



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
L Instituto de Ciências da Saúde

**INFLUÊNCIA DOS FACTORES OBSTÉTRICOS E DO VOLUME INICIAL DE SANGUE DO CORDÃO
UMBILICAL NA CONTAGEM DE CÉLULAS CD34⁺**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública:
Especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia

por

Iolanda Margarida de Oliveira Grenha

Setembro 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

Instituto de Ciências da Saúde

INFLUÊNCIA DOS FACTORES OBSTÉTRICOS E DO VOLUME INICIAL DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL NA CONTAGEM DE CÉLULAS CD34⁺

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública:
Especialidade em Hematologia e Imunohemoterapia

Por Iolanda Margarida de Oliveira Grenha

Sob orientação de Mestre Sandra Cristina Ribeiro Tafulo

e Professor Doutor Elísio Costa

Setembro 2012

ABSTRACT

Placenta's blood contains hematopoietic stem cells capable of reconstituting long-term hematopoiesis when transplanted after myeloablative conditioning. Some studies have demonstrated that the quality of the cord blood units can be influenced by many obstetric factors and by those who make the harvest. The CD34⁺ cell count, total number of nucleated cells and cord blood's volume are determining variables as acceptance criteria for bank of umbilical cord cells.

The aim of this work is to evaluate the influence of obstetrics factors and the initial cord blood's volume in CD34⁺ cell count.

This study used data from 179 samples of umbilical cord blood cryopreserved in LusoCord - North Histocompatibility Centre between April and October 2010. The harvest of umbilical cord blood was performed by two methods: *in utero* or *ex utero*. The processing of these samples was constituted: by monitoring the gathered volume, WBC count and total nucleated cell (TNC) count, volume reduction before cryopreservation, CD34⁺ cell count by flow cytometry following the ISHAGE protocol and the measurement of the viability resorting to the nucleic acid marker *7-amino-actinomycin D*.

We found a significant statistically correlation between the initial volume of the unit and between the final TNC value. There was also a correlation between the total number of CD34⁺ cells and maternal age. There was a significant statistically correlation between the weight of the babies and the initial volume.

It can be concluded that obstetric factors and initial volume interfere with CD34⁺ cells count. A higher initial volume is associated with a greater TNC and greater number of CD34⁺ cells. CD34⁺ cell count is higher in younger mothers. The umbilical cord blood of heavier infants resulted in a higher initial volume.

RESUMO

O sangue da placenta contém células estaminais hematopoéticas capazes de reconstituir a hematopoiese a longo prazo, quando transplantadas após condicionamento mieloablativo. Alguns estudos têm demonstrado, que a qualidade das unidades de sangue do cordão umbilical pode ser influenciada por muitos factores obstétricos e pela experiência de quem realiza a colheita. A contagem de células CD34⁺, o número total de células nucleadas e o volume de sangue do cordão umbilical são variáveis determinantes como critérios de aceitação para o banco de células do cordão umbilical.

O objectivo deste trabalho é avaliar a influência dos factores obstétricos e do volume inicial de sangue do cordão umbilical na contagem de células CD34⁺.

Neste estudo foram utilizados dados relativos a 179 amostras de sangue do cordão umbilical criopreservadas no LusoCord - Centro de Histocompatibilidade do Norte entre Abril e Outubro de 2010. A colheita do sangue do cordão umbilical realizou-se por dois métodos: *in útero* ou *ex útero*. O processamento destas amostras foi constituído: pela verificação do volume colhido, pela contagem de leucócitos e de células nucleadas totais (TNC), pela redução de volume antes da criopreservação, pela contagem de células CD34⁺ por citometria de fluxo seguindo o protocolo ISHAGE e pela determinação da viabilidade, recorrendo-se ao marcador de ácidos nucleicos 7-amino-actinomicina D (7-AAD).

O valor de TNC foi superior no parto vaginal. Existe correlação estatisticamente significativa entre o número de células CD34⁺ totais e o volume inicial. Encontramos correlação estatisticamente significativa entre o volume inicial da unidade e entre o TNC final. Verificou-se ainda, correlação entre o número de células CD34⁺ totais e a idade materna. Verificou-se correlação estatisticamente significativa entre o peso dos bebés e o volume inicial.

Pode concluir-se que os factores obstétricos e o volume inicial interferem com a contagem de células CD34⁺. Um volume maior inicial está associado a um maior TNC e maior número de células CD34⁺. A contagem de células CD34⁺ é superior em mães mais jovens. O sangue do cordão umbilical de bebés mais pesados resultou num volume inicial superior.

Agradecimentos

Para a realização desta dissertação foram vários os intervenientes que colaboraram directa e indirectamente, os quais merecem o meu reconhecimento e gratidão.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Elísio Costa e Mestre Sandra Cristina Ribeiro Tafulo, pela dedicação, empenho e disponibilidade com que direccionaram e acompanharam esta dissertação, assim como pelos comentários e sugestões.

À Dr^a Helena Alves, directora do Centro de Histocompatibilidade do Norte por facultar a recolha de dados, o acesso a artigos e pela disponibilidade para auxiliar na realização desta dissertação.

Aos funcionários do Centro de Histocompatibilidade do Norte pela simpatia e ajuda prestada sempre que necessário.

Finalmente, de modo especial, quero agradecer aos meus pais e ao meu marido, pela compreensão, apoio incondicional, incentivo e motivação imprescindíveis para a efectivação deste trabalho.

É a todos que dedico este trabalho.

Lista de Abreviaturas

BMDW	<i>“Bone Marrow Donors Worldwide”</i> (Dadores de Medula Óssea Mundial)
CHN	Centro de Histocompatibilidade do Norte
CEDACE	Centro Nacional de Dadores de Células de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue do Cordão
DMSO	<i>“Dimethyl sulfoxide”</i> (Dimetilsulfóxido)
DNA	<i>“Deoxyribonucleic Acid”</i> (Ácido desoxirribonucleico)
ELISA	<i>“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”</i> (Ensaio imunoenzimático)
FTA-ABS	<i>“Fluorescent Treponemal Antibody-Absorption”</i> (Absorção por fluorescência do anticorpo Treponema)
GVHD	<i>“Graft Versus Host Disease”</i> (Doença do enxerto contra hospedeiro)
HLA	<i>“Human Leukocyte Antigen”</i> (Antigénio leucocitário humano)
HSC	<i>“Hematopoietic Stem Cells”</i> (Células estaminais hematopoiéticas)
IBMTR	<i>“International Bone Marrow Transplant Registry”</i>
ISHAGE	<i>“International Society for Hemotherapy and Graft Engineering”</i>
FITC	<i>“Fluorescein Isothiocyanate”</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
PCR	<i>“Polymerase chain reaction”</i> (Reacção em cadeia pela polimerase)
PE	<i>“Phycoerythrin”</i> (Ficoeritrina)
SCU	Sangue do cordão umbilical
SPSS	<i>“Statistical Package for Social Science”</i>
TNC	<i>“Total Nucleated Cells”</i> (Células nucleadas totais)
VDRL	<i>“Venereal Disease Research Laboratory”</i> (Laboratório de pesquisa de doenças venéreas)
WBC	<i>“White Blood Cells”</i>
7-AAD	<i>“7-amino-actinomycin D”</i> (7-amino-actinomicina D)

Índice Geral

ABSTRACT.....	II
RESUMO	III
Índice Geral	VI
Índice de Figuras	VIII
Índice de quadros e tabelas	IX
1 - Introdução.....	1
1.1. Hematopoiese.....	2
1.2. Células estaminais	5
1.3. Transplante de células estaminais	8
1.3.1. Transplante de células estaminais do sangue periférico	8
1.3.2. Transplante de medula óssea	10
1.3.3. Transplante de sangue do cordão umbilical	11
1.3.3.1. Critérios de doação	17
1.3.3.2. Uso autólogo e alogénico do sangue do cordão umbilical.....	18
1.3.3.3. Aplicações e potencial terapêutico	20
1.3.3.4. Transplante de sangue do cordão umbilical vs. Transplante de medula óssea..	21
1.3.3.5. Avaliação da qualidade das unidades de sangue do cordão umbilical	24
1.3.3.5.1. Colheita da amostra	24
1.3.3.5.2. Testes de controlo de qualidade.....	25
1.3.3.5.3. Processamento da amostra.....	28
1.3.3.5.3.1. Métodos de redução de volume	28
1.3.3.5.3.2. Criopreservação	29
2 – OBJECTIVOS	31
3 - MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Metodologia	34
3.1.1. Amostras de sangue do cordão umbilical	34
3.1.2. Colheita do sangue do cordão umbilical	34

3.1.3. Processamento das amostras	34
3.1.3.1. Redução do volume das amostras pelo método <i>Sepax</i> da <i>Biosafe</i> ®	35
3.1.3.2. Imunofenotipagem das células CD34 ⁺	37
3. 1. 4. Análise estatística	38
4 - RESULTADOS	40
4.1. Caracterização da amostra por género	42
4.2. Caracterização da amostra por tipo de parto	42
4.3. Caracterização da amostra por tempo de gestação	44
5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	46
6 - BIBLIOGRAFIA.....	51

Índice de Figuras

Fig. 1 - Localização tecidual da hematopoiese em várias fases do desenvolvimento pré e pós-natal nos seres humanos.....	3
Fig. 2 - Linhagens hematopoiéticas de diferenciação.	4
Fig. 3 - Número total de potenciais dadores de células estaminais por ano.	7
Fig. 4 - Prevalência de transplantes de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas (dados dos Estados Unidos da América).	9
Fig. 5 - Mobilização de células estaminais da medula óssea para a periferia, por acção do G-CSF	10
Fig. 6 – Estrutura génica do MHC humano, identificando os genes HLA de Classe I (HLA-A, B e C), de Classe II (HLA-DR, DQ e DP) e os de Classe III.	11
Fig. 7 - Representação figurativa da qualidade do inventário internacional de sangue do cordão (400 000 unidades de 107 bancos de sangue de cordão de acordo com a www.bmdw.org) e de aptidão para o transplante de adultos e pediátrico.....	14
Fig. 8 - Distribuição Mundial de unidades de Sangue do Cordão umbilical em bancos públicos.	16
Fig. 9 - Registo de Dados <i>Eurocord</i> : número de Transplantes autólogos e alogénicos de sangue do cordão umbilical.....	20
Fig. 10 - Incidência cumulativa de recuperação de neutrófilos após transplante de Medula Óssea e de Sangue do Cordão Umbilical.....	21
Fig. 11 - Prevalência de transplantes em crianças com idade inferior a 18 anos de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas.....	23
Fig. 12 - Estratégia de <i>gates</i> (janelas) sequenciais <i>Trucount-ISHAGE</i> com FITC anti-CD45, PE anti-CD34 e 7-AAD em sangue do cordão umbilical.	27
Fig. 13 - Saco inicial onde é recolhida a amostra de sangue do cordão umbilical e onde é conectado o kit.....	35
Fig. 14 - Esquema do kit <i>Biosafe</i> ® CS-530.	36
Fig. 15 - Processo de separação celular do sangue do cordão umbilical.	36
Fig. 16 - Exemplo da análise por citometria de fluxo realizada numa amostra de sangue do cordão umbilical.....	38
Fig. 17 - Distribuição das unidades de sangue do cordão umbilical consoante o peso dos possíveis receptores.....	41
Fig. 18 - Número de células nucleadas totais, por tipo de parto.	43
Fig. 19 - Percentagem de unidades de sangue do cordão umbilical por tempo de gestação. ...	44
Fig. 20 - Distribuição do peso do bebé pelo tempo de gestação.	44

Índice de tabelas

Tabela 1 - Reguladores com acção estimulante ou potenciadora na proliferação das células hematopoiéticas.....	5
Tabela 2 - Número de potenciais dadores adultos em Portugal no registo <i>Bone Marrow Donors Worldwide</i>	8
Tabela 3 - Indicações para transplante autólogo e alogénico de células estaminais.	19
Tabela 4 - Vantagens e desvantagens da utilização de células estaminais do sangue do cordão umbilical.	22
Tabela 5 - Análises realizadas ao sangue materno e ao sangue do cordão umbilical.	25
Tabela 6 - Relação entre o sexo e os parâmetros analisados.	42
Tabela 7 - Relação entre o tipo de parto e os parâmetros analisados.....	43

1 - Introdução

1.1. Hematopoiese

O processo pelo qual as células sanguíneas crescem, dividem-se e sofrem diferenciação na medula óssea é denominado hematopoiese. São produzidos três tipos gerais de células: (1) os eritrócitos, responsáveis pelo transporte de oxigênio; (2) as plaquetas, responsáveis pelo controlo hemorrágico e (3) os leucócitos, cuja grande maioria está envolvida na defesa do hospedeiro. As três classes de células resultam da maturação das células estaminais hematopoiéticas (HSC) pluripotentes, que residem na medula óssea e possuem a capacidade de produzir todos os diferentes tipos de células sanguíneas maduras em condições apropriadas (Imboden, 2004).

Nas primeiras semanas da gestação, o saco vitelino é o principal local de hematopoiese. A partir das primeiras seis semanas até aos seis a sete meses de vida fetal, o fígado e o baço são os principais órgãos envolvidos que produzem células sanguíneas até cerca de duas semanas após o nascimento. A medula óssea é o local mais importante a partir dos seis a sete meses de vida fetal e durante a infância. No período de lactação, toda a medula óssea é hematopoiética, mas durante a infância há substituição progressiva das células da medula por gordura nos ossos longos, de modo que a medula hematopoiética no adulto é confinada ao esqueleto central e às extremidades do fémur e do úmero (Fig.1) (Imboden, 2004).

Na vida adulta a medula óssea é a única fonte de novas células sanguíneas. As células em desenvolvimento estão situadas fora da cavidade medular óssea, enquanto as maduras são libertadas nos espaços sinusais e na microcirculação medular e a partir daí na circulação geral (Hoffbrand, 2004).

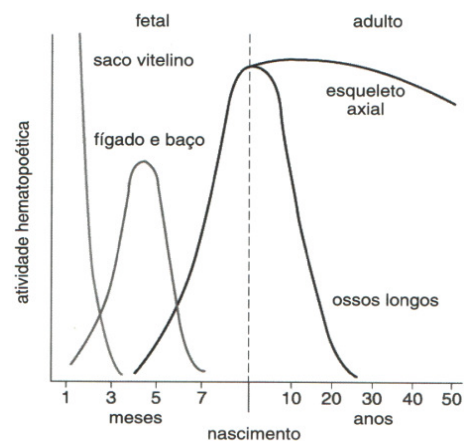


Fig. 1 - Localização tecidual da hematopoiese em várias fases do desenvolvimento pré e pós-natal nos seres humanos. Adaptado de: (Imboden, 2004).

As células estaminais hematopoiéticas (HSC) são células de autorrenovação: quando proliferam, pelo menos algumas das células-filhas permanecem como HSC, de modo que não ocorre depleção do reservatório de células estaminais. Entretanto, as outras células-filhas das HSC podem comprometer-se em qualquer uma das várias vias alternativas de diferenciação que levam à produção de um ou mais tipos específicos de células sanguíneas (Fig. 2) (Imboden, 2004).

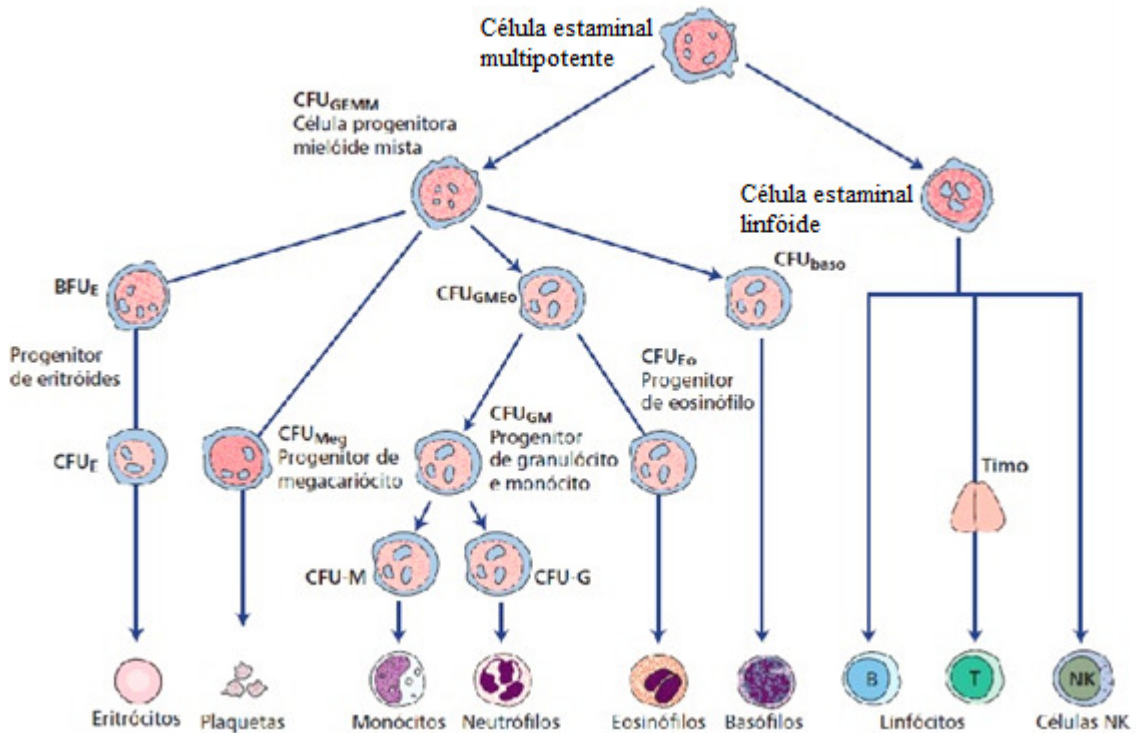


Fig. 2 - Linhagens hematopoiéticas de diferenciação.

Várias células progenitoras podem ser identificadas por cultura em meio semi-sólido pelo tipo de colônia que formam. **Baso** – basófilo; **BFU** – *burst-forming units*; **CFU** – unidade formadora de colônia; **E** – eritróide; **Eo** – eosinófilo; **GEMM** – granulócito, eritrócito, monócito e megacariócito; **GM** – granulócito, monócito; **Meg** – megacariócito; **NK** – *natural killer*. **Adaptado de:** (Hoffbrand, 2004).

Uma via típica de diferenciação envolve vários ciclos de divisão celular (cinco ou mais) e ocorre em estádios, com as células em cada uma dessas fases adquirindo progressivamente características de determinado tipo celular maduro e perdendo a capacidade de formar qualquer outro tipo. Como a progressão ao longo dessas vias está associada à divisão celular, as formas mais maduras ultrapassam acentuadamente o número dos seus precursores menos diferenciados. Entretanto, à medida que as células se diferenciam, a sua capacidade de replicação e auto-renovação declina. Com efeito, a maioria dos tipos de células hematopoiéticas perde por completo a sua capacidade de replicação ao atingir o estágio de células totalmente maduras, sendo então consideradas células de diferenciação terminal (Imboden, 2004).

A hematopoiese é regulada por citocinas e factores de transcrição. A partir de estudos *in vitro* foram identificados vários factores reguladores (Quadro 1) que têm a capacidade de estimular ou potenciar a proliferação de células hematopoiéticas nas

diferentes linhagens (Zon, 2001). Os factores de crescimento hematopoiético são hormonas glicoproteicas que regulam a proliferação e a diferenciação das células progenitoras hematopoiéticas e a função das células sanguíneas maduras. Os efeitos biológicos dos factores de crescimento são mediados por receptores específicos nas células-alvo, podendo agir no local onde são produzidos por contacto célula a célula, circular no plasma ou ligar-se na matrix extracelular, formando nichos aos quais aderem as células estaminais e progenitoras. Os linfócitos T, os monócitos (e macrófagos) e as células do estroma são as principais fontes de factores de crescimento, com excepção da eritropoetina, da qual 90% é sintetizada a nível renal, e da trombopoietina, que é sintetizada principalmente a nível hepático. Antígenos e endotoxinas activam os linfócitos T e macrófagos que libertam interleucina-1 (IL-1) e factor de necrose tumoral (TNF) que estimulam outras células, incluindo células endoteliais, os fibroblastos, outras células T e macrófagos que produzem factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), G-CSF, M-CSF, IL-6, além de outros factores de crescimento numa rede interactiva (Tabela 1) (Hoffbrand, 2004).

Tabela 1 - Reguladores com acção estimulante ou potenciadora na proliferação das células hematopoiéticas.

Células	Reguladores
Neutrófilos	G-CSF, GM-CSF, IL-3, M-CSF, SCF, IL-6
Macrófagos	M-CSF, GM-CSF, IL-3
Eosinófilos	IL-5, GM-CSF, IL-3
Megacariócitos	TPO, IL-3, IL-6, SCF, LIF, IL-11, EPO
Eritrócitos	EPO, IL-3, SCF
Mastócitos	IL-3, SCF
Linfócitos T	IL-2, SCF, FL
Linfócitos B	IL-7, SCF, IL-5, IL-2, FL

G-CSF= factor estimulador da colónia granulocítica; GM-CSF= factor estimulador da colónia granulocítica/macrofágica; IL-3= Interleucina 3, etc; M-CSF= factor estimulador da colónia macrofágica; SCF= factor das células estaminais; TPO= trombopoietina; LIF= factor inibidor da leucemia; EPO= eritropoietina; FL= ligando flk-2. **Adaptado de:** (Zon, 2001).

1.2. Células estaminais

As células estaminais são capazes de auto-replicação e diferenciação num ou vários tipos de células. Foram identificados dois tipos de células estaminais: células estaminais embrionárias na massa celular interna do embrião e as células estaminais adultas em tecidos específicos do adulto: medula óssea, sangue, córnea, retina, pele,

músculos esqueléticos, polpa dentária, fígado e cérebro. Como as células estaminais adultas podem propagar-se em grandes quantidades, sem perder a sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos de tecidos, elas representam um recurso altamente valioso para o desenvolvimento de terapias celulares (Myoung, 2010).

Todas as células estaminais, independentemente de sua origem, possuem três características que as distinguem: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) capacidade indefinida de divisão e autorrenovação; c) capacidade de diferenciação em células especializadas quando submetidas a certas condições fisiológicas ou experimentais. As células estaminais podem ser classificadas, em função da sua origem como: embrionárias e não-embrionárias e pela sua capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes resultam da divisão celular do óvulo fertilizado e podem dar origem a qualquer tipo de célula ou de tecido que compõe o embrião, bem como a estruturas embrionárias anexas que o sustentam durante seu desenvolvimento uterino. A divisão das células totipotentes resulta na formação das células pluripotentes, que são um pouco limitadas na sua diferenciação quando comparadas às células totipotentes. À medida que as células pluripotentes se especializam, passam a constituir tecidos específicos e o seu potencial passa a ser mais restrito, dizendo-se então multipotentes ou células estaminais adultas, cuja função é a reparação e manutenção tecidual (Silva Junior, 2009).

A capacidade de diferenciação das células estaminais em diferentes tipos de células pode desempenhar um papel importante na revolução da medicina, uma vez que podem ajudar a melhorar o tratamento actual de várias doenças e fornecer tecidos funcionais para reparar ou até mesmo substituir tecidos doentes (Ali, 2010).

Schofield identificou as primeiras células estaminais da medula óssea, as células estaminais hematopoiéticas (Larsen, 2007).

O sangue do cordão umbilical pode ser considerado como uma das fontes mais abundantes de células estaminais para transplante, tendo em conta que a taxa de natalidade global é superior a 200 milhões por ano. Além disso, o sangue do cordão umbilical pode ser armazenado e congelado em bancos de sangue do cordão umbilical para posterior utilização. Muitos bancos de sangue do cordão umbilical têm sido criados no Reino Unido, França e muitos outros países em todo o mundo (Ali, 2010).

Contudo, cerca de metade das unidades de sangue de cordão colhidas e destinadas a bancos de sangue do cordão umbilical, não são criopreservadas para potencial uso no transplante, devido ao baixo volume de amostra colhido (Ballen, 2005). No Banco de células estaminais público português, LusoCord, foi possível observar que o motivo mais comum para a não criopreservação das amostras, é de facto o volume insuficiente (dados não publicados).

O número de potenciais doadores de células estaminais têm aumentado ao longo dos anos. Na figura 3, pode observar-se a evolução do número total de potenciais doadores de células estaminais inscritos em lista a nível mundial, desde ano 1989 até 2012:

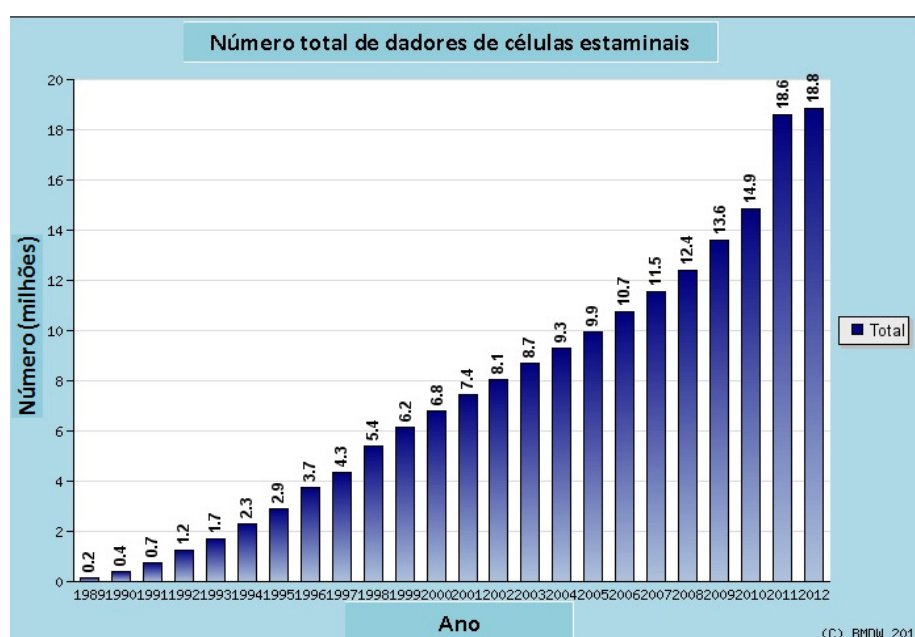


Fig. 3 - Número total de potenciais doadores de células estaminais por ano.

Adaptado de: http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics_stemcell.

O Registo Português de doadores voluntários de medula óssea, designado de Centro Nacional de Doadores de Células de Medula Óssea, Estaminais ou de Sangue do Cordão (CEDACE) é membro do registo mundial de doadores, *Bone Marrow Donors Worldwide* (Tabela 2). O Centro de Histocompatibilidade do Norte (CHN) é um dos três centros de Histocompatibilidade que existem em Portugal e que têm contribuído para o Registo Português.

Tabela 2 - Número de potenciais dadores adultos em Portugal no registo *Bone Marrow Donors Worldwide*.

Registo	Total	ABDR	%ABDR	Classe DNA I	Classe DNA II	Data do último ficheiro
Portugal	300,525	298,268	99.2	299,974	297,913	07-02-2012

ABDR – HLA-A, B e DR. **Adaptado de:** http://www.bmdw.org/index.php?id=number_donors0&no_cache=1.

1.3. Transplante de células estaminais

O transplante de células hematopoiéticas é um procedimento que envolve a eliminação total ou parcial dos sistemas hematopoiético e imunológico de um indivíduo por quimioterapia e/ou radiação e sua substituição por alotransplante (células hematopoiéticas de outro indivíduo) ou por autotransplante (células estaminais previamente colhidas ao próprio) (Gisselø, 2002).

1.3.1. Transplante de células estaminais do sangue periférico

As células inicialmente usadas em transplantação alogénica foram células colhidas da medula óssea e posteriormente, a partir dos anos 90, as células do sangue periférico. Actualmente, as células estaminais do sangue periférico apresentam uma maior frequência de utilização terapêutica nos Estados Unidos da América (Figura 4).

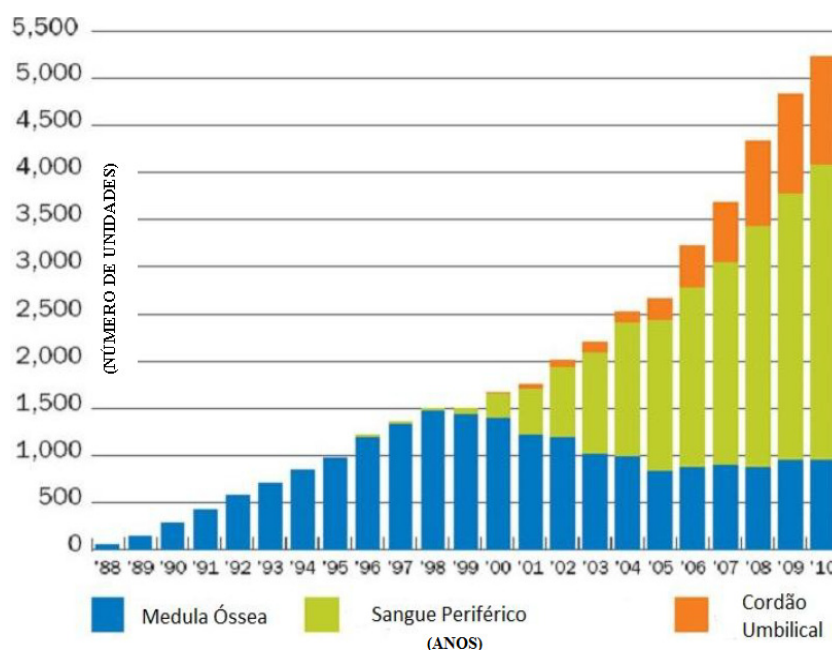


Fig. 4 - Prevalência de transplantes de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas (dados dos Estados Unidos da América). Adaptado de: www.cordblood.com.

Pode realizar-se alotransplante ou auto-transplante de células estaminais do sangue periférico.

A colheita das células estaminais do sangue periférico é realizada por uma máquina separadora de células conectada ao doente por via periférica. O sangue é bombeado para a máquina, onde ocorre a colheita de células mononucleares por centrifugação para um saco, antes que os eritrócitos sejam reinfundidos no doente (Hoffbrand, 2004).

O sangue periférico normalmente contém um pequeno número de células estaminais hematopoiéticas, quantidade insuficiente para a realização do transplante. A administração prévia de factores de crescimento pode aumentar o número de células progenitoras circulantes. O factor de crescimento mais usado para a mobilização de células estaminais (Fig. 5) é o factor estimulante de colónia de granulócitos (G-CSF) que pode ser administrado a doentes ou dadores em injeções subcutâneas (tipicamente 10µg/Kg/dia durante quatro a seis dias), até que a contagem de células nucleadas totais e células CD34⁺ aumente.

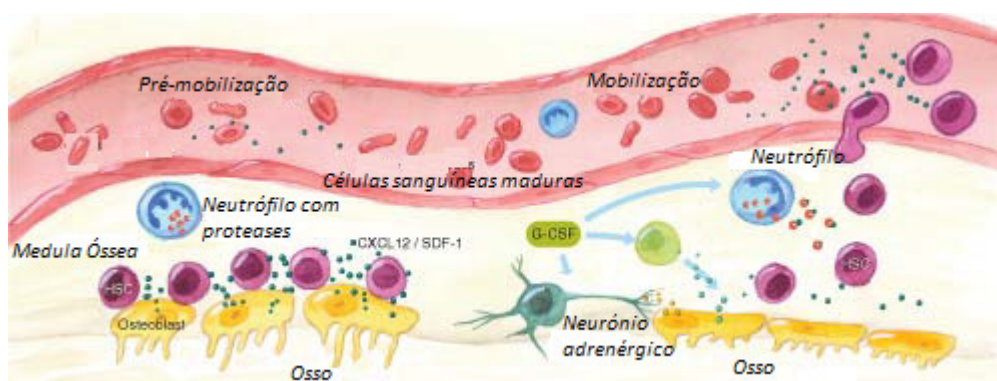


Fig. 5 - Mobilização de células estaminais da medula óssea para a periferia, por acção do G-CSF.
Adaptado de: <http://www.rndsystems.com>.

A determinação da adequação da colheita é avaliada pela contagem de células $CD34^+$ e pela contagem de unidade formadora de colónias de granulócito-macrófago (CFU-GM) (Hoffbrand, 2004).

1.3.2. Transplante de medula óssea

O transplante de medula óssea começou a ser realizado em 1968, quando em alguns doentes com doença por imunodeficiência combinada severa (SCID), síndrome de Wiskoot-Aldrich e leucemia foi transplantada medula óssea de irmãos compatíveis (Imboden, 2004).

O complexo major de histocompatibilidade (MHC) compreende um grupo de genes localizados no braço curto do cromossoma 6 (Fig. 6), agrupados em três classes: classe I, classe II e classe III. Os antígenos HLA classe I (A, B e C) e classe II (DR, DQ e DP) determinam a compatibilidade tecidual e são codificados por genes localizados nas classes MHC I e II, respectivamente. Os genes que codificam as moléculas HLA são extremamente polimórficos e a função biológica das moléculas HLA classe I e II é apresentação antigénica aos linfócitos T $CD8^+$ e $CD4^+$, respectivamente. As moléculas HLA representam os principais aloantígenos relacionados com a rejeição de órgãos sólidos e com a doença do enxerto contra hospedeiro (GvHD) em transplante de células estaminais hematopoiéticas (Gerbase-De Lima, 2004).

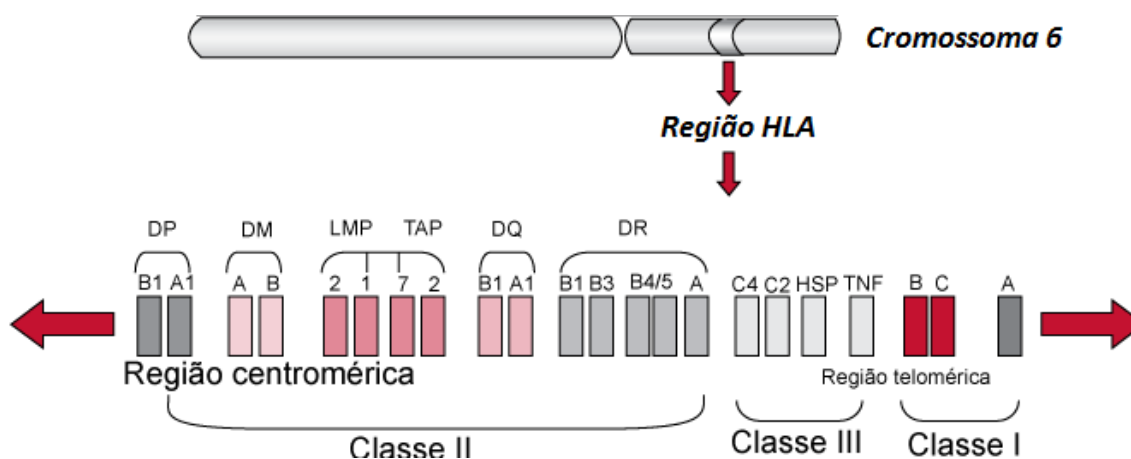


Fig. 6 – Estrutura genética do MHC humano, identificando os genes HLA de Classe I (HLA-A, B e C), de Classe II (HLA-DR, DQ e DP) e os de Classe III.

Os genes TAP, LMP e HLA-DM codificam proteínas não expressas nas superfícies celulares. **Adaptado de:** (Davini, 2008).

Os alelos e haplótipos HLA são distribuídos em frequências diferentes em diferentes grupos raciais ou étnicos.

A identificação dos antígenos HLA (genotipagem HLA) do receptor e de seus potenciais doadores permite a seleção do par receptor/dador com maior grau de compatibilidade e, portanto, com maior probabilidade de sucesso do transplante (Gerbase-De Lima, 2004). Contudo, o extenso polimorfismo HLA dificulta a localização de doadores compatíveis para transplante, a não ser que exista um irmão dador HLA compatível. Por conseguinte, a maioria dos doentes é transplantado com doadores aparentados ou não aparentados, parcialmente HLA compatíveis (Imboden, 2004).

1.3.3. Transplante de sangue do cordão umbilical

O primeiro relato de uso de células do cordão umbilical em transplante foi em 1988. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.* utilizaram o sangue de cordão umbilical da irmã de um doente com anemia de Fanconi para realizar o transplante (Gluckman, 1988).

O primeiro transplante de sangue de cordão foi possível graças a uma intensa colaboração entre os três grupos: Arleen D. Auerbach, da Universidade Rockefeller, em

Nova York (EUA) que descreveu um método de diagnóstico pré-natal na anemia de Fanconi, Hal E. Broxmeyer da Universidade de Indiana em Indianapolis (EUA) que analisou sistematicamente o número de células hematopoiéticas no sangue do cordão umbilical com o propósito de usar as células para a reconstituição hematopoética em humanos e E. Gluckman do Hospital Saint Louis em Paris (França) que mostrou que a hipersensibilidade *in vivo* de células fagocitárias é traduzida num aumento da toxicidade do regime de condicionamento pré-transplante utilizado na anemia aplástica (Gluckman, 2009).

O Dr. Pablo Rubinstein criou o primeiro banco de sangue do cordão umbilical para uso alogénico no Centro Hematológico de Nova York em 1992. Posteriormente, foram criados bancos europeus (Bambach, 2001).

Foram vários os importantes passos que ocorreram na evolução do transplante de sangue do cordão umbilical:

- Primeiro transplante de sangue cordão umbilical com HLA idêntico num doente com Anemia de Fanconi.
- Criação de bancos de sangue do cordão umbilical para transplantes de dadores relacionados e não relacionados (Paris, Dusseldorf, Nova York, Milão) (Gluckman, 2009).
- Primeiro transplante de sangue de cordão umbilical em crianças não relacionadas, parcialmente compatíveis no sistema HLA (Gluckman, 2009).
- Primeiro transplante de sangue do cordão em adultos com dador não relacionado (Gluckman, 2009).
- Optimização da colheita, processamento e armazenamento do sangue do cordão umbilical através da criação da rede *NetCord Eurocord* (Gluckman, 2009).
- Descrição dos critérios de escolha do dador com base no número de células e possibilidade de utilização de sangue do cordão umbilical parcialmente compatíveis no sistema HLA (Gluckman, 2009).

- Demonstração de que transplantes de sangue do cordão umbilical com HLA idêntico origina menos GvHD e a mesma sobrevivência (Gluckman, 2009).
- Demonstração de que os transplantes de medula óssea com dador não relacionado, com HLA idêntico quando comparados com transplantes de sangue do cordão umbilical com HLA parcialmente compatível resultaram em sobrevivência semelhante a longo prazo em crianças e adultos com leucemia. (Gluckman, 2009).
- Melhoria dos resultados principalmente em adultos através do transplante com sangue de dois cordões umbilicais e regime de condicionamento não mieloablativo (Gluckman, 2009).

Este desenvolvimento esteve relacionado com a organização de registos internacionais para a colheita de dados, com o nome de *Eurocord* e com o Centro Internacional de Sangue e Pesquisa de Transplante de Medula (CIBMTR) e ainda, com uma rede de bancos do cordão chamada *Netcord*. O *Eurocord* é um registo internacional que promove a colaboração entre os bancos europeus de sangue (*European Blood*) e o grupo de transplante de medula (EBMT), e inclui centros europeus e não-europeus (mais de 437 centros de transplantação em 47 países), todos a realizarem transplantes de autólogos e alogénicos de sangue do cordão umbilical (Gluckman, 2009).

O grupo *Netcord*, criado em 1998, determinou procedimentos para acreditação de bancos de sangue do cordão umbilical em colaboração com a FACT (Fundação de Acreditação em Terapia Celular). Estes procedimentos tiveram como objectivo estabelecer boas práticas laboratoriais de processamento, armazenamento do sangue do cordão, facilitar a pesquisa de dadores, melhorar a qualidade dos transplantes e padronizar os critérios de excelência numa escala internacional (Gluckman, E. 2009). A figura 7 representa a qualidade do inventário internacional das unidades de sangue do cordão.

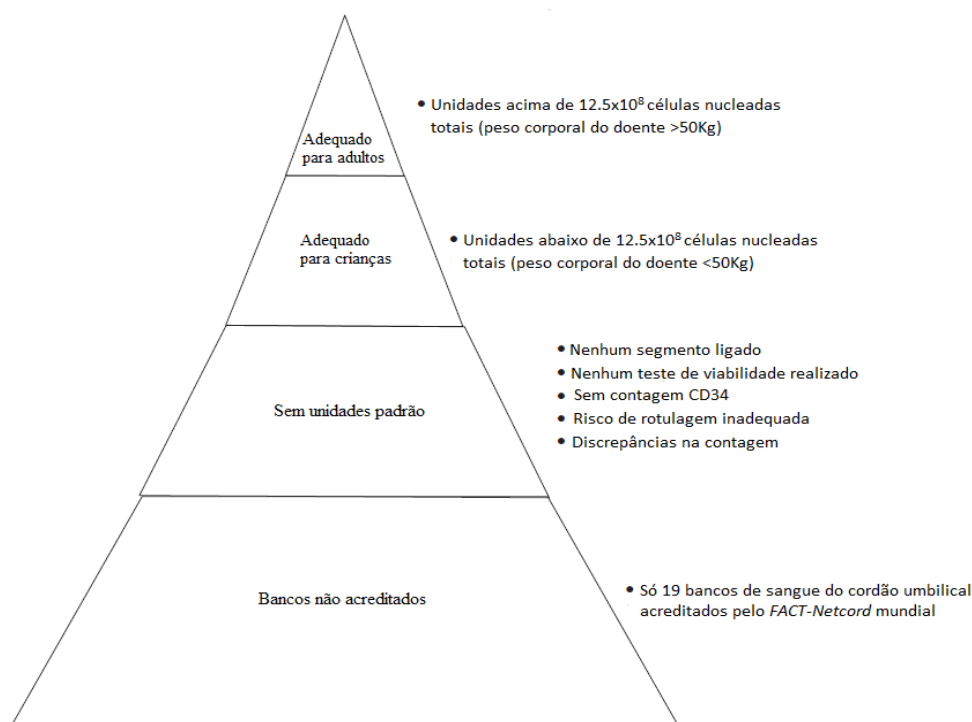


Fig. 7 - Representação figurativa da qualidade do inventário internacional de sangue do cordão (400 000 unidades de 107 bancos de sangue de cordão de acordo com a www.bmdw.org) e de aptidão para o transplante de adultos e pediátrico. Adaptado de: (Gomez, 2010).

Inicialmente, o sangue do cordão umbilical foi utilizado para transplantes em crianças ou adultos de peso igual ou inferior a 50Kg, em situação alogénica, no âmbito de doenças geralmente hematológicas malignas, tais como leucemia mielóide aguda, leucemia linfóide aguda, linfomas, ou não malignas, como anemia de Fanconi, hemoglobinopatias (Panterne, 2010).

O SCU tornou-se recentemente um tratamento alternativo de neoplasias hematológicas e outras doenças imunológicas e genéticas (Jan, 2008).

O sangue do cordão umbilical contém estaminais hematopoiéticas $CD34^+$. Os resultados clínicos do transplante de sangue do cordão umbilical são influenciados pelo número de células nucleadas por quilograma de peso do doente e pelo número de células $CD34^+$, portanto é importante determinar quais as unidades que contêm número suficiente de células $CD34^+$ (Omori, 2010). Os factores obstétricos, tais como a etnia da mãe, peso ao nascer e da placenta, a idade gestacional, sexo do recém-nascido, tipo de parto e colheita, comprimento do cordão umbilical e experiência de quem realiza a

colheita influenciam o conteúdo celular do sangue do cordão umbilical e o volume colhido (Omori, 2010).

Pode realizar-se um transplante de sangue do cordão umbilical a partir de 4 em 6 alelos HLA compatíveis (considerando os *loci* HLA-A, -B, e -DRB1). Contudo, o ideal é que a unidade seja compatível pelo menos em 5 dos 6 alelos HLA e possua mínimo 2.5×10^7 células nucleadas totais/kg de peso corporal do receptor. Quando estes critérios são cumpridos, a terapia pode ser bem-sucedida em mais de 50% dos doentes (Querol, 2009).

Os doentes com insuficiência medular de origem genética, síndromes de imunodeficiência, doenças metabólicas de armazenamento e hemoglobinopatias que exigem transplante alogénico, não devem ser sujeitos a transplante autólogo do sangue de medula óssea (Ballen, 2008).

Na figura 8 é possível observar-se a distribuição mundial de unidades de sangue do cordão umbilical em bancos públicos.

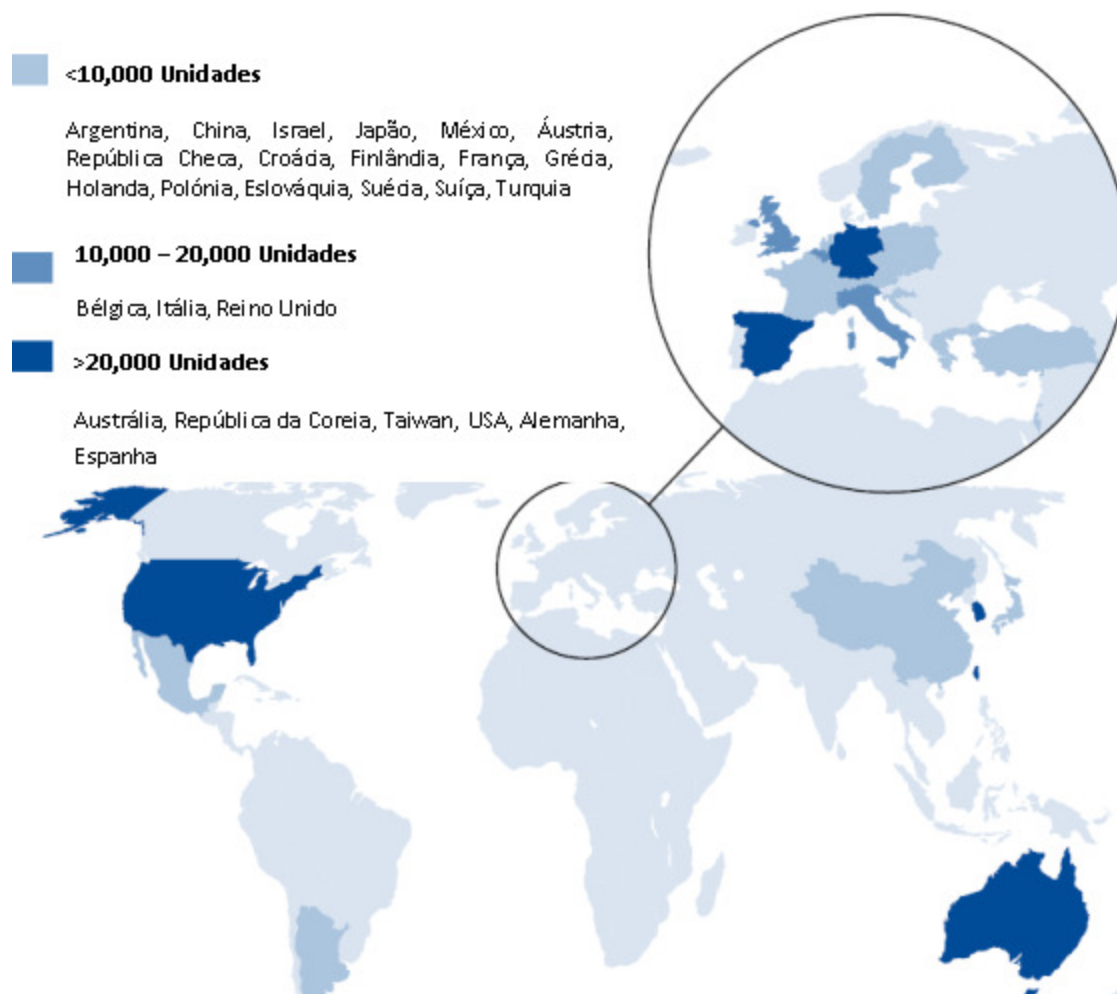


Fig. 8 - Distribuição Mundial de unidades de Sangue do Cordão umbilical em bancos públicos.

Adaptado de: *Bone Marrow Donors Worldwide*, 2009
(<http://www.bmdw.org/uploads/media/BMDW2009.pdf>).

1.3.3.1. Critérios de doação

De acordo com a legislação portuguesa em vigor (lei nº22/2007 de 29 de Junho e lei nº12/2009 de 26 de Março), os critérios de selecção de dadoras baseiam-se numa análise de comportamentos de risco. Devem ser identificados indicadores destes riscos por uma análise dos antecedentes médicos, comportamentais e por análises biológicas.

As dadoras devem ser seleccionadas com base nos dados clínicos, fornecidos num questionário e mediante entrevista realizada à dadora por um profissional qualificado.

Assim, não devem ser aceites dádivas em que se verifique os seguintes critérios:

- Antecedentes de doença de etiologia desconhecida;
- Existência ou antecedentes de doença maligna,
- Diagnóstico de doença de Creutzfeldt-Jakob, ou com a variante desta doença ou com antecedentes familiares de doença de Creutzfeldt-Jakob não iatrogénica;
- Antecedentes de demência progressiva rápida ou com doenças neurodegenerativas, incluindo as de origem desconhecida;
- Tratamentos com hormonas derivadas da hipófise humana (por exemplo, hormonas do crescimento) e receptores de transplantes da córnea, esclerótica e dura-máter;
- Infecção sistémica não controlada no momento da dádiva, incluindo infecções bacterianas, virais, fúngicas ou parasitárias;
- Antecedentes, dados clínicos ou resultados laboratoriais que demonstrem a existência de risco de transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) 1 e 2, vírus da hepatite B (VHB), excepto no caso de pessoas com um estatuto de imunidade comprovado, vírus da hepatite C (VHC) e vírus linfotrópico humano I/II ou presença de factores de risco comportamentais destas infecções;
- Antecedentes de doença crónica, sistémica e autoimune;

- Dados de outros factores de risco de doenças transmissíveis, com base numa avaliação dos riscos que tenha em conta os antecedentes do dador em matéria de viagens e exposição, bem como a prevalência de doenças infecciosas locais;
- Presença, no corpo do dador, de sinais físicos que sugiram risco de doenças transmissíveis;
- Ingestão ou exposição a substâncias como cianeto, chumbo, mercúrio ou ouro, que possam ser transmitidas aos receptores em doses susceptíveis de pôr em risco a sua saúde;
- Antecedentes recentes de vacinação com vírus vivos atenuados, quando se considere que há risco de transmissão;
- Transfusões sanguíneas.

1.3.3.2. Uso autólogo e alogénico do sangue do cordão umbilical

É difícil estimar a probabilidade de uso de uma unidade de sangue do cordão umbilical colhida ao nascimento de um bebé saudável. Tendo em conta a probabilidade de desenvolver cancro, a necessidade de transplante e a falta de um dador alogénico compatível, as estimativas da provável utilização de unidades sangue do cordão autólogo, embora sejam imprecisas, parecem variar de 1:2500 (0,04%) e 1:200.000 (0,0005%) (Ballen, 2008).

As células neoplásicas, causadoras da doença, podem estar presentes ainda que latentes na unidade de cordão umbilical armazenada e não serem detectáveis. Por exemplo, cientistas referem que as células leucémicas do sangue estão presentes no sangue neonatal das crianças que posteriormente foram diagnosticadas com leucemia. A elevada taxa de recaída após transplante autólogo sugere que o transplante autólogo de sangue do cordão umbilical pode não ser ideal para doentes com leucemia (Ballen, 2008).

Dependendo da patologia pode ser mais indicado o transplante autólogo ou alogénico de células estaminais (Tabela 3).

Tabela 3 - Indicações para transplante autólogo e alogénico de células estaminais.

PATOLOGIA	TRANSPLANTE ALOGÉNICO	TRANSPLANTE AUTÓLOGO
Leucemias (linfóide aguda, mielóide aguda, mielóide crónica)	○ Eficaz	○ Controverso para a leucemia linfóide aguda e leucemia mielóide crónica ○ Aceitável para leucemia mielóide aguda
Linfomas (Doença de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin)	○ Eficaz, mas geralmente indicados apenas quando a autotransplantação não é possível ou não é efectiva por maior toxicidade	○ Eficaz
Síndromes Mielodisplásicas	○ Devido às elevadas doses de quimioterapia ou radioterapia necessária, geralmente usado em doentes com menos de 50 anos. ○ Os transplantes não-mielobláticos têm mostrado resultados promissores em doentes idosos ou mais fracos.	○ Eficaz, mas apenas quando seguido de quimioterapia. Geralmente usado em doentes com idade inferior a 50 anos
Neuroblastoma (estádio IV)	○ Estudos controversos estão em andamento para definir o papel em relação à terapia convencional e transplante autólogo	○ Controverso; estão a decorrer estudos para definir o papel relacionado com a terapia convencional e transplante alogénico
Sarcomas dos ossos e tecidos moles, Tumor de Wilm, tumores cerebrais	○ Muito raramente indicado	○ Raramente indicado e eficácia não comprovada
Anemia Aplástica e outras citopenias (de causa não ambiental)	○ Eficaz	○ Não indicado
Deficiência imunológica (e.g., imunodeficiência combinada severa)	○ Eficaz	○ Não indicado
Hemoglobinopatias, Talassemias, Anemia Falciforme	○ Eficaz; controverso em indivíduos não relacionados	○ Não indicado
Doenças de armazenamento metabólico, Síndrome de Hurler, Leucodistrofia Metacromática	○ Controverso; pode ser eficaz em doentes seleccionados	○ Não indicado
Cancro das células renais/Melanoma	○ Sob investigação	○
Doença auto-imune	○ Sob investigação	○ Sob investigação

Adaptado de: Cord blood. *Establish a National Hematopoietic Stem Cell Bank Program*. National Academy of Sciences, USA, 2005 (http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11269&page=39).

Segundo o registo de dados *Eurocord*, entre 1988 e 2009 o número de transplantes de sangue do cordão umbilical alogénicos realizados foi superior ao número de transplantes de sangue do cordão umbilical autólogos (Fig. 9).

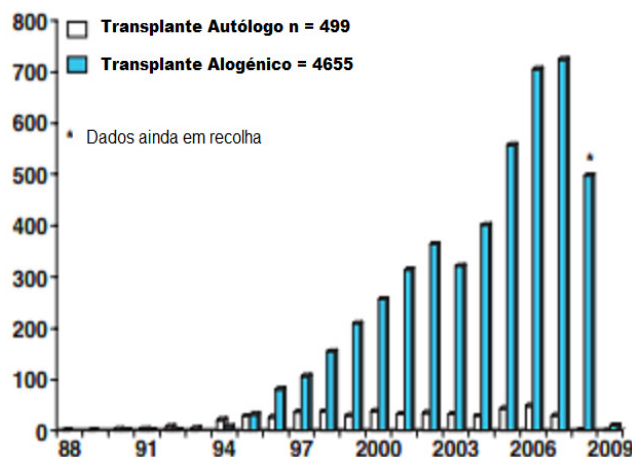


Fig. 9 - Registo de Dados *Eurocord*: número de Transplantes autólogos e alogênicos de sangue do cordão umbilical. Adaptado de: Gluckman (2009).

1.3.3.3. Aplicações e potencial terapêutico

Inicialmente, o sangue do cordão umbilical foi utilizado como um substituto para os transplantes de medula óssea, no tratamento de doenças hematológicas ou falência da medular, após os efeitos colaterais da quimioterapia. No entanto, a capacidade de produzir diferentes tipos de células (das três camadas germinativas) a partir das células estaminais do sangue do cordão umbilical, destacou o seu potencial terapêutico no tratamento de ampla gama de patologias, incluindo doenças neurológicas e lesões (Ali, 2010).

Actualmente, o sangue do cordão umbilical tem sido utilizado com sucesso para tratar: leucemias, linfomas, mielodisplasias, anemia aplástica, hemoglobinopatias, doenças metabólicas de armazenamento e imunodeficiências, entre outras (Ballen, 2008).

1.3.3.4. Transplante de sangue do cordão umbilical vs. Transplante de medula óssea

Quando existe um dador HLA compatível, a taxa de recuperação neutrofílica do transplante de medula óssea é superior à taxa de recuperação obtida no transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical (Laughlin, 2005). Os investigadores do *International Bone Marrow Transplant Registry* (IBMTR) compararam os resultados do transplante de células estaminais hematopoiéticas de sangue do cordão umbilical de dadores não relacionados com um antígeno HLA incompatível em doentes com leucemia (34 doentes), ou dois antígenos (116 doentes), de medula óssea com um antígeno incompatível (83 doentes) e de medula óssea HLA compatível (367 doentes) (Fig. 10). Os doentes a quem se realizou transplante de sangue do cordão umbilical eram mais jovens, muitos encontravam-se com leucemia em estado avançado e receberam doses menores de células nucleadas. A recuperação hematopoiética foi mais lenta nos transplantes de medula óssea e sangue do cordão umbilical HLA parcialmente compatíveis do que em transplantes de medula óssea HLA compatível (Laughlin, 2005).

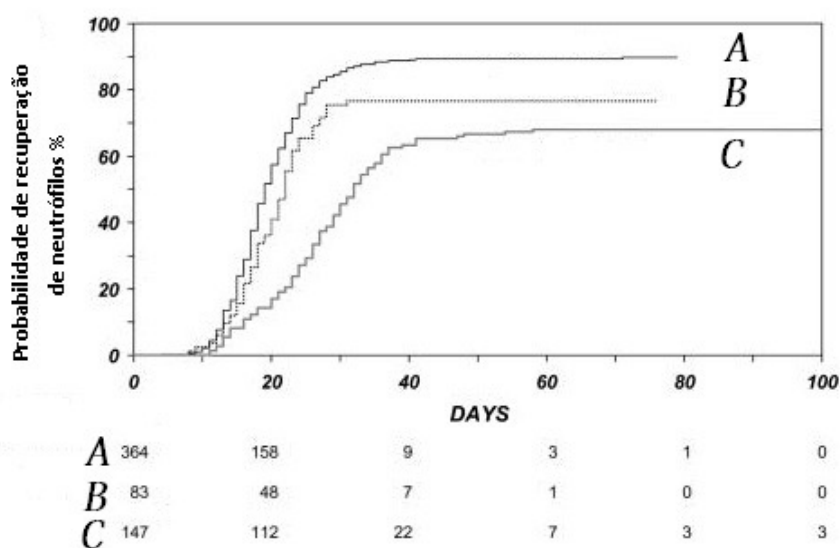


Fig. 10 - Incidência cumulativa de recuperação de neutrófilos após transplante de Medula Óssea e de Sangue do Cordão Umbilical.

A: Medula óssea HLA compatível B: Medula óssea HLA parcialmente compatível C: Sangue do cordão umbilical HLA parcialmente compatível. Apesar das diferenças iniciais, a incidência cumulativa de recuperação dos neutrófilos aos 100 dias foi semelhante após o transplante de medula óssea HLA parcialmente compatível e do sangue do cordão umbilical HLA parcialmente compatível. A percentagem de recuperação neutrofílica correspondente ao transplante de medula óssea HLA compatível foi significativamente maior. **Adaptado de:** Laughlin (2005).

As vantagens da utilização das células do sangue do cordão umbilical incluem: rápida disponibilidade das unidades, baixo risco de transmissão de infecção e diminuição da incidência e gravidade da GvHD (Jan, 2008). Contudo, o sangue do cordão umbilical tem algumas limitações, quando comparado com outras fontes de células estaminais, incluindo uma fraca recuperação neutrófila e reconstituição imunológica prolongada, quantidade celular insuficiente para receptores maiores e indisponibilidade para posterior infusão de linfócitos do dador (Urciuoli, 2010). O transplante de sangue do cordão umbilical tem algumas vantagens comparativamente ao transplante de medula óssea (Tabela 4).

Tabela 4 - Vantagens e desvantagens da utilização de células estaminais do sangue do cordão umbilical.

VANTAGENS	DESVANTAGENS
○ Exige menor compatibilidade HLA	○ Pequeno volume disponível
○ Prontamente disponível	○ Mais demorado para regenerar o tecido hematopoiético do receptor (maior risco de infecção)
○ Menos doença do enxerto contra o hospedeiro	○ Impossibilidade de re-infusão caso o primeiro transplante não seja bem sucedido
○ Alta concentração de células estaminais hematopoiéticas	○ Como a história genética das células estaminais de cordão umbilical pode ser relativamente desconhecida, há algum risco de transmissão de doenças genéticas
○ Maior possibilidade de utilização de um transplante autólogo se o sangue de cordão umbilical do próprio doente tiver sido colhido ao nascimento	
○ Menos risco de contaminação por vírus	
○ Menos riscos e desconfortos para o dador	
○ Possibilidade de haver número elevado de dadores, aumentando a diversidade genética das unidades armazenadas	

Adaptado de: Silva Junior (2009).

A colheita de sangue do cordão umbilical é não-invasiva e não tem efeitos secundários no bebé ou a mãe, ao contrário da colheita de medula óssea. Além disso, os transplantes de sangue do cordão umbilical estão associados a menor risco de transmissão vírica. É recomendado um conteúdo mínimo de 2×10^7 TNC/Kg para adultos e $3,7 \times 10^7$ TNC/Kg para crianças (McGuckin, C. P.; *et al.* 2007). Contudo, Carpenter, C.; *et al.* (2000) concluíram que doses acima de 3×10^7 TNC/Kg administradas em adultos podem compensar o efeito negativo de um alelo HLA incompatível. Embora, o número de células nucleadas totais da unidade de sangue do cordão umbilical seja baixo para o transplante em adulto, é possível combinar-se várias unidades de sangue não relacionadas para transplante alogénico. Este facto deve-se à imaturidade HLA no sangue do cordão umbilical (Ali, 2010). O estudo de Takahashi, S.; *et al.* (2007) sugere que o sangue do cordão umbilical pode ser uma fonte de células estaminais tão segura e eficaz para doentes adultos como as células obtidas da medula óssea ou do sangue periférico quando é utilizado como fonte primária de células estaminais alogénicas.

O sangue do cordão umbilical é actualmente a fonte de células estaminais mais usada em pediatria nos Estados Unidos da América (Fig. 11).

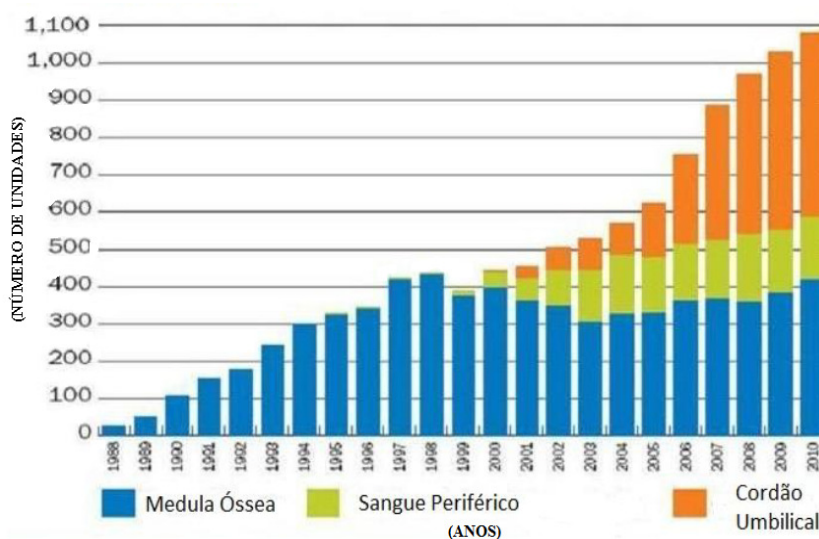


Fig. 11 - Prevalência de transplantes em crianças com idade inferior a 18 anos de acordo com a fonte de células estaminais hematopoiéticas. Adaptado de: www.cordblood.com.

1.3.3.5. Avaliação da qualidade das unidades de sangue do cordão umbilical

1.3.3.5.1. Colheita da amostra

A colheita processa-se em sistema fechado, sob condições de assepsia, com a placenta *in útero* ou *ex útero*, com o objectivo de colher o maior volume de sangue possível. Em Portugal utiliza-se habitualmente a colheita com placenta *in útero*; nos Estados Unidos e na Inglaterra é mais frequente a técnica com placenta *ex útero* (Roncon, 2010).

A colheita com a placenta *in útero* ocorre imediatamente após o parto antes da separação da placenta da parede do útero e na colheita *ex útero* é entregue a placenta clampada ao profissional que realiza a colheita de sangue do cordão umbilical. A colheita *ex útero* apresenta a vantagem da colheita ocorrer numa sala separada, pelo que não interfere na evolução do trabalho de parto e permite à mãe maior tranquilidade (Roncon, 2010).

O CHN aconselha a realização da colheita *in útero*, embora tenha os dois métodos descritos, daí que as amostras de sangue do cordão umbilical em estudo foram colhidas pelos dois métodos.

Vários estudos têm comparado as unidades sangue do cordão umbilical colhidas por ambas as técnicas, e, em conjunto, não demonstraram diferenças significativas consistentes no volume total de sangue, contagem de células CD34⁺ ou contagem total de células nucleadas (Ballen, 2008).

1.3.3.5.2. Testes de controlo de qualidade

As recomendações francesas referem que os sacos colectores devem ser transportados e armazenados em arcas com temperatura controlada, a uma temperatura entre +14°C e 20°C (Lapierre, 2007). No entanto, o LusoCord validou as temperaturas para o intervalo de 4 e 25°C.

O intervalo de tempo desde a colheita da unidade de sangue do cordão umbilical até à criopreservação não pode exceder as 48 horas no caso das amostras para uso alogénico; para uso autólogo o limite são 72 horas.

Antes do armazenamento de SCU têm que ser feitos alguns ensaios analíticos, tanto na amostra de sangue materno como a unidade de sangue do cordão umbilical colhida, antes e após o processamento. Outros ensaios analíticos podem ser necessários quando a unidade for seleccionada para transplante (Tabela 5).

Tabela 5 - Análises realizadas ao sangue materno e ao sangue do cordão umbilical.

	AMOSTRAS	ANÁLISES	RESULTADOS
SEGURANÇA	Sangue materno	Doenças Infecciosas: Vírus da Hepatite B (por PCR e serologia) Vírus da Hepatite C (por PCR e serologia) Vírus HIV 1/2 (por PCR e serologia) <i>Treponema pallidum</i> (teste ou ensaio treponémico e não treponémico) Vírus Linfotrópico Humano I/II (por ELISA/Western Blot) Citomegalovírus (por PCR)	Negativo para todas as análises efectuadas
	Sangue do cordão	Esterilidade bacteriana (hemoculturas aeróbios e anaeróbios) e fúngica Hemoglobina (hemograma, electroforese e quantificação de HbF)	Estéril Sem hemoglobinopatia homozigótica na disponibilização do SCU
CONTEÚDO CELULAR VIABILIDADE FUNCIONALIDADE	Sangue do cordão	Total de células nucleadas (hemograma e citometria de fluxo) Células nucleadas viáveis (citometria de fluxo) Células CD34+ viáveis (citometria de fluxo) Total CFU-GM (meio de cultura de metilcelulose com factores de crescimento)	A definir pelo banco A definir pelo banco A definir pelo banco Na disponibilização do SCU
CARACTERIZAÇÃO	Sangue do cordão	Tipagem HLA (PCR) classe I e II Fenotipagem eritrocitária (Sistema ABO e Rhesus) Tipagem HLA confirmatória (PCR)	Integração na base de dados Protocolo transfusional Na disponibilização do SCU

Adaptado de: Roncon (2010).

Antes do processamento é verificado o volume de SCU colhido que Lapierre, V.; *et al.* (2007) referem que deve ser superior a 80 mL; o valor de referência estabelecido no CHN são 40 mL sem anticoagulante.

Para avaliar se existe morte celular durante todo o processo pode ser usada uma técnica de viabilidade celular que consiste na utilização do corante azul tripano e colocação na câmara de *Neubauer* para contagem celular (Berz, 2007). A viabilidade celular é também determinada através de citometria de fluxo.

É realizado um hemograma completo do qual faz parte a contagem do total de células nucleadas no contador hematológico XE-2100® (Sysmex; Japan, Kobe).

Lapierre, V.; *et al.* (2007) mencionam que a contagem de células CD34⁺ deve ser realizada antes e após a redução de volume e deve ser $\geq 1.6 \times 10^6$ /saco. No LusoCord a contagem de células CD34⁺ é realizada na fracção enriquecida em HSC, fracção concentrada de células nucleadas após o processo de redução de volume. O conteúdo de células progenitoras é expresso como número de células por unidade de peso corporal do receptor, este é um determinante importante da velocidade da recuperação hematológica (Ali, 2003).

Citometria de fluxo

O volume de sangue do cordão umbilical, a contagem de células CD34⁺ e o número total de células nucleadas são variáveis determinantes como critérios de escolha do SCU para transplante, estando associados com o sucesso do transplante e melhor sobrevida após transplante de células do cordão umbilical (Jan, 2008).

A contagem de células CD34⁺ pode ser realizada pelo método de citometria de fluxo semi-automático com base em análise volumétrica, no qual o número de células CD34⁺ é expressa por unidade de volume (ensaio de plataforma única), ou pela citometria de fluxo padrão, em que a contagem da percentagem de células CD34⁺ é multiplicada pelo número de células por unidade de volume obtida pela análise automatizada (tecnologia de plataforma dupla) (Gisselø, 2002).

Têm sido propostos vários ensaios para contagem de células CD34⁺, mas a falta de procedimentos padronizados resultou na obtenção de dados divergentes, sendo o

método de plataforma única o mais apoiado. Neste trabalho seguiu-se o protocolo ISHAGE publicado pela *International Society of Haemotherapy and Graft Engineering* concebido como um conjunto de orientações para detecção exacta de células CD34⁺, baseada no método de citometria de fluxo (Fig.12) (Gajkowska, 2006).

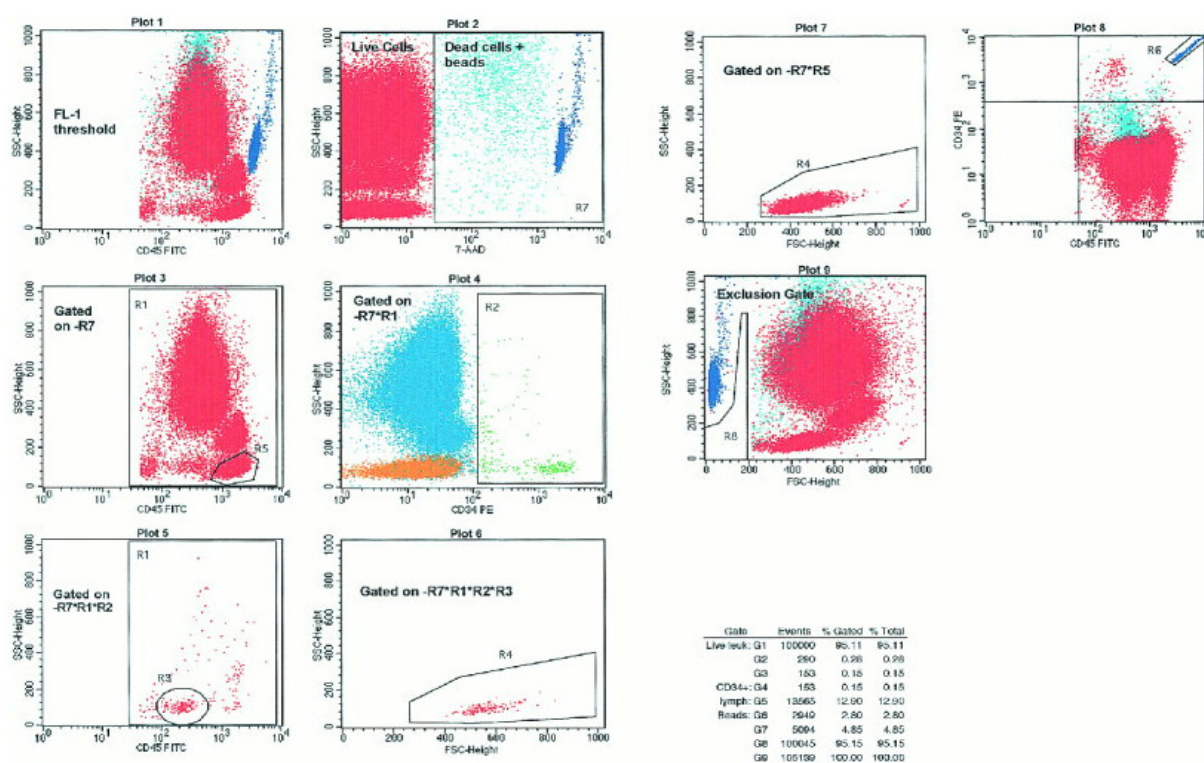


Fig. 12 - Estratégia de gates (janelas) sequenciais Trucount-ISHAGE com FITC anti-CD45, PE anti-CD34 e 7-AAD em sangue do cordão umbilical.

Plot 1 - são mostrados todos os eventos. **Plot 2** - Separação das células viáveis e não viáveis. **Plot 3** - primeiro *plot* ISHAGE com delimitação de células viáveis, R1 define todos os leucócitos CD45⁺ e R5 define a população de linfócitos. **Plot 4** - segundo *plot* ISHAGE com delimitação de leucócitos CD45⁺ vivos, R2 define as possíveis células CD34⁺. **Plot 5** - terceiro *plot* ISHAGE delimitado nas CD45⁺CD34⁺ vivas, R3 define aglomeração de CD34⁺. **Plot 6** - quarto *plot* ISHAGE delimitado nas CD45⁺CD34⁺ vivas, R4 define o agrupamento de CD34⁺ que têm propriedades de dispersão de luz semelhantes que é usada para enumerar células CD34⁺. **Plot 7** - linfócitos viáveis, o lado esquerdo de R4 é desenhado de modo a incluir as células que não sejam menores do que um pequeno linfócito e auxilia a posicionar a gate de exclusão no plot 9. **Plot 8** - R6 define as esferas TRUCOUNT, este plot auxilia a definir o limite inferior de expressão de CD45 nas células CD34⁺. **Plot 9** - R8 define um gate de exclusão que remove a maioria das plaquetas e detritos permitindo que as esferas de TRUCOUNT sejam colhidas. **Adaptado de: Brocklebank (2001).**

1.3.3.5.3. Processamento da amostra

1.3.3.5.3.1. Métodos de redução de volume

Um dos principais problemas dos bancos de sangue do cordão umbilical é o espaço de armazenamento necessário. A depleção de eritrócitos não só maximiza o espaço de armazenamento mas também tem outras vantagens tais como, reduzir os potenciais efeitos colaterais do dimetilsulfóxido (DMSO), das incompatibilidades ABO ou hemólise de eritrócitos nas unidades não fraccionadas (Carbonell-Uberos, 2006).

Têm sido utilizados vários métodos para a redução de volume das unidades de sangue do cordão umbilical. No método manual de sedimentação de hidroxietil de amido (HES), após adição do HES e ligação a um saco de transferência de 600 mL as unidades de sangue do cordão umbilical são centrifugadas a 50g durante 5 minutos. Posteriormente são removidas da centrífuga tendo o cuidado de não interferir com a interface entre eritrócitos e plasma. O saco é colocado num extractor de plasma e inicialmente os eritrócitos são removidos para o saco de transferência até que a interface eritrócitos/plasma fique nivelada com a marca no interior do extractor. O saco de recolha e o saco de transferência são separados. O saco de recolha é conectado de forma estéril ao tubo do meio do sistema de processamento de células estaminais (791-02U; Pall Medical; USA, New York). É realizada uma segunda centrifugação durante 10 minutos a 400g. A solução crioprotectora (dextran 40/DMSO) é adicionada às células nucleadas para proporcionar uma suspensão celular de 23 ± 2 mL contendo 10% (v/v) DMSO. Este método é muito demorado (Bardley, 2007).

No método automatizado Optipress II os sacos de sangue do cordão umbilical são centrifugados a 2230 g à temperatura ambiente (sem adição de HES). Posteriormente são removidos da centrífuga, com cuidado para não ressuspender a fracção enriquecida em HSC, e conectados ao extractor automatizado Optipress II® (Baxter Healthcare; USA, Parkway Deerfield). Pode usar-se também o G4 Compomat® (A. Menarini Diagnostics, Italy, Firenze) que é uma máquina totalmente automatizada para a separação de sangue total pela centrifugação dos componentes sanguíneos. O G4 Compomat® (A. Menarini Diagnostics, Italy, Firenze) tem sido desenvolvido para processar sistemas de sacos sanguíneos duplos, triplos e quádruplos.

O princípio deste método consiste em duas prensas comandadas electronicamente que conseguem mover os componentes sanguíneos na parte superior e inferior do saco (Carbonell-Uberos, 2006). Um procedimento automatizado permite a remoção do plasma seguida da remoção de eritrócitos e o ajuste de volume para 21mL. Este método é menos demorado que o método manual de sedimentação de HES, mas a taxa de recuperação e depleção de eritrócitos é inferior (Bardley, 2007).

O sistema de processamento celular Sepax® (Biosafe; Switzerland, Eysins) é um equipamento de centrifugação celular, que permite um processamento rápido e automatizado de sangue ou componentes sanguíneos, num ambiente fechado e estéril. Os componentes sanguíneos são recolhidos em sacos padronizados, preparados para um processamento adicional tal como: criopreservação, expansão *in vitro* ou transfusão para um paciente. Este sistema compacto, portátil e polivalente é a plataforma ideal para o processamento dos componentes sanguíneos dado que permite uma alta taxa de recuperação (Manual Sepax).

1.3.3.5.3.2. Criopreservação

A criopreservação baseia-se no arrefecimento numa unidade de SCU a temperaturas muito baixas, mantendo a sua viabilidade. A unidade é devidamente rotulada e colocada num recipiente de criopreservação onde ocorre a descida gradual de temperatura, a uma velocidade controlada até -120°C . O controlo de descida de temperatura diminui a possibilidade de perda de viabilidade celular da unidade, evitando a formação de cristais de gelo no interior das células (Berz, 2007).

A solução dextran/DMSO (concentração final de DMSO é 10%) é adicionada com uma bomba de seringa antes do congelamento e armazenamento do sangue do cordão umbilical (Bardley, 2007). No LusoCord esta adição é realizada com auxílio de seringas e do Coolmix® (Biosafe; Switzerland, Eysins).

A diminuição da temperatura no LusoCord é realizada no Planer Kryo 10 Series II® (Cryotech Benelux; The Netherlands, Schagen).

No Lusocord quando a unidade atinge a temperatura de -120°C é colocada num contentor de azoto gasoso à temperatura de cerca de 160°C . A esta temperatura as células estaminais param o normal processo de envelhecimento e, anos mais tarde após descongelação, são indistinguíveis do dia em que foram congeladas, o que as torna ideais para serem usadas em tratamentos com células estaminais no futuro em caso de necessidade.

2 – OBJETIVOS

Tendo em consideração o que foi referido anteriormente, o objectivo deste trabalho é o de avaliar a influência dos factores obstétricos e do volume inicial de sangue do cordão umbilical na contagem de células CD34⁺. Pretendeu-se assim:

Avaliar a relação entre o volume inicial de sangue do cordão umbilical e a contagem de células CD34⁺.

Avaliar a relação entre o volume de sangue do cordão umbilical e o número total de TNC.

Avaliar a relação entre o número o número total TNC e o número de células CD34⁺.

Avaliar a relação entre o peso à nascença e o volume inicial de sangue do cordão umbilical.

Avaliar a relação entre a viabilidade das CD34⁺ e o número total TNC.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Metodologia

3.1.1. Amostras de sangue do cordão umbilical

Neste estudo foram utilizados dados relativos a 179 amostras de sangue do cordão umbilical, criopreservadas no LusoCord - Centro de Histocompatibilidade do Norte entre Abril e Outubro de 2010 e cujos todos os parâmetros aqui em estudo estavam disponíveis. Para obtenção dos dados recorreu-se à consulta dos respectivos processos individuais e à base de dados informática B-Lab® (B-Simple; Portugal, Porto) onde se obteve: o peso da criança, o tempo de gestação, o tipo de parto, o sexo do bebé e a idade materna.

3.1.2. Colheita do sangue do cordão umbilical

O CHN aconselha a realização da colheita *in útero*, embora tenha os dois métodos descritos, daí que as amostras de sangue do cordão umbilical em estudo foram colhidas pelos dois métodos.

Foram realizadas colheitas ao cordão umbilical de recém-nascidos com idade gestacional superior a 36 semanas.

O sangue colhido foi armazenado entre 4 a 25°C até ser transportado para o local de processamento, sendo que desde a colheita até à criopreservação não devem exceder as 48 horas.

3.1.3. Processamento das amostras

O processo de criopreservação das células estaminais do sangue do cordão umbilical é feito cumprindo os mais rigorosos padrões de qualidade, que visam garantir a segurança da amostra recolhida no momento do parto.

Após recepção das amostras procede-se à verificação do seu correcto acondicionamento na caixa e efectua-se a sua pesagem, de forma a verificar se possuíam o volume mínimo de 40 mL.

Realizou-se a contagem de células nucleadas totais (TNC) no contador hematológico XE-2100® (Sysmex; Japan, Kobe).

Procedeu-se à separação celular no sistema fechado Sepax® (Biosafe; Switzerland, Eysins).

3.1.3.1. Redução do volume das amostras pelo método Sepax da Biosafe®

Com este método, a unidade de sangue do cordão umbilical é conectada de forma estéril (Fig. 14) (através do ponto de ligação ao saco de colheita E) ao kit Sepax® (Biosafe; Switzerland, Eysins) e a unidade completa, é introduzida no sistema de processamento que fracciona a unidade de sangue de cordão umbilical em três fracções: eritrócitos (recolha para o saco inicial), plasma (F) e fracção enriquecida em HSC (cerca de 20 mL), recuperada num pequeno saco pronto para congelar (G). Este fraccionamento ocorre na câmara de separação (A) que recebe o sangue do cordão, efectua uma (ou duas) centrifugação e recolhe os componentes sequencialmente para os sacos respectivos (Bardley, 2007).



Fig. 13 - Saco inicial onde é recolhida a amostra de sangue do cordão umbilical e onde é conectado o kit. Adaptado de: Manual do Kit Biosafe® CS-530.

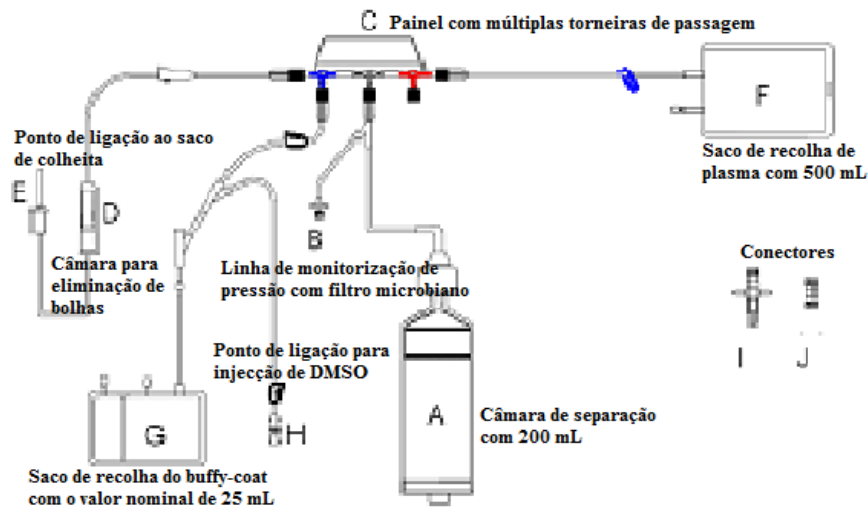


Fig. 14 - Esquema do kit *Biosafe*® CS-530. Adaptado de: Manual do Kit Biosafe CS-530.

A figura 15 é uma representação esquemática do processo de separação do sangue do cordão umbilical.

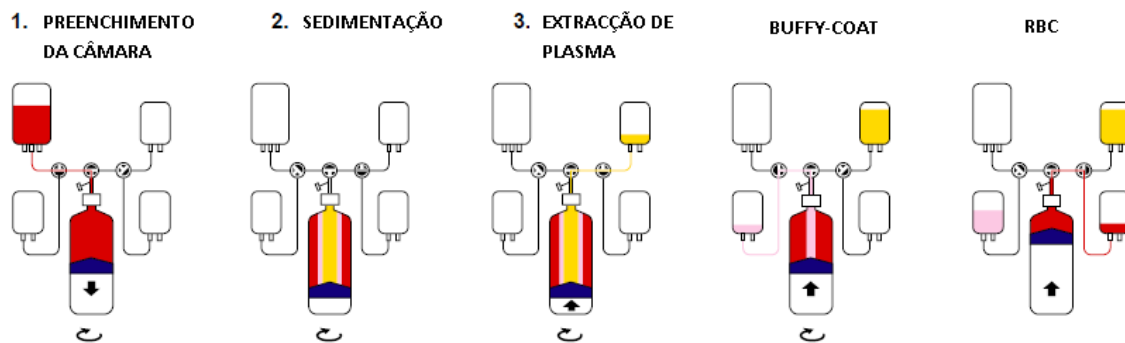


Fig. 15 - Processo de separação celular do sangue do cordão umbilical. Adaptado de: Manual do operador do Sistema de separação de células SEPAX da Biosafe®.

Após a recuperação das HSC é feita a adição do criopreservante dextran/DMSO40 com o auxílio do equipamento Coolmix® (Biosafe; Switzerland, Eysins), de forma a manter controlados o tempo, temperatura e agitação obtendo-se uma concentração final de DMSO de 10% (V/V) num volume final de aproximadamente 25 mL (Bardley, 2007).

Este sistema permite a obtenção de uma taxa de recuperação de células estaminais hematopoiéticas elevada, impede as contaminações, é um sistema rápido e

permite a normalização, uniformização e rastreabilidade de cada procedimento, o que garante a alta qualidade das amostras criopreservadas (Bardley, 2007).

3.1.3.2. Imunofenotipagem das células CD34⁺

Após a redução de volume procedeu-se à contagem de células CD34⁺ na fracção enriquecida em HSC. O antigénio CD34 é uma glicoproteína expressa nas células hematopoiéticas humanas, definidas pelo anticorpo monoclonal específico anti-CD34, pelo que a utilização combinada dos anticorpos monoclonais anti-CD34 e anti-CD45 permite a obtenção do valor percentual relativo da população de células CD34⁺ no total de células nucleadas.

Os dados referentes às células CD34⁺ totais e viáveis foram obtidos através de citometria de fluxo no citómetro de fluxo FACsCalibur® (Becton Dickinson; USA, Franklin Lakes) e as análises quantitativas e qualitativas foram realizadas através do software CELLQuest® (BD Biosciences; USA, Franklin Lakes).

Neste trabalho seguiu-se o protocolo ISHAGE, publicado pela *International Society of Haemotherapy and Graft Engineering*, concebido como um conjunto de orientações para detecção exacta de células CD34⁺, baseada no método de citometria de fluxo com as marcações: CD45FiTC (isotiocianato de fluoresceína)/CD34 PE (ficoeritrina). Este protocolo permite a avaliação do tamanho, da complexidade celular e a selecção da subpopulação de células CD34⁺ a partir da população total de leucócitos marcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD34.

Foi utilizada a estratégia de *gates* (janelas) sequenciais *Trucount*-ISHAGE. Os tubos *Trucount*® (BD Biosciences; USA, Franklin Lakes) contêm uma concentração conhecida de esferas liofilizadas fluorescentes. A análise gráfica sequencial da citometria de fluxo, permite delimitar a população CD45⁺ numa região R1 e posteriormente a subpopulação CD34⁺ numa região R2 (Fig. 16). O número absoluto (células/ μ L) é determinado por comparação dos eventos celulares com os eventos das esferas.

Para determinar a viabilidade, recorreu-se ao marcador de ácidos nucleicos 7-AAD, que marca apenas as células com a membrana celular comprometida.

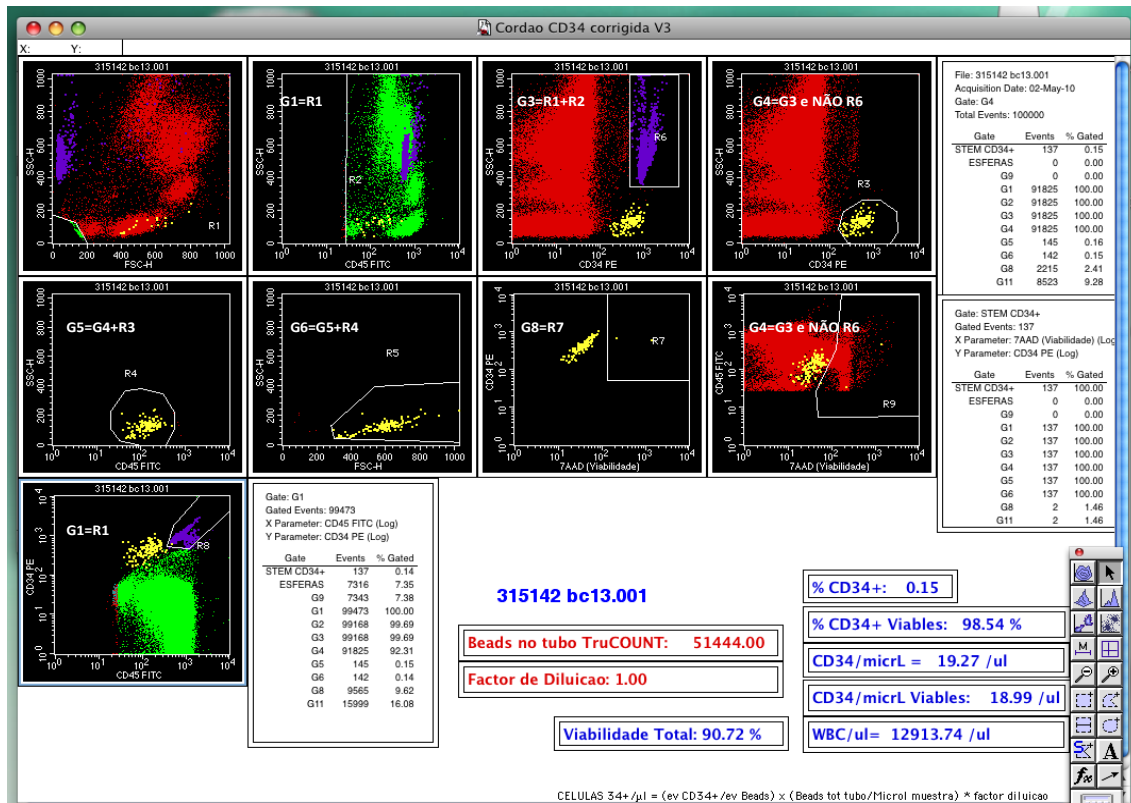


Fig. 16 - Exemplo da análise por citometria de fluxo realizada numa amostra de sangue do cordão umbilical.

Estratégia de gates (janelas) sequenciais Trucount-ISHAGE com FITC anti-CD45, PE anti-CD34 e 7-AAD em sangue do cordão umbilical.

3. 1. 4. Análise estatística

A análise descritiva dos dados obtidos foi efectuada usando a média e o desvio padrão. Passamos de seguida para a abordagem inferencial dos mesmos, através da estatística analítica.

Foram realizadas várias regressões lineares para testar a associação entre características obstétricas (variáveis independentes) e as determinações celulares (variáveis dependentes). O coeficiente da correlação de Pearson foi usado para determinar a correlação entre o volume de sangue do cordão umbilical e o número total de células nucleadas (TNC), entre o número de TNC e de células CD34⁺, entre o peso à nascença e o volume de sangue do cordão umbilical, entre a viabilidade das células CD34⁺ e as TNC.

Os dados obtidos e tratados estatisticamente no programa SPSS 17.0 *for Windows* são apresentados em tabelas e gráficos para facilitar a sua leitura e permitir uma rápida comparação dos resultados obtidos.

4 - RESULTADOS

Caracterização da amostra

Neste estudo foram utilizados dados relativos a 179 amostras de sangue do cordão umbilical criopreservadas no LusoCord entre Abril e Outubro de 2010.

A idade materna variou entre 21 e 44 anos com média de 31.34 (\pm DP) 4.3 anos. O volume inicial de sangue do cordão umbilical das amostras foi em média 82.97 (\pm DP) 21.90 mL e o volume final foi em média 20.06 (\pm DP) 0.50 mL.

O número inicial de células nucleadas totais variou entre 41.70×10^7 e 367.10×10^7 com média de 99 (\pm DP) 40×10^7 e o número final variou entre 30.95×10^7 e 239.61×10^7 com média de 90 (\pm DP) 30×10^7 . O número de células CD34⁺ totais variou entre 0.40×10^6 e 17×10^6 com média de 4.31 (\pm DP) 3×10^6 .

Para se proceder ao transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical é recomendado um conteúdo mínimo de 2×10^7 TNC/Kg para adultos e 3.70×10^7 TNC/Kg para crianças (McGuckin, 2007).

Na figura 17 está representado o número unidades de SCU por peso dos possíveis receptores:

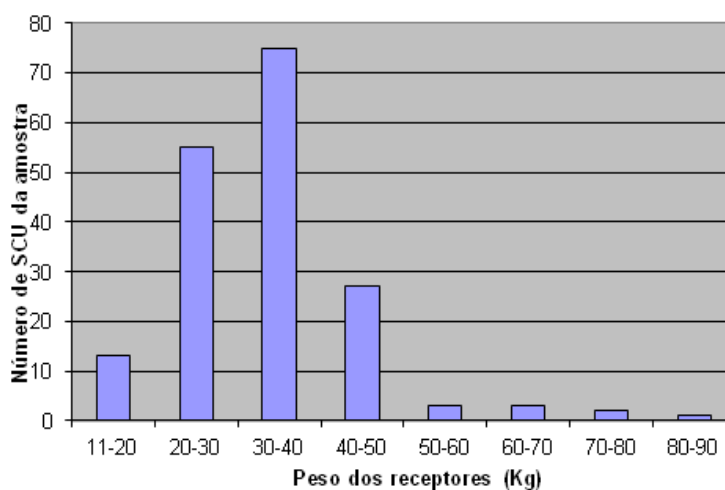


Fig. 17 - Distribuição das unidades de sangue do cordão umbilical consoante o peso dos possíveis receptores.

As unidades de sangue do cordão umbilical incluídas nesta amostra são mais indicadas para transplante pediátrico, principalmente para pesos de 11 a 50 Kg (Fig. 17).

4.1. Caracterização da amostra por género

Esta amostra é constituída por 179 unidades de sangue do cordão umbilical, sendo 102 cordões do sexo feminino (57%) e 77 cordões do sexo masculino (43%). Na tabela 6 está representada a relação entre o sexo do bebé e os parâmetros analisados, não se tendo encontrado diferenças significativas nos parâmetros avaliados por género.

Tabela 6 - Relação entre o sexo e os parâmetros analisados.

	Feminino (n=102)	Masculino (n=77)	Valor de P
Volume inicial do SCU (mL)	81.0 +/- 20.7	85.6 +/- 23.5	0.167
Volume final do SCU (mL)	20.0 +/- 0.5	20.1 +/- 0.4	0.670
WBC inicial (x 10⁶/mL)	12.1 +/- 2.7	11.8 +/- 3.2	0.509
WBC final (10⁶/mL)	45.3 +/- 12.8	44.4 +/- 17.8	0.708
Número de células nucleadas totais inicial x 10⁷	100 +/- 0.3	100 +/- 0.5	0.378
Número de células nucleadas totais final 10⁷	90.6 +/- 25.3	89.0 +/- 35.2	0.717
Número de células CD34⁺ totais x 10⁶	4.1 +/- 2.7	4.1 +/- 3.0	0.911
Concentração de CD34⁺ viáveis/μL	217.7 +/- 146.7	212.9 +/- 158.2	0.835
Peso do bebé (gramas)	3292.7 +/- 423.5	3327.5 +/- 571.8	0.640
Idade Materna (anos)	31.2 +/- 4.7	31.5 +/- 3.8	0.643

4.2. Caracterização da amostra por tipo de parto

Existem dois tipos de parto, vaginal e por cesariana. As unidades de sangue de cordão umbilical incluídas neste trabalho foram maioritariamente obtidos de parto vaginal (68.7%).

A tabela 7 estabelece a relação entre o tipo de parto e os parâmetros analisados, observando-se diferenças significativas no valor de TNC inicial por tipo de parto (Fig. 18).

Tabela 7 - Relação entre o tipo de parto e os parâmetros analisados.

	Parto vaginal (n=123)	Parto por cesariana (n=56)	Valor de P
Volume inicial do SCU (mL)	83.7 +/- 23.8	81.3 +/- 17.4	0.437
Volume final do SCU (mL)	20.1 +/- 0,5	20.0 +/- 0,5	0.259
WBC inicial x 10 ⁶ /mL	12.2 +/- 3.0	11.5 +/- 2.8	0.113
WBC final x 10 ⁶ /mL	45.1 +/- 16.4	44.5 +/- 11.9	0.831
Número de células nucleadas totais inicial x 10⁷	100 +/- 0,4	90 +/- 0.2	0.032
Número final de células nucleadas totais x 10 ⁷	90.3 +/- 32.5	89.0 +/- 23.6	0.774
Contagem de CD34 ⁺ totais x 10 ⁶	4.3 +/- 3.0	3.8 +/- 2.3	0.253
Concentração de CD34 ⁺ viáveis/ μ L	222.4 +/- 160.1	200.8 +/- 130.0	0.341
Peso do bebê (gramas)	3313.4 +/- 505.6	3295.0 +/- 463.4	0.818
Idade materna (anos)	31.2 +/- 4.3	31.4 +/- 4.5	0.773

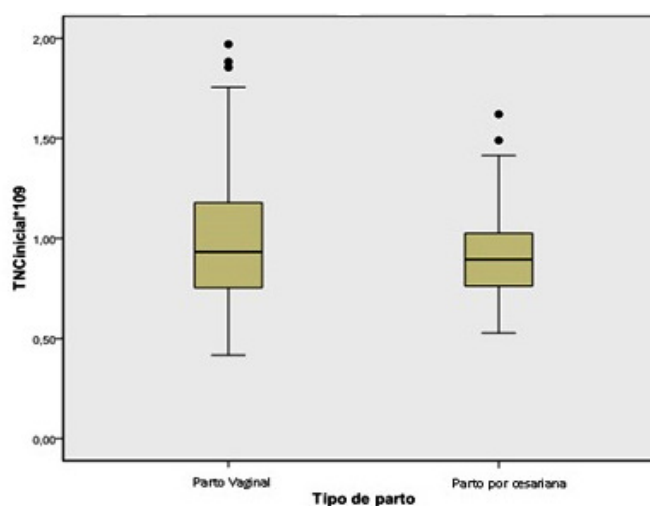


Fig. 18 - Número de células nucleadas totais, por tipo de parto.

4.3. Caracterização da amostra por tempo de gestação

A amostra em estudo foi maioritariamente constituída por SCU com tempo de gestação entre 36 e 40 semanas (Fig. 19).

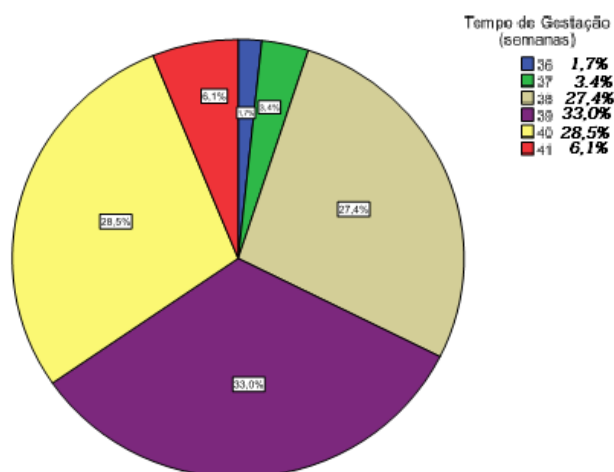


Fig. 19 - Percentagem de unidades de sangue do cordão umbilical por tempo de gestação.

O peso dos bebés variou entre 2280 gramas e 4730 gramas com média de 3307.62 (\pm DP) 490.20 gramas. Há diferenças significativas entre o tempo de gestação e o peso do bebé. Quanto maior o tempo de gestação, maior o peso do bebé (Fig.20).

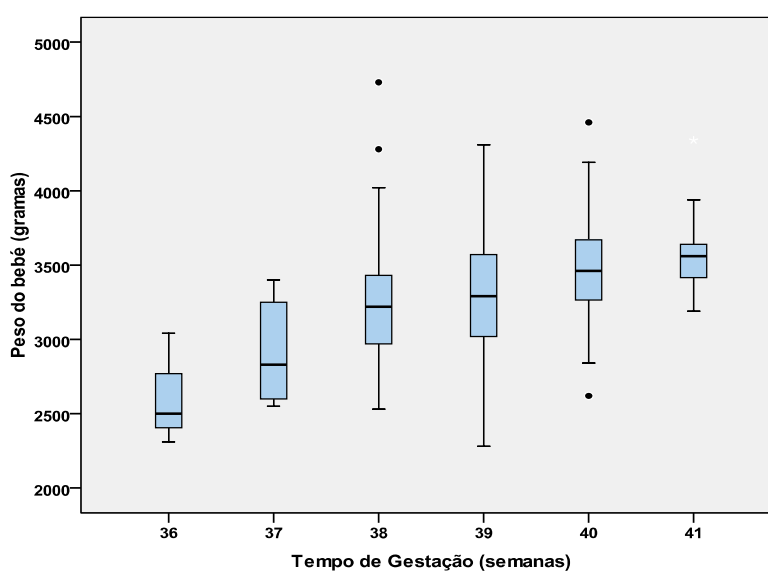


Fig. 20 - Distribuição do peso do bebé pelo tempo de gestação.

Existem correlações estatisticamente significativas entre o volume inicial da unidade e o número de TNC final ($r=0.335$; $p<0.001$), o número de células CD34+ totais ($r=0.343$; $p<0.001$) e viáveis ($r=0.331$; $p<0.001$); entre a idade materna e o número de células CD34+ totais ($r=-0.155$; $p=0.038$) e viáveis ($r=-0.152$; $p=0.042$); e entre o peso do bebê e o volume inicial da unidade ($r=0.179$; $p=0.016$) e o número de TNC final ($r=0.155$; $p=0.038$).

5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As células estaminais do sangue do cordão umbilical apresentam inúmeras aplicações terapêuticas em doenças hemato-oncológicas, justificando-se assim a sua criopreservação para uso alogénico. A possibilidade de expansão, a capacidade de diferenciação nos diferentes tipos celulares e a terapia celular abrem portas à aplicação destas células do SCU a outras patologias que não hematológicas. Neste sentido, surge a controvérsia da criopreservação do SCU em bancos públicos ou privados.

A existência do Banco Público de sangue do cordão umbilical é muito importante na transplantação, pois pode fornecer dadores alogénicos de células estaminais com grande rapidez, devido ao sangue criopreservado estar prontamente disponível para uso, sem necessidade de se aguardar por um dador de medula óssea.

O SCU é particularmente útil em doentes de grupos étnicos minoritários, dado que as exigências de compatibilidade são menores comparativamente às amostras de medula óssea de dadores não aparentados.

A caracterização das unidades do sangue do cordão umbilical facilita a compreensão de factores que afectam a qualidade e a melhoria dos resultados do transplante. Por esta razão, as normas para o processamento, quantificação, manipulação e congelamento estabelecidas na lei devem ser seguidas, a fim de garantir a qualidade e segurança biológica da unidade a ser utilizada.

A transplantação com sangue do cordão umbilical tem sido realizada maioritariamente na pediatria, devido à maior facilidade de encontrar sangue do cordão umbilical mais adequado para pacientes de menor peso (Bambach, 2001).

Não foram encontradas diferenças significativas por género em nenhum dos parâmetros. McGuckin (2007) refere que o único parâmetro que não demonstrou correlação significativa no estudo deles foi o género. Portanto, pode considerar-se que o sexo da criança não interfere com os parâmetros avaliados para a criopreservação do sangue do cordão umbilical.

Existem diferenças significativas entre TNC final por tipo de parto. O valor de TNC é maior no parto vaginal, o que é concordante com o estudo de McGuckin (2007) que refere que o parto vaginal proporciona maior valor de TNC. Omori (2010) observou um valor de TNC relativamente maior no sangue de cordão obtido por parto vaginal.

Urciuoli (2010) refere que a contagem de TNC foi maior no sangue do cordão umbilical de bebés nascidos por parto vaginal, justificando este facto como uma resposta fetal ao *stress* do trabalho de parto.

Há diferenças significativas entre o tempo de gestação e o peso do bebé, tal como esperado, no decorrer de uma gestação normal. Esta variação foi observada neste estudo que abrange bebés com tempo de gestação de 36 a 41 semanas.

Existe correlação entre o número de células CD34⁺ e o volume colhido inicialmente, o que está de acordo com o resultado obtido no estudo de Askari (2005). Este facto, vem comprovar a importância da determinação prévia do volume de sangue do cordão umbilical como parâmetro de inclusão, ou exclusão na criopreservação, dado que este interfere no conteúdo de células CD34⁺, parâmetro determinante no sucesso de transplante de células estaminais do sangue do cordão umbilical.

Encontrou-se correlação estatisticamente significativa entre o volume inicial da unidade e o número de TNC final ($r=0.335$; $p<0.001$). Jan (2008) relata que o TNC está positivamente associado ao volume.

Foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre número de células CD34⁺ totais ($r=0.343$; $p<0.001$) e viáveis ($r=0.331$; $p<0.001$). Quanto maior o número de CD34⁺ totais, maior o número de CD34⁺ viáveis. Portanto, obtendo-se uma contagem maior do número de células CD34⁺ totais, prevê-se que existirá maior número de células CD34⁺ viáveis.

Existe correlação estatisticamente significativa entre a idade materna e o número de células CD34⁺ totais ($r=-0.155$; $p=0.038$) e viáveis ($r=-0.152$; $p=0.042$). Askari (2005) menciona maior contagem de células CD34⁺ com menor idade materna ($p<0.05$). Portanto, será de prever que unidades de sangue do cordão umbilical de filhos de mães mais jovens tenham maior número de células CD34⁺.

Encontrou-se correlação estatisticamente significativa entre o peso do bebé e o volume inicial da unidade ($r=0.179$; $p=0.016$). Mancinelli (2006) cita que o peso do bebé está correlacionado com a obtenção de um maior volume.

Encontrou-se correlação estatisticamente significativa entre o peso do bebé e o número de TNC final ($r=0.155$; $p=0.038$). O peso do recém-nascido está positivamente correlacionado com o valor de TNC (McGuckin, 2007).

Pode concluir-se que os factores obstétricos e o volume inicial interferem com a contagem de células CD34⁺, realçando assim a importância destes parâmetros na selecção das unidades cujo sangue deverá ser criopreservado e no controlo de qualidade dos mesmos.

Este estudo é importante na medida em que permitiu comparar os dados do único banco público português de células estaminais do cordão umbilical com dados internacionais.

De acordo com dados bibliográficos recolhidos durante a realização deste trabalho, demonstrou-se que é mais frequente a realização de transplantes alogénicos de sangue do cordão umbilical, comparativamente a transplantes autólogos. Desta forma, pode dizer-se que é muito importante e benéfico a existência de bancos públicos, que disponibilizam unidades de sangue de cordão umbilical para transplante alogénico a todos os doentes que o necessitem, contrariamente aos bancos privados familiares.

É imprescindível realizarem-se estudos mais aprofundados na área das células estaminais dadas as suas potencialidades. Desta forma, pode obter-se cada vez mais informações acerca da biologia, quantificação e factores que podem afectar as colheitas do sangue do cordão umbilical.

Tendo em vista o crescente uso das células estaminais do sangue do cordão umbilical, o Banco Público de sangue do cordão umbilical está sempre a ser ampliado, proporcionando o aumento da diversidade étnica e permitindo no futuro a identificação de unidades que contemplem as minorias raciais com todos os seus haplótipos (Anderson, 1997).

A medicina regenerativa é outra área de aplicação das células estaminais do sangue de cordão umbilical, nomeadamente as células de origem autóloga. Diversos estudos em patologias como a diabetes, no tratamento de feridas (Kim, 2010; Castilla, 2012), doenças cardiovasculares, na reparação de tecido cardíaco (Boyle, 2006; Goumans, 2012) e doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer

(Abdel-Salam, 2011; Blurton-Jones, 2012) com a reposição celular ou a doença de Parkinson (Lescaudron, 2012) com a produção de células nervosas produtoras de dopamina, trazem uma nova esperança a estes doentes.

6 – BIBLIOGRAFIA

Abdel-Salam, O. M. (2011). *Stem cell therapy for Alzheimer's disease.* CNS & Neurological Disorders Drug Targets.**10**(4):459-485.

Ali, H.; Bahbahani, H. (2010). *Umbilical cord blood stem cells - potential therapeutic tool for neural injuries and disorders.* Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars). **70**(3):316-324.

Ali, M. Y.; Gordon, L. I ; Mehta, J.; Monreal, J.; Oyama, Y.; Singhal, S.; Tallman, M. S.; Williams, S. F.; Winter, J. N. (2003). *Ideal or actual body weight to calculate CD34+ cell doses for autologous hematopoietic stem cell transplantation?* Bone Marrow Transplantation. **31**(10):861-864.

Amittha, W.; Barbara, L., K. (2009). *Molecular Basis of Hematopoiesis.* 1ª Edição, VIII. Editora Springer. Chicago; 48, 49.

Anasetti, C.; Baxter-Lowe, L. A; Confer D. L.; Hurley, C. K.; Karanes, C.; Logan, B.; Weisdorf, D. (2003). *National Marrow Donor Program HLA-matching guidelines for unrelated marrow transplants.* Biology of Blood and Marrow Transplantation. **9**: 610-615.

Anderson, L.; Chin-Yee, I; Keeney, M; Sutherland, D. R. (1997). *Quality Assurance of Stem Cell Enumeration by Flow Cytometry.* Cytometry. **30**(6):296-303.

Askari, S.; Miller, J.; Chrysler, G.; McCullough; J. (2005). *Impact of donor- and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking.* Transfusion. **45**(2):189-194.

Ballen, KK. (2005). *New trends in umbilical cord blood transplantation.* Blood, May; **105**: 3786 – 3792.

Ballen, KK.; Barker, J. N.; Stewart, S. K.; Greene M. F.; Lane, T, A. (2008). *Collection and preservation of cord blood for personal use.* Biology of Blood and Marrow Transplantation. **14**(3): 356-363.

Bambach, B.; Barker, J.; Cairo, M.; Gerson, S. L.; , Koc, ON; Kurtzberg, J.; Laughlin, M. J.; Lazarus, H. M.; Rizzieri, D. A.; Rubinstein, P.; Stevens, C. E.; Wagner, J. E. (2001). *Hematopoietic Engraftment and Survival in Adult Recipients of*

Umbilical-Cord Blood from Unrelated Donors. The New England Journal of Medicine. **344**(24):1815-1822.

Bardey, I.; Garnache, F.; Lapierre, V.; Maddens, S.; Malugani, C.; Pellegrini, N.; Racadot, E.; Saas, P.; Schillinger, F.; (2007). *Cord blood volume reduction using na automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study*. Cytotherapy Journal. **9**(2):165-169.

Berz, D.; Colvin, G., A.; McCormack, E., M.; Quesenberry, P., J.; Winer, Eric S. (2007). *Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells*. *American Journal of Hematology* . **82**(6): 463–472.

Blurton-Jones, M.; Chen, W. (2012). *Can Stem Cells be Used to Treat or Model Alzheimer Disease?* *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.1240.

Boyle, Andrew J.; Hare, Joshua, M.; Schulman, Steven, P. (2006). *Stem Cell Therapy for Cardiac Repair*. *Circulation*. **114**: 339-352.

Brocklebank , A. M.; Sparrow, R. L. (2001). *Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy*. *Cytometry*. **46**(4):254-261.

Cabrita, G. J.; Ferreira, B. S.; da Silva, C. L.; Gonçalves, R.; Almeida-Porada, G.; Cabral, J. M. (2003). *Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor*. *Trends Biotechnology*. **21**(5):233-240.

Cant, A. J.; Galloway, A.; Jackson, G. (2007). *Practical hematopoietic stem cell transplantation*. Editora Blackwell Publishing Limited. Oxford UK. **82**(3): 126–127.

Carbonell-Uberos, F.; Mirabet, V.; Roig, R.; Soler, M. A.; Solves, P. (2006). *Automated separation of cord blood units in top and bottom bags using the Compomat G4*. *Clinical & Laboratory Haematology*. **28**(3):202-207.

Carpenter, C.; Carrier, C.; Cheung, C.; Dobrila, L.; Huang, F.; Rubinstein, P.; Scaradavou, A.; Stevens C. (2000). *Graft selection in unrelated placental/umbilical*

cord blood (PBC) transplantation: influence and weight of HLA match and cell dose on engraftment and survival. *Blood.* **96** (Suppl. 1): 588a.

Castilla, D. M.; Li, Y.; Liu, Z. J.; Livingstone, A. S.; Tian, R.; Velazquez, O. C. (2012). *A novel autologous cell-based therapy to promote diabetic wound healing.* *Annals of Surgery.* **256**(4):560-572.

Davini, E.; Mory, D.; Silva, M. (2008). *Marcadores genéticos e auto-ímmunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática.* *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia.* **52**(2):166-180.

Gajkowska, A.; T. Oldak, T.; Jastrzevska, M.; Machaj, E.K.; Walewski, J.; Kraszewska, E.; Z. Pojda, Z. (2006). *Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods.* *Folia Histochemica et Cytobiologica.* **44**(1): 53-60.

Gerbase-De Lima, M.; Morgun, A.; Neto, J.; Rampim, G.; Shulzhenko, N. (2004). *Polimorfismo do Sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresinha, Piauí.* *Revista da Associação Médica Brasileira.* **50**(4): 422-426.

Gisselø, C. G.; Roer, O.; Hoffmann, M. H.; Hansen, M. B.; Taaning, E.; Johnsen, H. E. (2002). *Assessing agreement between CD34 enumeration by flow cytometry and volumetric analysis.* *Bone Marrow Transplant.* **29**(8):699-703.

Gluckman, E. (2009). *History of cord blood transplantation.* *Bone Marrow Transplant.* **44**: 621–626.

Gluckman, E. (2009). *Ten years of cord blood transplantation: from bench to bedside.* *British Journal of Haematology.* **147**(2):192-199.

Gluckman, E.; Broxmeyer, H. A.; Auerbach, A. D.; et al. (1989). *Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling.* *New England Journal of Medicine.* **321**: 1174-1178.

-
- Gomez, S. G.; Madrigal, J. A.; Pagliuca, A.; Querol, S.; Torrabadella M. (2010).** *Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma.* Bone Marrow Transplantation. **45**, 970–978.
- Goumans, M. J.; Moerkamp, A. T. (2012).** *Cardiac regeneration: stem cells and beyond.* Current Medical Chemistry.
- Hoffbrand, A. V.; Moss, P. A. H., Pettit, J. E. (2004).** *Fundamentos em Hematologia.* 4ª Edição, Editora Artmed.
- Imboden, John, B.; Parslow, Tristram, G.; Stites, Daniel, P.; Terr, Abba, I. (2004).** *Imunologia Médica.* Rio de Janeiro. 10ª Edição. Editora Guanabara Koogan.
- Jan, R. H.; Wen, S. H.; Shyr, M. H.; Chiang, B. L. (2008).** *Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood.* Pediatric Transplantation. **12**(8): 868-873.
- Kim, J. Y.; Song, S. H.; Kim, K. L.; Ko, J. J.; Im, J. E.; Yie, S. W.; Ahn, Y. K.; Kim, D. K.; Suh, W. (2010).** *Human Cord Blood-derived Endothelial Progenitor Cells and their Conditioned Media Exhibit Therapeutic Equivalence for Diabetic Wound Healing.* Cell Transplant. **19**(12):1635-1644.
- Lakatos, M.; Marconi, M. (1996).** *Metodologia Científica.* 3ª Edição. São Paulo.
- Larsen, S. R.; Lévesque, J. P.; Rasko, J. E.; Winkler, I. G. (2007).** *Mobilization of bone marrow-derived progenitors.* Handbook of Experimental Pharmacology. **180**:3-36.
- Laughlin, Mary, J.; Tse, W. (2005).** *Umbilical Cord Blood Transplantation: A New Alternative Option.* American Society Hematology.
- Lescaudron L, Naveilhan P, Neveu I. (2012).** *The use of stem cells in regenerative medicine for Parkinson's and Huntington's diseases.* Current Medical Chemistry.
- Lister, J.; Gryn, J. F.; McQueen, K. L.; Harris, D. T.; Rossetti, J. M.; Shadduck, R. K. (2007).** *Multiple unit HLA-unmatched sex-mismatched umbilical cord blood transplantation for advanced hematological malignancy.* Stem Cells and Development Journal. **16**(1):177-186.
-

Mancinelli, F.; Tamburini, A.; Spagnoli, A.; Malerba, C.; Suppo, G.; Lasorella, R.; de Fabritiis, P.; Calugi, A. (2006). *Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units.* Transplantation Proceedings. **38**(4):1174-1176.

McGuckin, C. P.; Basford, C.; Hanger, K.; Habibollah, S.; Forraz, N. (2007). *Cord blood revelations: the importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother!* Early Human Development Journal. **83**(12):733-741.

Myoung W. L.; In K. J.; Keon H. Y.; Ki W. S.; Hong H. K. (2010). *Stem and progenitor cells in human umbilical cord blood.* International Journal of Hematology. **92**(1):45-51.

NETCORD and FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and release for Administration. (2010). 4^a Edição.

Omori, A.; Manabe, M.; Kudo, K.; Tanaka, K.; Takahashi, K.; Kashiwakura, I. (2010). *Influence of obstetric factors on the yield of mononuclear cells, CD34+ cell count and volume of placental/umbilical cord blood.* Obstetrics and Gynaecology Research Journal. **36**(1):52-57.

Panterne, B.; Richard, M. J.; Sabatini, C.; Pouthier, F.; Mouillot, L.; Bardey, D.; Boulanger, F.; Créa, S.; Dal, Cortivo, L.; Decot, V.; Fleury-Cappellesso, S.; Giraud, C.; Lapiere, V.; Léauté, A. G.; Le Berre, C.; Lemarié, C.; Piard, N.; Rapatel, C.; Rosenzweig, M. (2010). *Quality control of defrosted cord blood units: Results from an inter-laboratory study.* Transfusion Clinique et Biologique. **17**(2):41-46.

Pranke, P.; Hendriks, J.; Alespeiti, G.; Nardi, N.; Rubinstein, P.; Visser, J. (2006). *Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols.* Brazilian Journal of Medical and Biological Research. **39**(7):901-906.

Querol, S.; Mufti, G., J.; Marsh, S.; G., E.; Pagliuca, A.; Little, Ann-Margaret; Shaw, B., E.; Jeffery, R.; Garcia, J.; Goldman, J., M.; Madrigal, J. A. (2009). *Cord*

blood stem cells for hematopoietic stem cell transplantation in the UK: how big should the bank be? Haematologica. **94**(4):536-541.

Roncon, S. (2010). *Qualidade e Segurança na colheita de células de sangue do cordão umbilical.* Revista ABO. **42**.

Silva Junior, F. C. da; Odongo, F. C. A; Dulley, F. L. (2009). *Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas.* Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. **31**(supl.1):53-58. São Paulo.

Takahashi, S.; Ooi, J.; Tomonari, A.; Konuma, T.; Tsukada, N.; Oiwa-Monna, M.; Fukuno, K.; Uchiyama, M.; Takasugi, K.; Iseki, T.; Tojo, A.; Yamaguchi, T.; Asano, S. (2007). *Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen.* Blood Journal. **109**(3):1322-1330.

Urciuoli, P.; Passeri, S.; Ceccarelli, F.; Luchetti, Ba.; Paolicchi, A.; Lapi, S.; Nocchi, F.; Lamanna, R.; Iorio, M.; Vanacore, R.; Mazzoni, A.; Scatena, F. (2010). *Pre-birth selection of umbilical cord blood donors.* Blood Transfusion Journal. **8**:36-43.

Zon, Leonard, I. (2001). *Hematopoiesis: A Developmental Approach.* 1ª Edição. Editora Oxford University Press. New York.