

Viabilidade de células-tronco autólogas do sangue de cordão umbilical para crianças com encefalopatia hipóxico-isquêmica.

C. Michael Cotten, MD, Amy P. Murtha, MD, Ronald N. Goldberg, MD, Chad A. Grotegut, MD, P. Brian Smith, MD, Ricki F. Goldstein, MD, Kimberley A. Fisher, PhD, Kathryn E. Gustafson, PhD, Barbara Waters-Pick, BS, MT (ASCP), Geeta Swamy K., MD, Benjamin Rattray, MD, Siddhartha Tan, MD, e Joanne Kurtzberg, MD

Caro Colega,

Nos últimos 30 anos, uma parcela significativa e crescente da comunidade científica em todo o mundo tem se dedicado a tentar compreender o que são, como funcionam e quais as potenciais aplicações terapêuticas das células-tronco (CTs). Tomando por base a utilização das CTs hematopoiéticas em terapias consagradas (como o transplante de medula óssea, por exemplo) até as controversas CTs embrionárias (CTEs), o número de ensaios voltados para o campo da medicina regenerativa atesta o futuro promissor das CTs

Neste contexto, preparamos uma versão em português de um estudo-piloto da Duke University, comandado pela Dra. Joanne Kurtzberg, mostrando que é possível e seguro utilizar células-tronco hematopoéticas do sangue do cordão umbilical para tratar crianças com paralisia cerebral. Graças aos resultados obtidos neste estudo inicial, um ensaio clínico mais amplo, randomizado e controlado, foi iniciado em junho de 2010.

Como dito pela própria pesquisadora, este estudo muito importante vai nos ajudar a saber se infusões do sangue do cordão umbilical da própria criança podem diminuir os sintomas de paralisia cerebral (PC). Embora existam muitas histórias sugerindo que o sangue do cordão possa ajudar crianças com PC, é essencial provar em um estudo randomizado se isso é verdade. Se este estudo mostrar que o sangue do cordão é benéfico, ele terá um enorme impacto sobre as práticas de coleta de sangue do cordão umbilical e armazenamento ao nascimento.*

Através do Stem Cell Review, a Cordvida vem mantendo seu compromisso com a atualização da comunidade médica na área de terapia celular, escolhendo alguns dos mais relevantes artigos científicos sobre terapias com células-tronco para compartilhar com nossos colegas.

Dr. Marlon Knabben de Souza, PhD

Diretor Médico

CordVida

*conforme informações publicadas em newsletter no site www.duke.edu

Objetivo

Avaliar a viabilidade e segurança do fornecimento de células de sangue do cordão umbilical autólogo (SCU) para recém-nascidos com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI).

Desenho do estudo

Recém-nascidos internados no berçário de cuidados intensivos que foram submetidos a terapia de resfriamento para EHI e que tinham SCU disponível foram incluídos em um estudo aberto de células de SCU autólogas, não-criopreservadas, com volume e número de células vermelhas reduzidos (até 4 doses de SCU ajustadas para o volume quantidade de células vermelhas, 1-5x10⁷ células/dose). Registramos as características da coleta do SCU e da infusão de células e os sinais vitais pré e pós-infusão. Como análises exploratórias, comparamos os resultados hospitalares dos receptores das células (mortalidade, alimentação oral na alta) e de sobrevida em 1 ano com Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil (3^a edição) em 3 parâmetros (cognitivo, linguagem e desenvolvimento motor) com os de crianças que não tinham células de SCU disponíveis.

Resultados

Vinte e três crianças foram submetidas à terapia de resfriamento e receberam células. A mediana dos volumes de coleta e de infusão foi de 36 e 4,3 mL, respectivamente. Os sinais vitais nas primeiras 48 horas pós-parto, incluindo a saturação de oxigênio, foram semelhantes antes e depois das infusões e os bebês submetidos somente à hipotermia apresentaram resultados hospitalares semelhantes. Treze (74%) das 18 crianças que receberam células e 19 (41%) dos 46 bebês submetidos somente à hipotermia com resultados de 1 ano conhecidos sobreviveram com escore superior a 85.

Conclusões

A coleta, preparação e infusão de células autólogas de SCU não-congeladas para uso em recém-nascidos com EHI são viáveis. Um estudo duplo-cego randomizado é necessário.

A hipotermia moderada melhora os resultados para recém-nascidos de termo e de curto pré-termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica (EHI) moderada ou grave, porém os principais estudos relatam que 30% das crianças submetidas à hipotermia morrem ou sobrevivem com deficiência. A alta prevalência de maus resultados fornece motivação para testar intervenções adicionais. A hipotermia atua na fisiopatologia relacionada à falha energética secundária, incluindo liberação de neurotransmissores excitatórios, apoptose e morte celular por continuidade. Intervenções adicionais podem se concentrar nesses mecanismos e também nas interações entre lesões, resposta a uma lesão e o desenvolvimento cerebral.

As células nucleadas de sangue de cordão umbilical (SCU) podem se diferenciar *in vitro* em células com características de neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia. Células

de SCU têm sido utilizadas com sucesso em milhares de transplantes alogênicos para câncer e doenças genéticas, inclusive em crianças com doença de Krabbe e síndrome de Hurler. Roedores recém-nascidos que receberam células de SCU humanas após lesão hipóxico-isquêmica obtiveram melhores resultados anatômicos e neurocomportamentais, provavelmente por causa dos efeitos parácrinos e tróficos durante as horas ou dias após a lesão, levando à especulação de que as células de SCU poderiam ser uma intervenção útil em bebês com EHI.

Nossa hipótese é que a infusão precoce de SCU autólogas, não-criopreservadas, com volume e número de células vermelhas reduzidos em crianças com EHI melhoraria os resultados, principalmente por via trófica e por mecanismos parácrinos. Para este fim, foi realizado um estudo-piloto de viabilidade e segurança de infusão precoce de SCU autólogas, não-criopreservadas, com volume e número de células vermelhas reduzidos, em crianças com EHI moderada ou grave. Nossos objetivos foram: (1) identificar os desafios de coordenar as várias disciplinas necessárias para coletar, preparar e infundir células nos primeiros dias após o nascimento, (2) caracterizar a qualidade das coleções SCU nos partos de alto risco, e (3) relatar a resposta celular dos receptores das infusões e seus resultados clínicos no momento da alta hospitalar e no primeiro ano de idade.

Métodos

Iniciamos este estudo-piloto em janeiro de 2009. Crianças internadas no berçário de cuidados intensivos Duke (UTI) eram elegíveis se estivessem pelo menos com 35 semanas de idade gestacional, com EHI e se preenchessem os critérios de terapia de resfriamento da UTI, que se baseia nos critérios de inclusão utilizados no ensaio de hipotermia da Rede de Pesquisa Neonatal do Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD). Os critérios para terapia de resfriamento estavam cumpridos se as crianças apresentassem resultados de gasometria do cordão ou sanguínea nas primeiras horas pós-natal com pH não superior a 7,0 ou déficit de base maior ou igual a -16. Se uma gasometria do sangue na primeira hora pós-parto não estivesse disponível ou se a gasometria do cordão ou do sangue na primeira hora pós-natal mostrasse pH entre 7,01 e 7,15 ou déficit de base estivesse entre -10 e -15, as crianças eram elegíveis. Além disso, elas também deveriam apresentar uma história de um evento perinatal agudo e tanto um índice de Apgar aos 10 minutos de 5 ou menos, quanto necessidade de ventilação com pressão positiva iniciada ao nascimento e que continuou por pelo menos 10 minutos. As crianças que atingiram os critérios foram então examinadas em seis parâmetros: nível de consciência, nível de atividade espontânea, tônus, postura, reflexos primitivos e função autonômica. Se 3 de 6 parâmetros estivessem anormais ou se a criança apresentasse convulsões, ela era tratada com terapia de resfriamento e estava elegível para o estudo, se houvesse células disponíveis.

A coleta de SCU para doação para bancos públicos ao Carolinas Cord Blood Bank (CCBB) no âmbito do Sistema de Saúde da Universidade Duke (DUHS) é realizada rotineiramente por equipe dedicada e treinada para coleta de SCU e é restrita a partos em que as mães consentiram por escrito previamente e que tiveram bebês de termo saudáveis. Se uma mãe de um doador do CCBB desse à luz a um bebê com sinais de EHI, a equipe do CCBB coletava o SCU utilizando os procedimentos-padrão, e este era redirecionado

do banco público e utilizado no nosso estudo, caso a criança doente fosse elegível e os pais consentissem com a participação no estudo. Para os partos em que o consentimento para a coleta no CCBP não tivesse sido obtido previamente, o conselho de revisão institucional do DUHS permitia a equipe obstétrica obter um consentimento verbal para coletar o SCU, se no período perinatal o obstetra considerasse que a criança poderia cumprir os critérios para terapia de resfriamento para EHI. Se as células estivessem disponíveis e a criança preenchesse os critérios para o resfriamento, os pais eram convidados a fornecer o consentimento informado por escrito para que a criança fosse incluída no estudo. O estudo foi aprovado pelo conselho de revisão institucional da Universidade Duke (DU).

O SCU era coletado assepticamente nas fases in utero ou ex utero em bolsas de coleta de SCU contendo 35 mL de anticoagulante citrato fosfato dextrose fornecidas pelo CCBP. As coletas de SCU foram realizadas por obstetras treinados, parteiras ou equipe de coleta do CCBP. A equipe de coleta estava presente em ambos os centros de parto do DUHS (Hospital da Universidade de Duke [DUH] e Hospital Regional Duke, um hospital afiliado aproximadamente a 5 milhas do DUH) durante os dias de semana, de 8 a 12 horas por dia. Os coletadores de SCU também estavam presentes em seis outros centros regionais não relacionados com o DUHS. O SCU coletado de bebês nascidos nestes centros era enviado juntamente com bebê no transporte ao DUHS.

O SCU coletado era transportado para o Laboratório de Células-Tronco da Duke (SCL) em temperatura ambiente em contêineres validados. Lá o SCU tinha o volume e o número de células vermelhas reduzidos após incubação por 20 a 30 minutos com Hespán a 6%, seguindo os procedimentos estabelecidos no CCBP, usando o sistema de processamento automatizado SEPAX 1 se a unidade contivesse mais que 30 mL de SCU ou manualmente se o volume da unidade fosse menor que 30mL. Os SCUs de volume e número de glóbulos vermelhos reduzidos foram colocados em um volume de 20,5 mL e aliqüotados em seringas de dose individual através de equipo de conexão e seringas previamente preenchidas com solução salina normal. Uma bolsa de armazenamento especial, com 4 portas de injeção sem agulha para retirar aliqüotas estéreis para até 4 doses, foi desenvolvida pela Biosafe para este estudo. A contagem de células nucleadas totais pré e pós-processamento, o conteúdo de células CD34+ pós-processamento, as unidades formadoras de colônia, a esterilidade e viabilidade celular foram avaliadas. As doses foram calculadas para conter de 1 a 5×10^7 células nucleadas, com não mais que 2 mL/kg de eritrócitos e uma dose-alvo não maior do que 2mL/kg/dose.

Todas as crianças foram resfriadas a 33,5°C por 72 horas. A equipe de estudo levava doses pré-medidas de células para a UTI em seringas identificadas pelo SCL. As infusões eram iniciadas quando as células e a equipe do estudo estivessem disponíveis para administração e monitoramento. Os recém-nascidos foram pré-medicados com hidrocortisona, 1 mg/kg EV, de 30 a 60 minutos antes da infusão. Os recém-nascidos receberam até 4 infusões de 1 a 5×10^7 células/kg, com a primeira dose logo que possível após o nascimento, e nas horas 24, 48, e 72 pós-natais. Se a primeira dose estivesse disponível após as primeiras 12 horas após o nascimento, o tempo de administração da dose foi ajustado para fornecer três infusões, durante as primeiras 72 horas pós-natais.

Após o lançamento da orientação final para o armazenamento de SCU em bancos públicos em 2011, a Food and Drug Administration (FDA) implantou uma exigência de regulamentação de todos os usos não-homólogos de SCU. Nesse sentido, nós apresentamos um pedido de investigação de nova droga (IND) para este estudo. Com a aprovação pela FDA do nosso pedido em julho de 2011, o protocolo foi modificado para proporcionar um máximo de 2 infusões de células frescas nas primeiras 48 horas pós-parto. Todas as infusões foram administradas na UTI da Duke. A identificação dos receptores e do material a ser infundido foi verificada duas vezes pela equipe de pesquisa e de enfermagem. As infusões foram monitoradas pela equipe de pesquisa e pelo corpo clínico. As células foram infundidas durante 15 a 20 minutos, seguidas por solução salina (1 a 2 mL) para limpar o acesso intravascular. As células não-utilizadas foram criopreservadas no SCL após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, em bolsa dupla de criopreservação. As células foram criopreservadas após resfriamento em velocidade controlada em nitrogênio líquido em tanques automatizados (Bioarchive) para armazenamento em longo prazo.

Análises Estatísticas

Foi utilizada estatística descritiva para caracterizar demograficamente os pacientes e as medidas de viabilidade, que incluíram volume de SCU coletado e tempo entre a coleta, preparo e infusão. Também se obtiveram a contagem de células nucleadas totais antes e depois da redução do volume e do número de glóbulos vermelhos, a viabilidade celular, a contagem de células CD34+, as unidades formadoras de colônias e a esterilidade de cada unidade. Por razões de segurança, comparamos os sinais vitais e a saturação de oxigênio no início do estudo e 15 minutos após a infusão usando testes de Wilcoxon. Também comparamos os resultados adversos, incluindo mortalidade, convulsões, desenvolvimento de hipertensão pulmonar, bem como os resultados de 1 ano em bebês incluídos no estudo com os de recém-nascidos admitidos na UTI tratados com terapia de resfriamento para EHI durante o mesmo período de tempo, mas que não possuíam células disponíveis.

Os resultados de neurodesenvolvimento em um ano foram avaliados utilizando a Escala Bayley de Desenvolvimento Infantil, 3ª edição (Bayley III), que inclui a avaliação das capacidades cognitivas, de linguagem e parâmetros de desenvolvimento motor (média=100, Desvio Padrão(DP)=15 para os 3 parâmetros). Foram comparados os escores Bayley III para receptores de células com os do grupo pareado tratado com hipotermia. Também comparamos a taxa de sobrevivência com os escores Bayley III observados no primeiro ano, iguais ou maiores do que 85 em todos os parâmetros. A fim de fornecer alguma comparação entre a gravidade da doença para os receptores de células e os bebês simultaneamente tratados com hipotermia, foi calculado um escore derivado da coorte do estudo hipotermia do NICHD, que fornece uma estimativa da probabilidade de gerar benefício com a terapia de resfriamento (score NICHD). A pontuação atribui valores para resultados de gasometria, postura, atividade espontânea, escore Apgar aos 5 minutos e presença de hipertensão materna crônica, hipertensão induzida pela gravidez, pré-eclâmpsia ou eclâmpsia. Usamos o teste exato de Fisher e o teste de soma de postos de Wilcoxon, conforme o caso. Além disso, utilizou-se a regressão logística multivariada para examinar as probabilidades de mortalidade para os receptores de células e os bebês pareados tratados com hipotermia, controlando para a pontuação NICHD.

Resultados

Entre 1º de janeiro de 2009 e 5 de junho de 2012, 23 crianças foram matriculadas, receberam as células, e estavam com idade igual ou superior a 1 ano. Durante o período de estudo, duas crianças que dispunham de células coletadas e foram submetidas à terapia de resfriamento para EHI tiveram a recusa dos pais em participar do estudo. Durante o período de estudo, 82 crianças não tiveram suas células coletadas e foram admitidas na UTI por causa de EHI, sendo submetidas à terapia de resfriamento. A única característica estatisticamente diferente entre os grupos foi a origem do paciente. Seis dos receptores de células nasceram no hospital afiliado à Duke, Hospital Regional Duke, o restante nasceu no DUH. Mais de 80% das crianças pareadas submetidas à terapia de resfriamento eram originadas de fora do DUH. Os pais de 5 crianças matriculadas haviam fornecido previamente o consentimento do doador do CCB. Dezoito (78%) pais forneceram a aprovação verbalmente para a coleta. Para as duas crianças que tinham SCU coletado, mas cujos pais recusaram a inclusão no estudo, o SCU foi descartado como lixo hospitalar.

Colaboração Multidisciplinar

Durante o primeiro ano do estudo, duas crianças foram matriculadas. Nove recém-nascidos no DUHS foram admitidos na UTI para terapia de resfriamento para EHI, mas não tinham SCU coletado. Após consulta com colegas da medicina materno-fetal (MMF) em fevereiro de 2010, foi implantada uma política que incluiu a consideração de coleta SCU no momento do parto para todas as “emergências obstétricas.” Para “emergências obstétricas” no DUH, o sistema de aviso estava programado para alertar todos os membros da equipe assistencial, incluindo as equipes de obstetrícia, neonatologia e anestesia.

A equipe de investigação da MMF rastreou as emergências obstétricas para confirmar que o SCU fosse coletado quando indicado e fez o seguimento com a equipe quando a coleta não acontecia. O instituto de investigação e o pessoal da MMF forneceram às equipes de trabalho de parto, nas saídas de troca de turno da enfermagem, lembretes diários sobre o estudo. Seu objetivo foi identificar os partos de alto risco, com os quais a equipe obstétrica estava preocupada, pois o quadro clínico pré-natal imediato poderia estar associado a uma criança que poderia ter EHI; e foi também lembrar o pessoal da coleta de SCU para o estudo. Kits de coleta foram colocados em todas as áreas de parto, salas cirúrgicas, bem como junto aos equipamentos de reanimação da neonatologia. No nosso hospital da comunidade, kits de coleta foram colocados nas salas cirúrgicas e atualizamos a equipe médica e de enfermagem sobre o estudo. Com estes esforços, entre fevereiro de 2010 e março de 2011, o SCU foi coletado em 64 partos de alto risco e 15 crianças receberam infusões para o estudo. Nenhuma criança elegível foi perdida.

Coleta de Sangue Cordão e Preparação para infusão

O volume de SCU coletado teve ampla variação (3 a 178 mL) e continha uma média de $4,8 \times 10^8$ células nucleadas totais. Em média, 85% das células foram recuperadas após o processamento. Com uma dose meta de 1 a 5×10^7 células/kg para cada infusão, 3×10^7 células teriam que estar disponíveis para uma criança de 3 kg ter uma infusão com a dose mais baixa permitida. Mesmo nas coletas com os volumes mais

baixos, os números de células eram adequados para pelo menos uma dose de células contendo o número-alvo. A viabilidade pós-processamento das unidades foi elevada. A quantidade de células CD34+ variou amplamente entre as unidades. O intervalo entre a coleta e a chegada à beira de leito para o início da infusão variou de 3,9 a 220 horas. Para as crianças internadas na UTI do DUH em dias de semana, quando o pessoal SCL estava presente, o tempo médio entre a coleta e o início da infusão foi de 6,5 horas (intervalo: 3,9 a 12 horas). Em 15 recém-nascidos (65%), as células excedentes foram criopreservadas para potencial uso futuro.

Segurança do Sangue de Cordão

Não foram observadas reações significativas à infusão. A frequência cardíaca, pressão arterial média e saturação de oxigênio não variaram significativamente antes e após as infusões para as 2 primeiras infusões. A média de saturação de oxigênio foi menor após a terceira infusão (96,5% contra 94,5% antes e após a infusão respectivamente, $p < 0,05$) e quarta infusão (98,4% contra 97,4% antes após a infusão respectivamente, $p < 0,05$). Um bebê, nascido a 35 semanas de gestação, apresentou pH do sangue de cordão igual a 6,72 e uma perfuração ileal espontânea antes da quarta infusão. Uma criança apresentou cultura de SCU positiva para *Escherichia coli*, que também estava presente na cultura de sangue da mãe. A hemocultura obtida da criança após o nascimento foi negativa, mas a criança recebeu 21 dias de ampicilina e cefotaxima. Em um bebê, uma das vias de administração de células foi ocluída minutos após o início da infusão, de modo que a administração foi interrompida. Infusões subsequentes para esta criança foram concluídas sem incidentes.

Comparação de desfechos hospitalares entre crianças que receberam células e crianças pareadas submetidas à terapia de resfriamento

A necessidade de suplementação de oxigênio por membrana extracorpórea foi semelhante para os receptores de células e crianças pareadas submetidas à terapia de resfriamento. Uma porção maior do grupo submetido à terapia de resfriamento recebeu alta hospitalar com prescrição de medicamentos anticonvulsivantes quando comparado às crianças que receberam células, mas essa diferença não foi significativa. Nenhum dos receptores de células morreu durante a hospitalização relacionada à EHI, em comparação com 11 mortes (13%) no grupo submetido à terapia de resfriamento. Esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Resultados em um ano

As características demográficas dos receptores de células e dos bebês pareados submetidos à terapia de resfriamento que sobreviveram e tinham resultados Bayley III em 1 ano foram semelhantes, exceto para a origem do paciente (32% entre as crianças que receberam células e 91% entre as crianças submetidas à terapia de resfriamento, $P < .001$). Dados sobre os resultados de sobrevida e escore Bayley III após 1 ano estavam disponíveis para 19 (82%) crianças que receberam células. Quatro (17%) crianças que receberam células não retornaram para o seguimento de 1 ano. O responsável principal de uma criança cuja família se mudou para outro estado afirmou que esta criança sobreviveu durante o primeiro ano pós-natal, mas não houve uma avaliação de Bayley III, deixando restar 18 crianças com dados sobre resultados de desenvolvimento

em 1 ano. Destas, 13 (72%) tiveram pontuação Bayley maior ou igual a 85 em todos os três parâmetros de teste. Duas crianças que receberam células morreram após a visita de acompanhamento de um ano. No primeiro ano, ambas estavam severamente comprometidas e não puderam ser avaliadas pelo escore Bayley III. Uma criança morreu aos 14 meses por pneumonia pelo vírus sincicial respiratório. Esta criança também foi diagnosticada com uma deleção do cromossomo 17p12, bem como com síndrome de Wolf-Parkinson-White. A outra criança que faleceu apresentava encefalopatia grave com resultante encefalomalácia cística. Ele foi diagnosticado com citomegalovírus na quinta semana pós-natal. Não foram encontradas cópias do citomegalovírus na unidade de sangue do cordão umbilical. Este bebê desenvolveu espasticidade infantil após a alta. Aos 14 meses, ele morreu em decorrência de gastroenterite aguda com choque hipovolêmico. Onze crianças do grupo submetido à terapia de resfriamento morreram antes da alta hospitalar em decorrência de complicações relacionadas à EHI. Os dados de sobrevivência e Bayley III estavam disponíveis em 46 (56%) destes 82 recém-nascidos. Das crianças avaliadas, dezenove (41%) apresentaram escores Bayley III de pelo menos 85 em todos os 3 parâmetros. Na regressão logística multivariada controlando para a pontuação NICHD, a razão de chances (OR) para mortalidade para pontuação Bayley III inferior a 85 para o grupo que recebeu células em comparação com o grupo que não recebeu foi 0,27 com um intervalo de confiança (IC) de 95% entre 0,08 e 0,92. Uma pontuação NICHD mais alta se associou a uma maior chance de morte ou a baixas pontuações Bayley III (OR 1,08; IC 95% 1,01-1,14).

Discussão

As informações obtidas a partir de nosso estudo fornecem evidências de que a coleta, preparação e infusão intravenosa de células de SCU autólogas, não-criopreservadas, com volume e número de células vermelhas reduzidos, nos primeiros dias pós-natais são viáveis e seguras, neste pequeno grupo. O estudo reforça a necessidade de colaboração multidisciplinar bem orquestrada para coletar, processar e infundir células de SCU a fim de tê-las disponíveis para crianças com EHI.

A maioria das unidades de SCU coletadas para este estudo não teria atingido o padrão exigido para a inclusão em bancos públicos. No entanto, dado o tamanho dos bebês para os quais foram coletadas células, números suficientes de células para a nossa dose-alvo foram recuperados a partir de todas as coletas de SCU, mesmo nas coletas de 3 mL. O sistema automatizado que utilizamos para o processamento de SCU pode ser colocado e utilizado em qualquer banco de sangue do hospital ou unidade neonatal, o que facilitou a participação das instituições no ensaio clínico. Se as células de SCU forem testadas em um grande estudo multicêntrico, a formação de prestadores obstétricos, incluindo a garantia de que mesmo as coletas de pequeno volume podem fornecer a dose-alvo, assim como colaborações estreitas relacionadas ao timing do pedido de consentimento para a coleta serão necessárias.

Evidências específicas para identificar os mecanismos celulares de como as células de SCU influenciam o resultado neurológico são escassas. Novas evidências sugerem que, além da falha de energia secundária e do período de reparo imediato, o qual é o alvo da terapia de resfriamento, a lesão hipóxico-isquêmica leva a semanas ou meses de reparo endógeno e ao desenvolvimento de novas vias funcionais. Três estudos com

células de SCU roedores de sete dias de vida, submetidos a hipóxia e ligadura unilateral de carótida, mostraram melhor resultado neurocomportamental. Existe evidência da entrada de células no sistema nervoso central (SNC), mas nenhum dos estudos sugere a persistência de células de SCU humano no SNC. Um estudo constatou ativação diminuída da caspase 3 na área circunjacente à lesão mais significativa, juntamente com uma possivelmente relacionada diminuição da ativação da micróglia e da infiltração de macrófagos. Em outro estudo, que combinou células com manitol, o fator de crescimento neural, o fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais e o fator neurotrófico derivado de cérebro estavam mais elevados nos que receberam células 3 dias após a infusão na área de maior dano, sugerindo um efeito parácrino.

Um estudo realizado em animais não mostrou benefício neurocomportamental ou bioquímico. No entanto, este estudo utilizou um centésimo da dose de células utilizada nos outros três experimentos. Em um trabalho subsequente, este mesmo grupo demonstrou uma melhor recuperação da memória espacial após o uso de uma dose 10 vezes maior do que em seus experimentos anteriores. Em recente trabalho com um modelo murino de lesão hipóxico-isquêmica no dia 7 após o nascimento, o transplante intraperitoneal ou intratecal de células de SCU humano 24 horas após a lesão acelerou a regressão dos eventos relacionados à ativação inflamatória da micróglia e reduziu a camada astrocitária perilesional associada a tais lesões. Este grupo também demonstrou que a administração intraperitoneal de células humanas de SCU 24 horas após lesão hipóxico-isquêmica em filhotes de rato resultou na redução da expressão da caspase-3, bem como em nível maior de fator neurotrófico derivado de cérebro e de fator de crescimento endotelial vascular, que poderiam reduzir a inflamação e a apoptose, e auxiliar na angiogênese pós-lesão.

Apesar de relatarmos resultados iniciais de infusões de células autólogas de SCU nos primeiros dias após o nascimento, outros pesquisadores relataram o uso de células de SCU em crianças com paralisia cerebral (PC). O Programa de Transplante de Medula da Duke realizou um estudo fase 1 de viabilidade e segurança de infusões de células autólogas de SCU em 184 crianças com doenças neurológicas adquiridas, com idades entre 6 dias e 9,5 anos. Setenta e seis por cento tinham paralisia cerebral. Nenhum resultado do desenvolvimento neurológico foi formalmente avaliado, mas as infusões foram viáveis e seguras. Três pacientes apresentaram reações à infusão, todas responsivas à terapia médica e à interrupção da infusão. Na Universidade Duke um estudo domo de infusões de células autólogas em crianças com paralisia cerebral espástica, que inclui seguimento dos resultados do desenvolvimento neurológico, neuromotor, neurofisiológico e acompanhamento com imagens está recrutando pacientes (ClinicalTrials.gov: NCT01147653). Papadopoulos et al relataram transfusão de células de SCU autólogo sem danos aparentes em duas crianças com diplegia espástica, juntamente com injeções de fator estimulador de colônia de granulócitos. Eles notaram alguma melhora na função nos anos seguintes à infusão das células. Investigadores coreanos relataram resultados de 96 indivíduos, com idades entre 10 meses e 10 anos, com a paralisia cerebral, que receberam células de SCU alogênico compatíveis em menos de 4 dos 6 tipos de antígenos leucocitários e eritropoetina, ou eritropoetina isoladamente, ou placebo. Os receptores de células de SCU receberam ciclosporina por 3 semanas após a infusão. Embora todos os grupos apresentassem melhora nas medidas funcionais ao

longo do tempo, as crianças que receberam células obtiveram escores significativamente mais altos em testes funcionais e de desenvolvimento 6 meses após a intervenção do estudo. O estudo coreano sugere um potencial papel para o transplante alogênico. De acordo com a Rede Mundial para Transplante de Medula Óssea, uma associação global de registros de doadores e de bancos de sangue do cordão umbilical, mais de 2 milhões de unidades de células nucleadas de SCU foram coletadas em bancos públicos e privados. Se as células de SCU provarem ser benéficas para o tratamento em recém-nascidos e crianças pequenas de lesões cerebrais adquiridas, o desenvolvimento de um produto alogênico “off-the-shelf”, com imunossupressão adequada, tornaria a intervenção baseada em células de SCU disponível para todos os recém-nascidos e crianças que necessitam de terapia.

As doses utilizadas no nosso estudo-piloto foram baseadas no intervalo de doses atualmente utilizadas e para as quais se demonstrou eficácia no transplante alogênico após quimioterapia mieloablativa. A dose eficaz para o cenário autólogo não é conhecida e pode ser maior ou menor do que a utilizada no transplante alogênico. As variações observadas nos números de unidades formadoras de colônias hematopoéticas e de células CD34 + podem ser um indicador das células que podem ter influência sobre a eficácia, mas com os vários tipos de células progenitoras existentes no SCU, utilizar um único tipo de célula para indicar a potencial eficácia de reparação neurológica não tem evidência conhecida ou não seria praticável neste momento. Donega demonstrou melhores resultados com doses mais elevadas de células mesenquimais em camundongos de nove dias de idade com lesão hipóxico-isquêmica. Estudos com doses similares são necessários para as células de SCU.

Embora possa haver alguma vantagem teórica das vias alternativas de administração, neste momento, para minimizar o risco em nosso estudo, optamos por utilizar a via intravenosa (IV). A administração IV pode resultar em células sendo retidas em outros órgãos tais como os pulmões, ou em outros órgãos com lesão hipóxico-isquêmica, tais como o fígado, rim e coração; muito embora estas células (tais quais as células mesenquimais) enquanto permanecerem nestes locais, ainda possam produzir fatores que facilitam a resposta ótima após a lesão. Donega utilizou a administração intranasal. A administração intratecal de células derivadas de SCU e de células mesenquimais de medula óssea autóloga em crianças com PC já foi relatada.

O momento da infusão de células também é uma questão importante. Optamos por concentrar as infusões nas primeiras 72 horas pós-parto porque os estudos em animais sugerem que o tratamento neonatal próximo ao momento da lesão fornece bons resultados, mas foram notados benefícios mesmo com combinações de infusões desde as primeiras horas até 7 dias após a lesão. Em um modelo murino de lesão hipóxico-isquêmica neonatal, um estudo com a variação de doses e do momento da infusão bem delineados descobriu que a dosagem intranasal entre 3 e 10 dias após a lesão melhorou os resultados, mas a dosagem aos 17 dias pós-lesão apresentaram um efeito mínimo. No nosso estudo, a infusão precoce impediu a exposição dos recém-nascidos ao DMSO que é utilizado no processo de criopreservação. Dada a fase latente de lesão e reparação, talvez a dosagem após a terapia de resfriamento utilizando células descongeladas e lavadas (para minimizar a exposição ao DMSO) possa ser útil. Esta prática já foi

demonstrada como segura no estudo em paralisia cerebral com infusão autóloga de células descongeladas e lavadas.

O estudo de células do SCU para lesões neurológicas também deve abordar as numerosas falsas alegações e resultados perigosos de “terapias celulares”. O FDA começou a licenciar em 2012 os bancos públicos de sangue de cordão que fornecem unidades de SCU para transplantes alogênicos. O uso de sangue do cordão umbilical autólogo atualmente não é regulamentado de forma semelhante, mas todo o uso não homólogo de células para fins diferentes daqueles aprovados pela FDA deve ser estudado sob a autorização de investigação de novas drogas (IND), a qual obtivemos para este estudo.

Embora nosso estudo tenha fornecido informações úteis para planejar os próximos ensaios de fases posteriores, reconhecemos que o nosso grupo de comparação para a fase intra-hospitalar e para o primeiro ano de evolução não é um grupo-controle ideal. A maior prevalência de nascimentos no centro terciário entre as crianças que receberam células pode ser um indicador de que receberam um cuidado perinatal imediato e mais intensivo e iniciaram a terapia de resfriamento mais precocemente do que as crianças admitidas de fora. Além disso, a nossa taxa de seguimento entre as crianças pareadas para a terapia de resfriamento foi baixa, o que pode se dever em parte ao fato de que estas crianças provavelmente nasceram em centros mais distantes, o que pode ter dificultado seu retorno para as avaliações de acompanhamento e para os testes de desenvolvimento ao 1 ano. Dito isto, é importante notar que em uma meta-análise de 3 dos ensaios principais sobre hipotermia, as taxas de sobrevivência de 2 anos sem paralisia cerebral e com índice de desenvolvimento mental superior a 84, índice de desenvolvimento psicomotor superior a 84 e visão e audição normais medidas aos 2 anos variaram de 25% a 43% nos grupos submetidos à hipotermia, semelhante ao observado em nossa coorte pareada submetida ao resfriamento com seguimento de 1 ano disponível.

A coleta, preparação e infusão de SCU autólogo não congelado para o uso em recém-nascidos com EHI é viável, exigindo uma ampla cooperação entre as lideranças e os colaboradores da UTI, do banco de sangue de cordão umbilical e da maternidade. As infusões não causaram problemas clinicamente significativos e atribuíveis às células infundidas. Um estudo randomizado de fase II para fornecer mais informações sobre segurança, viabilidade e eficácia, com um maior número de instituições, é recomendado.