o que as torna adequadas para terapias celulares alogénicas aumentando a taxa de sucesso destas por não induzirem rejeição [6,7].

As CEM-CU afetam a diferenciação e a função das populações de linfócitos T na sua capacidade para produzir citocinas pró-inflamatórias inibindo a produção de IL-17, IL-22, TNF-alfa. Para além disso, promove a secreção de IL-10 o que sugere a diferenciação de linfócitos T reguladores [8].

O efeito imunossupressor também é mediado por fatores solúveis como PGE2 e HLA-G5 que são libertados por estas células [8].

A PGE2 é constitutivamente expressa pelas CEM mas a sua expressão aumenta em caso de inflamação o que origina um decréscimo da proliferação de linfócitos T. Já a HLA-G5

Criopreservação de células estaminais do sangue e tecido do cordão umbilical: limitações e aplicações promove a secreção de IL-10 o que, como já foi referido anteriormente, leva à diferenciação de linfócitos T reguladores [9].

Para além destes, a indolamina 2-3-dioxigenase é uma das proteínas mais relevantes deste processo uma vez que é induzida pelo IFN-gama e catalisa a conversão do triptofano em quinurenina. Esta depleção de triptofano suprime a proliferação de células T. A escassez de triptofano mediada pela IDO compromete a função das células imunes e desencadeia a apoptose induzida por *stress*, predominantemente de linfócitos Th1. Para além disso, alguns catabolitos derivados da via metabólica da quinurenina são diretamente tóxicos para estes linfócitos [8].

#### **IV. CRIOPRESERVAÇÃO**

A criopreservação é definida como a conservação durante longos períodos de tempo de células vivas estruturalmente intactas recorrendo a baixas temperaturas e a um crioprotetor com baixa toxicidade que tenha a capacidade de penetrar nas células sem as danificar [10].

A criopreservação de células do tecido do cordão umbilical pode ser feita de diversos métodos, o que pode diferir no preço do serviço disponibilizado por diversas empresas que fazem a sua recolha, isolamento e criopreservação.

A *Crioestaminal* apresenta a solução em que o tecido é processado e criopreservado através de dois métodos diferentes referindo que desta forma é possível guardar um maior número de células. Enquanto um dos métodos se baseia na menor manipulação do tecido no laboratório em que a amostra é diretamente criopreservada em 4 tubos de criogenia, o segundo método inclui uma digestão enzimática do tecido com o intuito de isolar as células, sendo estas criopreservadas, o que em caso de necessidade, as células estaminais mesenquimais vão encontrar-se imediatamente disponíveis para a transplantação [11].

A *Bebevida* apresenta dois métodos distintos em que após a colheita do tecido do cordão umbilical, se procede à sua lavagem e desinfeção e posterior corte em segmentos de 2 milímetros. Após este passo, comum aos 2 métodos, é que ocorre a distinção uma vez que é possível, logo após fazer o estudo microbiológico, adicionar o crioprotetor a estes fragmentos e armazená-los em azoto líquido, sendo referido que o isolamento poderá ser feito no momento em que as células forem necessárias sem o comprometimento da sua qualidade. Por outro lado, pode-se proceder ao isolamento das células estaminais mesenquimais dos fragmentos do tecido através de uma digestão enzimática incluindo também o estudo microbiológico e posterior criopreservação [12].

Estas duas empresas explicam de forma sucinta os seus serviços dando a opção de escolha aos futuros pais. É de referir que conforme o serviço escolhido, o preço difere sendo que o isolamento das CEM logo após a recolha do tecido constitui o pack com o custo mais elevado, sendo a duração da criopreservação de 25 anos [13,14].

De forma a uma melhor comparação entre os diversos ensaios clínicos é necessário um método de isolamento de CEM padronizado o que ainda não acontece como está patente nos exemplos anteriores.

Um exemplo de um processo de isolamento de células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical foi desenvolvido por investigadores portugueses em que a partir deste surge um produto patenteado a que deram o nome de UCX<sup>®</sup> [15]. Neste método, o cordão umbilical após ser recolhido no *kit* deve ser processado num prazo máximo de 72 horas. O primeiro passo é uma efetiva descontaminação do tecido com a adição de solução antimicrobiana de forma a evitar o seu uso aquando da expansão. A fragmentação em pedaços de cerca de 2,5 centímetros é o passo seguinte sofrendo uma digestão enzimática e posterior centrifugação. A suspensão celular resultante, que inclui diversos tipos de células estaminais sendo que as mesenquimais apenas representam 0,1%, é incubada em frascos de cultura horizontais com meio de cultura adequado sendo que após uma noite, o meio de cultura é substituído de forma a que as células não aderentes sejam eliminadas, isto é, a sua purificação já que as células mesenquimais aderem aos frascos de cultura de plástico segundo os critérios da ISCT. A cultura é mantida de modo a potenciar a proliferação celular até ao revestimento completo do fundo do frasco o que normalmente atinge os 3 milhões de células, com mudanças periódicas do meio de cultura e verificação de que não existe qualquer tipo de contaminação microbiológica. Para comprovar este método foram feitos diversos ensaios como a análise imunofenotípica de forma a observar se as células expressam os marcadores de superfície que as caracterizam, CD73, CD90, CD105, ou a sua capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos ou osteócitos mediante condições apropriadas [15].

**Tabela I** – Serviços disponibilizados pelas diferentes empresas e respetivos preços na recolha de células estaminais.

<b>Serviços</b>	<b>Bebecord [16]</b>	<b>Bebevida [14]</b>	<b>Criobaby [17]</b>	<b>Crioestaminal [13]</b>	<b>Criovida [18]</b>	<b>Cytothera [19]</b>
Criopreservação sangue do cordão umbilical	1095€	995€	935€	1185€	995€	1000€
Criopreservação do sangue do cordão umbilical com processamento avançado (recuperação até mais 15% de células estaminais)	1495€	-	-	-	1395€	-
Criopreservação do tecido do cordão umbilical	-	995€	-	-	-	1000€
Criopreservação do sangue e tecido do cordão umbilical	1795€	1595€	1450€	1785€	1550€	-
Criopreservação usando 4 métodos distintos de processamento, permitindo guardar até mais 15% das células do sangue e isolamento imediato das células estaminais mesenquimais do tecido do cordão umbilical	2495€	2395€	-	2485€	1950€	1800€

## V. ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS

### a. Enfarte agudo do miocárdio em murganhos

Num estudo publicado em 2014 e realizado em Portugal foi avaliado o transplante de CEM do tecido do cordão umbilical denominadas como UCX<sup>®</sup>, devido ao processo de criopreservação estar bem descrito e patenteado pela empresa *ECBio*, em murganhos com enfarte agudo do miocárdio via injeção intramiocárdial. Os resultados obtidos mostram que foi preservada a função cardíaca bem como atenuada a remodelação cardíaca subsequente ao enfarte. Para além disso, foi também referido um aumento da densidade capilar e diminuição da apoptose no tecido afetado. Segundo os autores, estes efeitos cardioprotetores são atribuídos a mecanismos parácrinos que aumentam a angiogénese e limitam a extensão da apoptose.

Deste modo, os resultados mostram que o UCX<sup>®</sup> pode ser considerado uma fonte alternativa de células no desenvolvimento de novas terapêuticas para o EAM [20].

### **b. Artrite em ratos**

Mais um estudo realizado em Portugal consistiu na administração destas células *in vivo* em ratos com artrite aguda induzida por carragenina e em ratos com artrite crónica induzida por adjuvante. Na primeira, foi demonstrado que as CEM-UCI diminuem o edema da pata mais eficazmente que as oriundas da medula óssea. Por sua vez, na segunda, os animais tratados com infusões intra-articulares e intra-peritoneais demonstraram uma remissão mais rápida das manifestações locais e sistémicas da artrite [21].

Neste estudo, os autores também mostraram que o UCX<sup>®</sup> são células estaminais mesenquimais pelo facto de expressarem os marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e apresentarem a capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos. Para além disso, comprovaram a capacidade destas células de inibir a proliferação dos linfócitos T e ao mesmo tempo induzir a diferenciação em linfócitos T reguladores. Os resultados obtidos evidenciaram que esta capacidade é mais evidente nas células UCX<sup>®</sup> que nas CEM oriundas da medula óssea [21].

Os autores concluíram que as células estaminais mesenquimais do cordão umbilical, aqui referidas como UCX<sup>®</sup> devido ao processo como são recolhidas e criopreservadas estar bem descrito e patenteado, parecem ser uma efetiva e promissora estratégia para o tratamento das manifestações tanto locais como sistémicas da artrite inflamatória [21].

Neste campo da artrite reumatoide também já se encontram disponíveis estudos em humanos com CEM do cordão umbilical. Um dos mais relevantes envolveu 172 doentes que não respondiam ao tratamento tradicional sendo divididos em dois grupos, em que num o tratamento consistia apenas na toma de DMARDs enquanto no outro grupo para além desta terapêutica, foi também administrado CEM-CU via intravenosa. Os valores serológicos de TNF-alfa e de IL-6 baixaram após a administração das células mesenquimais [22].

O tratamento induziu uma melhoria na remissão da doença segundo os critérios da *American College of Rheumatology* e os efeitos terapêuticos mantiveram-se durante 3 a 6 meses sem a continuação da administração o que foi relacionado com o aumento da percentagem de linfócitos T reguladores no sangue periférico. Os autores concluíram que a administração conjunta de DMARDs com CEM-CU providencia benefícios clínicos aliados à segurança em doentes com artrite reumatoide [22].

## **VI. ENSAIOS CLÍNICOS**

Diversos ensaios clínicos têm utilizado as células mesenquimais no contexto de terapia celular e medicina regenerativa.

Tabela 2 – Ensaio clínicos utilizando as Células Estaminais Mesenquimais

Ensaio clínico	Doença	Ensaio e número de doentes	Descrição	Empresa/instituto de investigação e Local	Resultados	Possível mecanismo de ação	Observações
Safety and Exploratory Efficacy Study of NEUROSTEM® Versus Placebo in Patients With Alzheimer's Disease [23]	Doença de Alzheimer	Ensaio de fase I/II Estado de recrutamento Avaliação da eficácia e segurança 40 doentes (50-85 anos)	Três administrações nos ventrículos cerebrais de NEUROSTEM®, produto composto por CEM-CU, via <i>Ommaya reservoir</i> com 4 semanas de intervalo. Ensaio composto por três braços: 1. dose administrada de NEUROSTEM® é baixa (1 x 10 <sup>7</sup> células/2mL); 2. dose de NEUROSTEM® é alta (7.5 x 10 <sup>7</sup> células/15mL) 3. placebo com a administração de 15mL de solução salina	Patrocínio por Medipost Co. Realizado no Samsung Medical Center em Seoul, República da Coreia	Previsão de resultados em Dezembro de 2015	Promoção da proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais restaurando a funcionalidade do tecido nervoso	
Safety and Efficacy of Stem Cell Therapy in Patients With Autism [24, 25]	Autismo	Estudo de fase I/II terminado Avaliação da eficácia e segurança 37 crianças (3-12 anos)	Avaliação da eficácia e segurança da transplantação por via intravenosa ou intratecal de células mononucleares do sangue do cordão umbilical e/ou células estaminais mesenquimais do cordão umbilical	Patrocínio por Shenzhen Beike Bio-Technology Co. Realizado no Shandong Jiaotong Hospital, China	Sem efeitos adversos a curto e médio prazo durante as 24 semanas de acompanhamento	Aumento da perfusão sanguínea em algumas áreas cerebrais por incremento da angiogénese e a regulação da distfunção imune	Maior eficácia terapêutica aquando da transplantação conjunta de CEM-CU e CMSCU o que pode ser atribuído à ação sinérgica de ambas
Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal	Diabetes tipo I	Ensaio duplamente cego terminado 29 doentes com idades inferiores a 25 anos	2 grupos: 1. Insulinoterapia + administração intravenosa de CEM-CU 2. Insulinoterapia + administração intravenosa de	Stem Cell Center of the Affiliated Hospital of the Medical College, Qingdao	No grupo I, em 3 doentes, a insulinoterapia foi descontinuada, em 8 reduzida mais de 50%, I reduzida	Restabelecimento da desregulação imunitária que leva à destruição de células pancreáticas beta através do	A dose de insulina, administrada durante o acompanhamento foi ajustada de



Ensaio clínico	Doença	Ensaio e número de doentes	Descrição	Empresa/instituto de investigação e Local	Resultados	Possível mecanismo de ação	Observações
stem cells from the umbilical cord for newly-onset type 1 diabetes mellitus [26]			solução salina	University, China	entre 15 a 50% e em 2 a dose de insulina foi mantida. No grupo II, a dose de insulina aumentou gradualmente.	controle dos linfócitos T com a secreção de moléculas co-estimulatórias negativas como o IL-4, IL-10, IFN-gama e TGF-beta	acordo com a glicémia do doente
Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes [27]	Diabetes tipo 2	Ensaio de fase I/II terminado Avaliação da eficácia e segurança 6 doentes (27 - 51 anos)	Transplantação alogénica de CEM-UC com um período de acompanhamento de 24 meses	Weifang People's Hospital em Weifang, China	A necessidade de insulina baixou: sendo que 3 doentes tornaram-se independentes de insulina durante 24 meses e verificou-se um aumento dos valores de peptídeo-c	As CEM induzem a regeneração das células pancreáticas beta e podem inibir a resposta imunitária mediada pelos linfócitos T contra as recém-formadas células beta	A idade mais avançada, a longa história diabética, os valores de peptídeo c inferiores antes do tratamento, podem indicar uma menor recuperação da função das células pancreáticas beta, o que se reflete na menor eficácia da transplantação com CEM-CU
Mesenchymal Stem Cells for Bronchopulmonary Dysplasia: Phase I Dose-Escalation Clinical Trial [28,29]	Displasia Broncopulmonar Neonatal	Ensaio clínico de fase I terminado Avaliação da segurança a longo prazo 9 recém-nascidos prematuros (24 a 26 semanas)	As células mesenquimais foram transplantadas na traqueia entre 5 a 14 dias após o nascimento sendo as crianças acompanhadas até 84 dias após o transplante com a existência de um grupo controle com recém-nascidos nas mesmas condições mas que não foram submetidos ao tratamento	Patrocínio por Medipost Co. Realizado no Samsung Medical Center em Seoul, Republica da Coreia	A gravidade da displasia broncopulmonar foi menor no grupo transplantado, 33% apresentaram esta doença de forma moderada, não se registando nenhum caso severo	Mecanismo incerto pois não foi aferido se a diminuição das citocinas no aspirado traqueal se deve ao curso natural do processo inflamatório ou aos efeitos imunomoduladores	No grupo controle, 72% dos casos apresentaram displasia pulmonar moderada ou severa

Ensaio clínico	Doença	Ensaio e número de doentes	Descrição	Empresa/instituto de investigação e Local	Resultados	Possível mecanismo de ação	Observações
Effective Treatment of Severe Steroid-Resistant Acute Graft-Versus-Host Disease With Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells [30]	Doença do enxerto contra o hospedeiro	<p>O estudo relata a transplantação de CEM-UC em 2 doentes com 4 e 6 anos.</p> <p>O primeiro com anemia aplástica severa e o segundo com leucemia linfoblástica aguda, o primeiro devido à infusão de células estaminais de sangue periférico e o segundo por transplantação alogénica de sangue do cordão umbilical</p> <p>Passado alguns dias desenvolveram sintomatologia que foi confirmada por biopsia à pele como Doença do enxerto contra o hospedeiro aguda</p>	<p>Foram transplantadas CEM do cordão umbilical via intravenosa às duas crianças.</p> <p>O primeiro doente recebeu três transfusões de CEM-CU.</p> <p>Por sua vez, o segundo doente, apenas recebeu uma transfusão</p>	China Medical University Hospitals, Taichung, Taiwan	<p>O primeiro doente de cada vez que recebeu as transfusões, a GVHD melhorou significativamente e eventualmente desapareceu.</p> <p>O segundo, a única transfusão levou à completa remissão da doença</p>	<p>As CEM atenuam a resposta imune devido às propriedades imunossupressoras</p>	
Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stromal Cells For The Treatment of Severe Steroid-resistant Graft Versus Host Disease (PTC-UC-MS-C)	Doença do enxerto contra o hospedeiro	<p>Ensaio clínico de fase I/II</p> <p>Estado de recrutamento</p> <p>Avaliação da segurança e eficácia</p> <p>Inclusão de 47 doentes</p>	<p>Administração de pentostatina intravenosamente durante 3 dias consecutivos e posteriormente serão administradas 3 doses de CEM-CU a cada doente com uma semana de intervalo</p>	A.O. Ospedale Papa Giovanni XXIII em colaboração com Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Itália	<p>Previsão de resultados em Setembro de 2016</p>	<p>As CEM atenuam a resposta imune devido às propriedades imunossupressoras</p>	<p>A pentostatina é um antimetabolito usado no tratamento do cancro nomeadamente na tricoleucemia, que afeta os glóbulos brancos apresentando</p>

Ensaio clínico	Doença	Ensaio e número de doentes	Descrição	Empresa/instituto de investigação e	Resultados	Possível mecanismo de ação	Observações
[31,32]							benefícios no tratamento da GVHD
A Dose-escalation Safety Trial for Intrathecal Autologous Mesenchymal Stem Cell Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis [33]	Esclerose Lateral Amiotrófica	Estudo de fase I  Estado de recrutamento Avaliação da segurança Inclusão de 25 doentes	Administração por Injeção intratecal de células estaminais mesenquimais isoladas do tecido adiposo do próprio doente e expandidas posteriormente em laboratório, dividindo os doentes em 5 grupos: 1. única dose de $1 \times 10^7$ células 2. única dose de $5 \times 10^7$ células 3. 2 doses intratecais de $5 \times 10^7$ células (intervalo de 1 mês) 4. única dose intratecal de $1 \times 10^8$ células 5. 2 doses intratecais de $1 \times 10^8$ células (intervalo de 1 mês)	Mayo Clinic, Estados Unidos da América	Previsão de resultados em Dezembro de 2015	Espera-se que as células estaminais mesenquimais cessem o desenvolvimento da doença ou pelo menos o abrande devido à pressuposição de que irão proteger a função neuromuscular e promover a sobrevivência das células nervosas.	Apesar das células referidas neste ensaio não serem provenientes do tecido do cordão umbilical, possuem as mesmas propriedades sendo classificadas como CEM o que não pode ser transporto mas que pode abrir portas apostando na investigação neste sentido usando as próprias células do tecido do cordão umbilical dos doentes criopreservadas aquando do nascimento
Feasibility Study of Human Umbilical Cord Tissue-Derived Mesenchymal	Esclerose Múltipla	Ensaio clínico de fase I/II em curso mas não recrutando doentes  Avaliação da eficácia e	Administração intravenosa de CEM-CU uma vez por dia em 7 dias consecutivos. A segurança e eficácia do tratamento serão avaliadas	Translacional Biosciences, Panamá	Previsão de resultados em Agosto de 2017	Efeito benéfico devida às propriedades imunomoduladoras das CEM	

Ensaio clínico	Doença	Ensaio e número de doentes	Descrição	Empresarial/instituto de investigação e Local	Resultados	Possível mecanismo de ação	Observações
Stem Cells in Patients With Multiple Sclerosis [34]		segurança Inclusão de 20 doentes (18 - 55anos)	após 4, 12 e 52 semanas da administração.				
Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Refractory Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [35]	Lúpus Eritematoso	Ensaio aberto não randomizado de fase I/II Avaliação da eficácia e segurança 16 doentes (17 - 56 anos) com forma severa da doença ou que já não respondiam aos tratamentos	A 11 dos doentes foi administrado ciclofosfamida intravenosamente durante 2 a 4 dias. Aos restantes não foi administrada devido à sua condição clínica ou mielosupressão antes da transplantação. A administração intravenosa de células correspondeu a 1x10 <sup>6</sup> por kg de massa corporal.	Patrocínio por Nanjing Medical University em colaboração com National Natural Science Foundation of China	Registou-se uma melhoria tanto clínica como serológica, não sendo associada com mortalidade ou efeitos adversos.	A remissão da doença pode ser associada com um aumento da proporção de linfócitos T reguladores no sangue periférico com um decréscimo dos níveis de IL-4 o que resulta na inibição da atividade humoral	

## VII. LIMITAÇÕES

Como referido, a transplantação das células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical já foi testada em diversas patologias em modelos animais.

Apesar da investigação pré-clínica efetuada com estas células mostrar resultados promissores, a investigação clínica neste campo das células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical necessita de estudos com mais doentes, com protocolos bem estabelecidos e períodos de seguimento mais prolongados de modo a assegurar que se trata de uma terapêutica efetivamente segura e eficaz em determinadas doenças.

A investigação encontra-se em permanente evolução e espera-se que em alguns anos, esta transplantação seja encarada como uma esperança no tratamento de doenças que atualmente carecem de terapêutica.

**Tabela 3** – Vantagens e limitações da transplantação de células estaminais mesenquimais oriundas do cordão umbilical.

### Vantagens

- Processo indolor e não invasivo de recolha do tecido do cordão umbilical aquando do nascimento.
- CEM com elevado potencial de multiplicação e de diferenciação em diversas linhagens celulares como adipócitos e condrócitos [4].
- CEM-CU possuem propriedades imunoreguladoras o que demonstra o especial interesse em doenças autoimunes [7].
- CEM-CU fracamente imunogénicas, adequadas para terapias celulares alogénicas aumentando a taxa de sucesso destas por não induzirem rejeição [6].
- Publicados inúmeros estudos com resultados promissores em diversas doenças que atualmente não têm tratamento.

### Limitações

- Necessidade de estudos com protocolos bem estabelecidos com a inclusão de um maior número de doentes e períodos de acompanhamento mais prolongados.
- Mecanismos por detrás dos efeitos benéficos pouco esclarecidos.
- Transplantação de CEM-CU vista como uma aposta no futuro dependente de investigação nesse sentido.

## **VIII. CONCLUSÃO**

O tecido do cordão umbilical tende a impor-se como a fonte significativa de células estaminais mesenquimais.

Os processos de criopreservação apresentam diferenças, o que influencia o custo deste serviço e requiere diferentes procedimentos em caso de utilização futura. Para além disso, a sua transplantação requiere que seja identificada a dose de células, o tempo e forma de administração mais eficaz.

As células estaminais mesenquimais derivadas do cordão umbilical constituem uma esperança no tratamento de diversas patologias. Apesar dos resultados promissores, ainda são evidentes inúmeras limitações como a carência de estudos envolvendo mais doentes e com um período de seguimento prolongado de forma a avaliar a segurança e eficácia a longo prazo.

Em suma, ainda há muito a fazer neste campo mas penso que haverá desenvolvimentos e que, dentro de alguns anos, as células estaminais mesenquimais do tecido do cordão umbilical preservadas nos dias de hoje possam ser utilizadas com benefícios comprovados, aumentando a qualidade de vida de pessoas portadoras de doenças que presentemente carecem de cura.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Marcus, A.J. and D. Woodbury, Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(3): p. 730-42.
2. Burt, R.K., et al., Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. *Jama*, 2008. 299(8): p. 925-3.
3. Secco, M., et al., Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, 2008. 26(1): p. 146-50.
4. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8(4): p. 315-7.
5. Stenderup, K., et al., Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003. 33(6): p. 919-26.
6. Batsali, A.K., et al., Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013. 8(2): p. 144-55.
7. Nagamura-Inoue, T. and H. He, Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells*, 2014. 6(2): p. 195-202.
8. Weiss, M.L., et al., Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*, 2008. 26(11): p. 2865-74.
9. Castro-Manrreza, M.E. and J.J. Montesinos, Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*, 2015. 2015: p. 394917.
10. Pegg, D.E., Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*, 2007. 368: p. 39-57.
11. <http://www.crioestaminal.pt/tecnologia/>. acessado a 26 de julho de 2015].
12. <http://bebevida.com/pt/celulas-estaminais/criopreservacao/processo>. acessado a 26 de julho de 2015].
13. <http://www.crioestaminal.pt/solucoes-e-precos/>. acessado a 1 de setembro de 2015].
14. <http://bebevida.com/pt/adesao-ao-servico/precario>. acessado a 1 de setembro de 2015].
15. Martins, J.P., et al., Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. *Stem Cell Res Ther*, 2014. 5(1): p. 9.
16. <http://www.bebecord.pt/precos/>. acessado a 1 de setembro de 2015].
17. <http://www.criobaby.pt/planos-de-criopreservacao>. acessado a 1 de setembro de 2015].
18. <http://www.criovida.pt/servicos/>. acessado a 1 de setembro de 2015].
19. <http://www.cytothera.pt/precos.html>. acessado a 1 de setembro de 2015].
20. Santos Nascimento, D., et al., Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms. *Stem Cell Res Ther*, 2014. 5(1): p. 5.

21. Santos, J.M., et al., The role of human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells (UCX(R)) in the treatment of inflammatory arthritis. *J Transl Med*, 2013. 11: p. 18.
22. Wang, L., et al., Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. *Stem Cells Dev*, 2013. 22(24): p. 3192-202.
23. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02054208?term=neurostem&rank=2>. acessado a 15 de julho de 2015].
24. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01343511>. acessado a 19 de julho de 2015].
25. Lv, Y.T., et al., Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J Transl Med*, 2013. 11: p. 196.
26. Hu, J., et al., Long term effects of the implantation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from the umbilical cord for newly-onset type I diabetes mellitus. *Endocr J*, 2013. 60(3): p. 347-57.
27. Guan, L.X., et al., Therapeutic efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in patients with type 2 diabetes. *Exp Ther Med*, 2015. 9(5): p. 1623-1630.
28. Chang, Y.S., et al., Mesenchymal stem cells for bronchopulmonary dysplasia: phase I dose-escalation clinical trial. *J Pediatr*, 2014. 164(5): p. 966-972.e6.
29. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01632475>. acessado a 28 de junho de 2015].
30. Wu, K.H., et al., Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*, 2011. 91(12): p. 1412-6.
31. [http://www.infarmed.pt/infomed/download\\_ficheiro.php?med\\_id=6113&tipo\\_doc=fi](http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6113&tipo_doc=fi) acessado a 18 de julho de 2015].
32. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT02032446>. acessado a 18 de julho de 2015].
33. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01609283?term=mesenchymal+cells+mayo&rank=7>. acessado a 19 de julho de 2015].
34. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02034188>. acessado a 17 de junho de 2015].
35. Sun, L., et al., Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(8): p. 2467-75.