

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e
laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue
de cordão umbilical**

Raquel Lisiane Canabarro

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Helena Lucas Pranke

Dissertação de Mestrado

2006

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e
laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue
de cordão umbilical**

Raquel Lisiane Canabarro

Dissertação de Mestrado

2006

C212a **Canabarro, Raquel Lisiane**

Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical / Raquel Lisiane Canabarro ; orient. Patricia Helena Lucas Pranke. – 2006.

111 f. ; il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2006.

1. Células-Tronco Hematopoiéticas 2. Sangue fetal 3. Imunofenotipagem I. Pranke, Patrícia Helena Lucas II. Título.

NLM: QW 525.5.I36

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas aquelas pessoas que acreditaram em mim, me apoiando, me aconselhando e suportando meus freqüentes surtos.

Para vocês o meu sincero agradecimento, OBRIGADA MESMO!!!

Professora Patricia, incansável orientadora.

Gean, Thaís e Letícia, queridos e imprescindíveis bolsistas.

Heloísa e Silvia, companheiras especialíssimas, detentoras de conselhos preciosos.

Márcia, Sandra, Heloísa, Regina, Andréa, Denise, Janaína, Juliana, Tatiana, Marcelo, João, Luciano, Mara, Cláudia e Ana, colegas queridos.

Iara, sempre disposta “assistente” estatística.

Pai, mãe, Rubia e Biba, presença e amor constante apesar da distância.

Nina e Muni, meu equilíbrio.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu chefe Jorge Neumann pela oportunidade concedida, e ao pessoal do Centro Obstétrico e do Laboratório de Hematologia do HCPA pelas coletas e realização dos hemogramas. À Prof^a Jandyra, do Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS, pela análise estatística. Além do agradecimento ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar esta experiência.

Viver, como talvez morrer, é recriar-se:
a vida não está aí apenas para ser suportada nem vivida, mas elaborada.

Eventualmente programada.

Conscientemente executada.

Muitas vezes, ousada.

Lya Luft

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Características gerais das células-tronco	11
2.1.1 Células-tronco hematopoéticas	11
2.1.2 Características fenotípicas	13
2.1.3 Frequência de células-tronco hematopoéticas no SCUP	14
2.2 Quantificação de células imaturas	15
2.2.1 Padronização de técnicas de quantificação	15
2.2.2 Relevância da quantificação	16
2.3 Importância Clínica	18
2.3.1 Transplante de células de sangue de cordão umbilical	18
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
Immunophenotypic evaluation and physiological and laboratory correlations of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood	34
Avaliação imunofenotípica e correlações clínico-laboratoriais de células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical	67
ANEXOS	101

LISTA DE ABREVIATURAS

SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
CMV	Citomegalovírus
INCA	Instituto Nacional do Câncer
CNT	Células nucleadas totais
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
CTH	Células-tronco hematopoéticas
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
7-AAD	7-amino actinomycin D
REDOME	Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea

1. INTRODUÇÃO

O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) representa uma fonte alternativa de células-tronco hematopoéticas para serem utilizadas no transplante alogênico de pacientes afetados por doenças hematológicas, imunodeficiências hereditárias e doenças metabólicas¹. Atualmente, o transplante utilizando células do SCUP constitui-se no tratamento de escolha para pacientes não-relacionados². Em comparação a outras fontes de células-tronco hematopoéticas, como o sangue periférico e a medula óssea, o SCUP fornece inúmeras vantagens logísticas e clínicas, tais como: 1) disponibilidade imediata de unidades criopreservadas em bancos de SCUP, e que diminuem em média em 25 a 36 dias a espera pelo transplante em relação à medula óssea, 2) extensão do *pool* de doadores devido a tolerância de dois *mismatches* (incompatibilidades no sistema HLA, *Human Leukocyte Antigens*), 3) menor frequência e gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), 4) menor risco da transmissão de infecções latentes tais como citomegalovírus (CMV) e Epstein Barr Vírus (EBV), 5) ausência de riscos ao doador e (6) maior incidência de haplótipos raros comparados aos encontrados nos registros de doadores de medula óssea².

A partir do estabelecimento do primeiro banco de cordão umbilical humano em 1993 pelo Dr. Pablo Rubinstein no *New York Blood Center*³ muitos outros bancos de SCUP vêm sendo organizados em diversas partes do mundo. Atualmente existem mais de 100 bancos de cordão umbilical distribuídos, principalmente, pela Europa, Estados Unidos, Canadá, e Ásia⁴. No Brasil, o primeiro banco público de SCUP foi inaugurado em 2001 pelo INCA (Instituto Nacional de Câncer) no Rio de Janeiro e conta, hoje, com mais de 1200 unidades de SCUP armazenadas (INCA)⁵ e o segundo foi inaugurado no Hospital Albert Einstein em 2004, em São Paulo.

O primeiro transplante utilizando sangue de cordão umbilical e placentário aconteceu há 17 anos, por Gluckman e colaboradores em 1988⁶, e desde então os estudos têm evoluído quanto aos procedimentos de coleta, processamento,

caracterização, quantificação, criopreservação, descongelamento e transporte do SCUP, ao redor do mundo⁷.

Parâmetros comumente utilizados para avaliar uma unidade de SCUP e prever os resultados do transplante têm sido a contagem de células nucleadas totais (CNTs) e de células CD34⁺⁸. O antígeno CD34 é uma glicoproteína de membrana que caracteriza a célula progenitora hematopoética⁹, assim como outros marcadores de superfície celular como o c-kit (CD117). Assim, tem sido utilizado, em vários centros de referência, o marcador CD34⁺ para identificar a célula-tronco hematopoética. Baseando-se na contagem de células CD34⁺, segundo Sandhaus e colaboradores¹⁰, o número necessário destas células para a “pega” do enxerto é de 2x10⁶ por quilograma de peso do paciente. A “pega” refere-se à habilidade das células infundidas gerarem células maduras detectadas na corrente sanguínea¹¹.

Além da presença do CD34, tem sido demonstrado que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ caracteriza a célula candidata a ser a “verdadeira célula-tronco hematopoética” e entre as três fontes disponíveis (medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical) a frequência das células CD34⁺CD38⁻ é maior no sangue de cordão umbilical e placentário^{12,13,14}, explicando o sucesso no uso de SCUP em transplantes¹⁵, visto que estas células são responsáveis pela sobrevida do enxerto, a longo prazo¹⁶.

Como metodologia para uma análise padronizada de células CD34⁺, e utilizada por bancos públicos de SCUP de todo o mundo, Sutherland e colaboradores, em 1996, propuseram o método ISHAGE que se baseia na combinação de características celulares medidas por citometria de fluxo¹⁷. Essa técnica utiliza uma estratégia de *gates* (janelas) seqüenciais os quais permitem a seleção das populações de interesse¹⁸. Este protocolo vem sofrendo modificações através da adição de marcadores de viabilidade celular e contagens absolutas em uma única plataforma¹⁹, aumentando assim a sua sensibilidade.

Embora vários e controversos trabalhos na literatura sugiram um número para a presença de células CD34⁺ em SCUP, no Brasil este tipo de estudo é praticamente inexistente. Calado e colaboradores²⁰ determinaram a presença do antígeno CD34 em apenas 12 amostras de SCUP, Pranke e colaboradores²¹ realizaram uma avaliação da frequência relativa de células CD34⁺ entre as células mononucleares, mas sem uma quantificação sanguínea das células CD34⁺ no SCUP de amostras de pacientes brasileiros. Em relação à avaliação quantitativa de células CD34⁺CD38⁻ no sangue de cordão umbilical não há estudos em amostras de sangue da população brasileira.

Sendo assim, entre os objetivos do estudo está a quantificação das células CD34⁺ de SCUP e avaliação do perfil imunofenotípico do mesmo, quanto à expressão das moléculas CD38 e c-kit. Serão avaliadas também relações entre as variantes que podem modificar o volume ou a concentração de células CD34⁺ no SCUP.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais das células-tronco

2.1.1. Células-tronco hematopoéticas

A célula-tronco hematopoética (CTH) é definida como uma célula com grande capacidade de auto-renovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras de todas as linhagens sangüíneas e a reconstituição da população hematopoética a partir de uma única célula²². Ainda não totalmente esclarecidos, são os mecanismos que permitem que uma célula-tronco pode se dividir originando células filhas que adotam comportamentos diferentes. Uma hipótese seria que essas células sejam distintas uma da outra no momento da divisão devido a mecanismos intrínsecos (expressões gênicas). Outra hipótese propõe que elas possam ser similares no momento da divisão, mas tornam-se distintas através de sinais ambientais, ou seja, fatores extrínsecos²³. Também não totalmente compreendida é a maneira como essas divisões podem ser reguladas *in vitro*. Ho²³ demonstrou que uma das células filhas permanece quiescente ou divide-se muito lentamente, mantendo o estoque de células progenitoras, enquanto a outra multiplica-se exponencialmente produzindo células diferenciadas. Punzel e colaboradores²⁴, demonstraram a importância entre determinantes humorais, tais como citocinas, e as interações entre as células e seu microambiente, no caso o meio de cultura AFT024 (suplemento de fígado fetal de camundongo), como fundamentais para o aumento do número de células em divisão assimétrica através do recrutamento de células quiescentes, provocado pelos mais de 1000 fatores presentes neste meio de cultura celular. Por analogia, Punzel e colaboradores²⁴ também sugerem que uma comunicação direta entre as células-tronco hematopoéticas com o seu microambiente (nicho) é necessária para a manutenção e expansão do potencial de auto-renovação das CTH, já que este possui além de células do estroma (macrófagos, fibroblastos, adipócitos e células endoteliais), moléculas da matriz extracelular e fatores

regulatórios solúveis²⁵. A identificação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessas interações podem levar ao entendimento dos fatores que regulam as divisões das CTHs²³.

As células-tronco da medula óssea parecem possuir capacidade de se diferenciarem em células diferentes de seu tecido de origem, em um mecanismo proposto por transdiferenciação, em que uma célula de uma linhagem em particular é convertida em célula de outra linhagem²⁶. Essa característica é definida como plasticidade da célula-tronco e embora muitos estudos a tenham comprovado, outros ainda não o fazem totalmente. As células da medula óssea são as mais bem caracterizadas nesse sentido e foram as primeiras a terem este potencial identificado, mostrando habilidade em se diferenciarem em células musculares, cardíacas, endoteliais, hepáticas e neurais²⁷. Existem também, na medula óssea, células-tronco mesenquimais (MSC: *mesenchymal stem cells*) capazes de se diferenciarem em células de outros tecidos como adipócitos e osteoblastos. Antigamente chamadas células estromais, as células-tronco mesenquimais formam o microambiente medular e dão suporte à hematopoese²⁵.

Quanto às células do SCUP podemos citar a reduzida resposta imunológica em relação às células do hospedeiro quando comparadas às da medula óssea. Isto se deve, provavelmente, ao menor número de linfócitos T presentes no SCUP e que, desta forma, induzem menor resposta visto que essas células são responsáveis pela aloreatividade^{28,29}. Além disso, as células T presentes no SCUP seriam uma população de células “virgens” ou seja, células que ainda não foram expostas a estimulação antigênica²⁸.

Por fim, apesar de a frequência de CTHs ser similar nas diferentes fontes (produto de aférese, medula óssea e SCUP), as células do SCUP possuem um maior potencial de auto-renovação e geração de clones primitivos *in vitro*³⁰. O potencial de repopulação pode resultar em diferentes propriedades de diferenciação, proliferação e

homing, que é a migração das células hematopoéticas através dos vasos sanguíneos até os nichos da medula. Tem sido sugerido que o transplante utilizando células do SCUP possui homing reduzido o que é compensado, entretanto, pela manutenção das CTHs em seu estado mais imaturo, garantindo os níveis de progenitores por mais tempo³¹. Estudos demonstram que a recuperação hematopoética nos receptores de SCUP é da mesma magnitude dos receptores de medula óssea, apesar da dose de células nucleadas totais (CNTs) no SCUP ser inferior em 1 log à dose de CNTs da medula óssea¹¹.

2.1.2. Características Fenotípicas

O antígeno CD34, uma glicoproteína de membrana de 90 a 120 kDa, é definido como o marcador característico da célula-tronco hematopoética (CTH) mas também pode ser expresso em células endoteliais^{32,33}. Tem sido sugerido que esta molécula funciona regulando a adesão da célula hematopoética às células do estroma do microambiente hematopoético^{32,34}. Como na medula óssea, as células CD34⁺ presentes no SCUP constituem uma população celular muito heterogênea, sendo que a vasta maioria das células expressa CD38 e HLA DR³⁵. A expressão da molécula CD38 identifica uma célula CD34⁺ já comprometida, enquanto que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ identifica uma subpopulação de CTHs mais primitivas⁸, com maior capacidade para gerarem clones e permitirem a expansão de células CD34⁺ em cultura³⁶, além de serem responsáveis pela “pega” do enxerto a longo prazo¹⁶. Tian e colaboradores³⁷ sugerem ainda, que a presença do antígeno CD38 reflete ativação e diferenciação celular, visto que células com o fenótipo CD34⁺CD38⁻ são capazes de se dividir e proliferar in vitro, por longos períodos, sem sofrerem diferenciação.

Goodell³⁸ sugere que o CD34 pode ser um marcador de células-tronco ativadas, já que as células CD34⁻ em cultura dão origem a células CD34⁺. Assim como Dao e

colaboradores³⁹, demonstraram que as células CD34⁺ podem ser reservatórios de células CD34⁻, mostrando que a expressão de CD34 pode ser reversível nas CTHs.

A expressão de Thy-1 também ocorre em CTHs do SCUP, sua função não é bem estabelecida e tem sido sugerida estar envolvida na inibição da proliferação celular⁴⁰. O fenótipo CD34⁺, CD45RA^{low}, CD71^{low} também tem sido descrito como característico de células primitivas no SCUP⁴¹. CTHs expressam, ainda, o marcador CD133 que tem sido utilizado para caracterizar células mais imaturas, visto que sua expressão ocorre antes de o CD34 ser detectado na superfície celular⁴². Também tem sido demonstrado que as células CD133⁺ possuem alto potencial de expansão *ex vivo*⁴³.

A molécula CD117, ou c-kit, é o receptor de fator de crescimento de célula-tronco (SCF: *stem cell factor receptor*) o qual possui um papel relevante na viabilidade e proliferação das CTHs^{44,45}. A expressão deste marcador tem sido relatada para caracterizar as CTHs primitivas⁴⁶, já que a presença desta molécula pode ser encontrada na maioria das células CD34⁺⁴⁷. O fenótipo CD34⁺CD117^{low} tem sido usado para descrever células progenitoras quiescentes, baseando-se no fato de que a baixa expressão do c-kit na superfície celular poderia “proteger” a célula, impedindo-a de receber estímulos e diferenciar-se, caracterizando-se assim como uma célula mais primitiva⁴⁸.

2.1.3 Frequência de células-tronco hematopoéticas no sangue de cordão umbilical

Aproximadamente 1% a 3% das CNT da medula óssea expressam o antígeno CD34^{17,49,50}. No SCUP, o número de células CD34⁺ foi encontrado como sendo ao redor de 1 a 2 % entre as células mononucleares^{51,52,53,54}. No sangue periférico, o percentual das células CD34⁺ é menor, variando de 0,01 a 0,1%¹⁷. Entretanto, a frequência de células imaturas que apresentam o fenótipo CD34⁺CD38⁻, tem-se mostrado maior no SCUP do que na medula óssea. Segundo Cardoso e colaboradores⁵⁵, no SCUP observa-se aproximadamente 4% dessas células entre as CD34⁺ enquanto que na

medula óssea encontra-se ao redor de 1% de células CD34⁺CD38⁻ entre as CD34⁺. Esses números, no entanto, são bastante variáveis e difíceis de determinar, prova disso é a grande controvérsia encontrada na literatura. Campagnoli e colaboradores⁵⁶, demonstraram que entre as células CD34⁺, 3,9±0,9% eram células CD34⁺CD38⁻ e, similarmente, Pranke e colaboradores⁵⁴ encontraram 2,6± 2,1 % de células CD38 negativas entre as células CD34⁺. No entanto, já foi demonstrado que entre as células CD34⁺, 11,94±2,09%⁴², 13,9%⁵⁷, 16±8,8%⁵⁸ ou 67,9±7,2%¹², seriam células CD38 negativas. Malangone e colaboradores⁸ demonstraram, em coletas fracionadas de SCUP, que a primeira fração apresentou 1,61±1,12% de células CD34⁺CD38⁻ em comparação à última que mostrou 18,98±13,96% destas células, provavelmente pela obtenção de células imaturas residuais presentes na placenta.

Outro marcador importante na caracterização das CTHs é o CD117, ou c-kit. A descrição da expressão desse marcador também possui resultados controversos, variando desde sua presença em mais de 50% das células CD34⁺^{59, 54}, expressão em baixo nível em precursores mais primitivos⁶⁰ até a não expressão deste marcador⁶¹. McGuckin e colaboradores⁴², em um estudo avaliando a expressão de antígenos de superfície e intracitoplasmáticos, observaram que entre as células contendo CD34 intracitoplasmático (int CD34) e ainda não expresso na superfície, 86,36±7,83% são positivas para o CD117.

2.2 Quantificação de células imaturas

2.2.1 Padronização de técnicas de quantificação

Sutherland e colaboradores¹⁷, em 1995, desenvolveram um método sensível utilizando 4 parâmetros: tamanho, complexidade, CD34 e CD45, avaliados por citometria de fluxo através de uma estratégia de *gates* sequenciais e que mostrou ser capaz de detectar 1 célula CD34⁺ entre 10.000 células. Este método constitui-se na base das diretrizes para a quantificação de CD34⁺, conhecido como protocolo ISHAGE

(*International Society of Hematotherapy and Graft Engineering*), hoje denominado protocolo ISCT (*International Society for Cellular Therapy*)⁶². Esse protocolo vem sofrendo modificações com o intuito de aperfeiçoar ainda mais as técnicas de análise e obtenção de quantificações mais exatas. Desse modo, Gratama e colaboradores⁶³ introduziram o marcador de viabilidade celular 7AAD (7-Amino Actinomycin D) para a determinação do número de células CD34⁺ viáveis e inviáveis⁶⁴. Em 2001, Brocklebank e Sparrow¹⁹, descreveram um protocolo que combina os atributos do método ISHAGE, do uso do 7AAD e dos tubos Trucount (BD) (tubos contendo pérolas liofilizadas com concentração conhecida), fornecendo um método confiável, rápido e que utiliza uma única plataforma para sua realização, possibilitando quantificação absoluta e viabilidade celular em uma mesma técnica e em um mesmo equipamento.

Como o número de células CD34⁺ por quilograma de peso do receptor é um importante fator para a reconstituição hematopoética pós-transplante¹⁸, o uso de técnicas capazes de fornecerem resultados fidedignos é imprescindível nos locais que realizam esta quantificação. Por se tratar da busca de eventos raros, dada a baixa frequência de células CD34⁺, existe a necessidade da utilização de técnicas uniformizadas e bem estabelecidas⁶⁵. Ainda, com a utilização de metodologias que excluam células mortas ou em apoptose, através do uso do 7AAD, pode-se aumentar o potencial de “pega” e melhorar a qualidade de unidades de SCUP criopreservadas para garantir o sucesso do transplante⁶².

2.2.2 Relevância da quantificação

A quantidade de células nucleadas presentes nas fontes de células hematopoéticas é de fundamental importância para a recuperação mielóide, linfóide e plaquetária nos transplantes de CTHs, assim como na sobrevida pós-transplante²⁹. Gluckman e colaboradores² sugerem que o número de CNT infundidas seja maior ou igual a 2×10^7 /kg de peso corporal do receptor. Um valor adequado de células aumenta a

probabilidade da “pega” do enxerto, o que, conseqüentemente, melhora a sobrevida do receptor. De acordo com Campagnoli e colaboradores⁵⁶ o número absoluto de células nucleadas, e que expressam o marcador leucocitário CD45⁺, presentes do SCUP é de $11,9 \pm 1,3 \times 10^6/\text{mL}$.

O número de células CD34⁺ também é um fator importante no transplante de CTHs, pois tem sido sugerido haver correlação entre o número dessas células com as células nucleadas totais e a quantidade de células CD34⁺⁶⁶. Porém, as células CD34⁺ podem representar apenas 0,1% entre as CNTs⁶⁷. Outros autores encontraram grande variação destas células, variando de 0,4 a 4,9% entre as células mononucleares⁵⁴ ou de 22 a 600 de células CD34/ μL ¹⁹ no SCUP. Estudos visando estabelecer o papel da quantidade de células CD34⁺ demonstram que uma dose exata ainda não é conhecida e que este fator pode sofrer variações dependendo da fonte de CTHs, do tipo de doador, se aparentado ou não aparentado, do número de alelos HLA incompatíveis e do tipo de doença do receptor⁶⁸. Trabalho recente de Gluckman e colaboradores², no entanto, sugerem que um mínimo de 2×10^5 CD34⁺/Kg seja utilizado, visto que altas doses de células CD34⁺ resultam em aumentada recuperação mielóide e plaquetária⁶⁹, já que outros dados evidenciam que uma “pega” mais lenta seja devida às baixas contagens de células primitivas CD34⁺⁶².

Em relação à quantidade de células CD34⁺ no SCUP observa-se uma grande variação nos resultados encontrados na literatura. Essa variação pode ser explicada pelo fato de que essa freqüência é heterogênea por natureza⁶⁷ ou pela associação com fatores como idade gestacional, volume de SCUP coletado, tipo de parto, sexo e peso do recém nascido, comprimento do cordão, tipo de coleta (se intra ou extra-uterina), idade materna ou diferenças étnicas. Uma das associações mais observadas até o momento é em relação à idade gestacional, onde se verifica uma correlação inversa entre o número de células CD34⁺ por microlitro de SCUP e a idade gestacional^{69,67,70}. No entanto, um recém-nascido com maior peso, mãe mais jovem e bebês do sexo

masculino mostraram maior concentração de células CD34⁺, segundo estudos de Nakagawa⁷⁰ e Aroviita e seus colaboradores⁷¹. O volume de SCUP coletado possui correlação com o número de CNTs⁷² e o número absoluto de células CD34⁺ mostrou-se correlacionado com um maior volume proveniente de partos cesareanos^{73,72,7}. Fatores como idade gestacional avançada, parto cesareano⁷⁴, coleta intra-útero⁷⁵, mães caucasianas, cordão mais longo e um tempo curto entre o parto e a coleta podem aumentar o volume coletado, aumentando, conseqüentemente, o número de células nucleadas totais e, possivelmente, de células CD34⁺⁷².

No que refere ao percentual de células CD34⁺CD38⁻, como mencionado anteriormente, existe grande divergência de dados o que pode ser explicado pela dificuldade em se analisar eventos tão raros. Além disso, os fatores que afetam o número de células CD34⁺ poderiam influenciar, também, o número de células CD34⁺CD38⁻ no SCUP. A variação em relação à idade gestacional já foi indicada ser um fator inversamente proporcional ao número de células CD34⁺CD38⁻ no SCUP⁶⁹. Cairo e colaboradores⁶⁶ encontraram valores dessas células em números bem menores em mães africanas e asiáticas.

2.3 Importância Clínica

2.3.1 Transplante de células de sangue de cordão umbilical

O sangue do cordão umbilical se constitui em uma fonte muito rica de células hematopoéticas e que pode ser utilizada para reconstituir o sistema sangüíneo⁷⁶. Desde o primeiro transplante utilizando células do SCUP, realizado em 1988 por Gluckman e colaboradores⁶ para tratar um paciente com anemia de Fanconi, seu uso vem se estendendo para o tratamento de doenças hematopoética, imunodeficiências e doenças metabólicas^{29,1}. Vantagens como a possibilidade de utilização de unidades de SCUP com mais de 2 alelos incompatíveis para o sistema HLA, ocasionando menor incidência e gravidade da DECH, devido à presença de células imunologicamente

mais imaturas⁷⁷, têm aumentado significativamente o número de pacientes que podem se beneficiar deste procedimento. Cada vez mais transplantes entre pacientes não relacionados, em crianças e adultos vêm sendo realizados. Essa característica faz do SCUP uma boa alternativa em relação à medula óssea que tem como principal limitação a disponibilidade de doadores. Além do que, para o uso da medula óssea como fonte de CTHs a compatibilidade total é requerida para a maioria das doenças a serem tratadas²⁸ e isto pode retardar imensamente a busca por um doador adequado. Nos Estados Unidos, por exemplo, somente 30% dos receptores possuem um doador de medula óssea relacionado compatível e, dos restantes, apenas 20% realizam o transplante com um doador não aparentado ou com doador aparentado não idêntico⁷⁸.

Atualmente, um número cada vez maior de casos vêm sendo estudados no intuito de se comparar o uso do SCUP com outras fontes de CTHs, principalmente a medula óssea, no que refere ao seu potencial de “pega”, indução de DECH, reconstituição imune, efeito do enxerto contra o tumor, sobrevida do paciente em relação à dose utilizada e ao número de alelos HLA incompatíveis. Como principal vantagem do SCUP podemos apontar a rápida disponibilidade da unidade, que uma vez localizada pode ser prontamente utilizada reduzindo o tempo de aproximadamente 4 meses na busca de um doador de medula para ao redor de 13,5 dias na busca de uma unidade de SCUP doada^{28,29,79}. Em relação à “pega”, estudos sugerem que seja utilizado no mínimo $1,5 \times 10^7$ células nucleadas/Kg de peso do receptor⁸⁰ para reduzir o tempo de recuperação hematopoética. Rubinstein e colaboradores⁸¹ concluíram que doses acima de 3×10^7 CNT/Kg podem compensar o efeito negativo de 1 alelo HLA incompatível. O risco de desenvolver DECH aguda e crônica em receptores de SCUP com até dois alelos HLA incompatíveis é similar ao de receber a medula óssea de um doador HLA idêntico²⁹, assim como o tempo de sobrevida livre de doença⁸² mostrou-se semelhante.

Entretanto, apesar de o sangue de cordão umbilical configurar uma boa alternativa para ser utilizada no transplante alogênico, o número de células imaturas é limitado pelo volume de sangue que é possível coletar, o que pode ocasionar o retardamento da “pega” do transplante, principalmente em pacientes adultos. No entanto, Laughlin e colaboradores⁷⁸ concluíram que o SCUP pode ser utilizado como alternativa em pacientes adultos quando não se tem um doador de medula óssea idêntico. Desta forma, muito se tem pesquisado no sentido de se conseguir expandir estas células *in vitro*⁷⁷ baseando-se no potencial proliferativo das células CD34⁺CD38⁻ presentes no SCUP^{30,54}. Outra alternativa, seria a utilização de mais de uma unidade de SCUP para aumentar a “pega” do enxerto. Barker e colaboradores⁸³ mostraram que esta técnica propiciou rápida recuperação hematopoética e quimerismo total de uma das unidades no dia 100 pós-transplante, ou seja, no mínimo 90% de células do doador presentes no receptor, confirmando a “pega” do transplante.

Assim, tendo em vista o crescente uso das células do SCUP é que se faz necessária a ampliação da rede de bancos públicos para o armazenamento destas células, já que quanto mais unidades armazenadas maior a diversidade étnica que pode ser atingida permitindo, no futuro, a identificação de unidades que contemplem as minorias raciais com todos os seus haplótipos⁸⁴. No Brasil, por exemplo, as chances de se localizar um doador em território nacional é trinta vezes maior do que a chance de encontrar o mesmo doador no exterior, segundo pesquisa realizada pelo Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME – INCA)⁵.

Devido à importância de melhorar o conhecimento sobre a biologia das CTH e em relação à quantificação das mesmas, o presente trabalho teve por objetivos contribuir para o aperfeiçoamento das técnicas de quantificação das células-tronco do sangue de cordão umbilical e de sua biologia, além de fornecer dados relativos à população local. Isso poderá ajudar na escolha adequada de uma amostra de SCUP a

qual é importante para o sucesso do transplante e, conseqüentemente, para a sobrevida do paciente.

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente muito se tem investigado sobre os diversos aspectos envolvidos na manipulação, quantificação, protocolos de expansão, biologia, técnicas de congelamento e critérios de escolha de unidades de sangue de cordão umbilical. Em nosso país, entretanto, estudos envolvendo valores de células-tronco imaturas em amostras brasileiras são escassos. Estudos avaliando a quantificação de células CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁺ e suas relações com variáveis que podem alterar suas concentrações são inexistentes no Brasil. Além disso, os laboratórios que quantificam essas células geralmente não fazem uso de marcadores de viabilidade celular obtendo, portanto, resultados super estimados. Assim, células mortas ou em apoptose podem ser contabilizadas como sendo células CD34⁺, quando na realidade podem ser células que não estão aptas a auxiliarem na “pega” do transplante, por já terem iniciado seu processo de morte celular programada.

Visando descrever esses dados em populações locais, conhecendo a distribuição de células imaturas em uma amostra de nossa população através da quantificação utilizando protocolos confiáveis é que o presente estudo encontra sua justificativa. Amostras com concentrações de células-tronco hematopoéticas bem estabelecidas são cruciais para a manutenção da qualidade das unidades disponíveis a serem utilizadas nos transplantes. Além disso, por se tratar de um tema recente, em que toda informação pode ser importante, espera-se contribuir para que se conheça um pouco mais sobre essas células e sua distribuição no que se refere ao número e o perfil imunofenotípico das células-tronco hematopoéticas presentes no SCUP.

4. OBJETIVOS

4.1. Avaliar o perfil imunofenotípico e a quantificação de células CD34⁺, CD38⁻ e c-kit (CD117) no sangue de cordão umbilical.

4.2. Verificar a relação entre o volume coletado e o tipo de parto, comprimento do cordão, idade gestacional e idade da mãe, peso e sexo do recém-nascido. Além da relação entre o volume e a frequência de CNTs, células CD34⁺ por microlitro de sangue e percentual entre as células CD45⁺, células CD34⁺CD38⁻ e células CD34⁺CD117⁺ e CD34⁺CD117⁻.

4.3. Verificar a correlação entre os resultados obtidos pelo hemograma e suas relações com as variáveis estudadas: volume, idade gestacional e materna, comprimento do cordão, peso e sexo do recém-nascido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wagner JE, Barker JN, DeFork TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldmann A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NKC, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. **Blood**, v.100, p.1611-1618, 2002.
2. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human Leucocyte Antigen Matching in Cord Blood Transplantation. **Seminars in Hematology**, v.42, p.85-9, 2005.
3. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, Taylor PE, Stevens CE. Processing and cryopreservation of placental /umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 92, p.10119-10122, 1995.
4. Gunning J. A worldwide study of umbilical cord cell banking. Opinion of the European Group on Ethics in Science and New Technologies to the European Commission, 2004.
5. Instituto Nacional do Câncer (INCA). www.inca.gov.br/conteúdo/BSCUP.
6. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England Journal of Medicine**, v.321, p.1174-1178, 1989.
7. Bradley MB, Cairo MS. Cord Blood Immunology and Stem Cell Transplantation. **Human Immunology**, v. 66, p.431-446, 2005.
8. Malangone W, Belvedere O, Astori G, Adami V, Donini A, Falasca E, Sala PG, Del Frate G, Pittino M, De Anna D, Degrossi A. Increased content of CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in the last collected umbilical cord blood. **Transplantation Proceedings**, v.33, p.1766-1768, 2001.

9. Mayani H, Landsdorf PM. Biology of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**, v.16, p.153-165, 1998.
10. Sandhaus LM, Edinger MG, Tubbs RR, Goormastic M, Baucoco PA, Serafino SE, Bolwell BJ. A simplified method of CD34⁺ cell determination for peripheral blood progenitor cell transplantation and correlation with clinical engraftment. **Experimental Hematology**, v.26, p.73-78, 1998.
11. Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, Bacigalupo A, Piaggio G, Locatelli F. Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. **Blood**, v.102 (3), p.1138-1141, 2003.
12. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Brenier M, Massy M, Ley P, Hemptinne D, Stryckmans, P. Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34⁺ purified cells from human cord blood and bone marrow. **Stem Cells**, v.13, p.281-288, 1995.
13. Timeus F, Crescenzo N, Marranca D, Dall'Aglio M, Fazio L, Di Marco M, Saracco P, Ricotti M, Gabutti V. Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. **Bone Marrow Transplant**, v.22(1), p.61-62, 1998.
14. Cho SH, Chung IJ, Lee JJ, Park ML, Kim HJ. Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood. **Journal of Korean Medical Science**, v.14, p.520-525, 1999.
15. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, Tonutti E, Rinaldi C, Pittino M, Baccarani M, Del Frate G, Biffoni F, Sala P, Hilbert DM, Degrossi A. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34⁺ cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.25, p.141-146, 1999.
16. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34⁺ CD38⁻. **Leukemia**, v.17, p. 960-964, 2003.

17. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cells determination by flow cytometry. **Journal of Hematotherapy**, v.5, p. 213-226, 1996.
18. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van Der Schoot CE, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem progenitors cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. **Cytometry**, v.34 (3), p.128-42, 1998.
19. Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. **Cytometry**, v.46, p.254-251, 2001.
20. Calado RT, Garcia AB, Falcão RP. Age-related changes of immunophenotypically immature lymphocytes in normal human peripheral blood. **Cytometry**, v.38, p.133-137, 1999.
21. Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibel G, Schmidt F, Nardi NB. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. **Acta Haematologica**, v.105, p.71-76, 2001.
22. Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: **Williams Hematology**. Beutler E, Coller BS, Lichtman M A, Kipps TJ, Seligsohn U. eds. 6th. ed., New York, McGraw-Hill, 2001, 153-174.
23. Ho AD. Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, v.33, p.1-8, 2005.
24. Punzel M, Liu D, Zhang T, Eckstein V, Miesala K, Ho AD. The symmetry of initial divisions of human hematopoetic progenitors is altered only by the cellular microenvironment. **Experimental Hematology**, v.31, p.339-347, 2003.
25. Nardi NB, Alfonso ZZ. The hematopoietic stroma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32 (5), p.601-609, 1999.

26. Moore BE, Quesenberry PJ. The adult hemopoetic stem cell plasticity debate: idols vs new paradigms. **Leukemia**, v.17, p.1205-1210, 2003.
27. Jackson KA, Majka SM, Wulf GG, Goodell MA. Stem cells: a minireview. **Journal of cellular biochemistry supplement**, v.38, p.1-6, 2002.
28. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? **Blood**, v.101 (11), p.4233-4244, 2003.
29. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. **Blood**, v.102, p.1915-1919, 2003.
30. Theunissen K, Verfaillie CM. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. **Experimental Hematology**, v. 33, p.165-172, 2005.
31. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? **Blood**, v.106, p.1901-1909, 2005.
32. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. **Journal of Hematotherapy**, v.2, p.137-144, 1993.
33. Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. **Nature Immunology**, v.3, p.314-317, 2002.
34. Sutherland DR, Keating A. The CD34 antigen: structure, biology and potential clinical applications. **Journal of Hematotherapy**, v.1, p.115-129, 1992.
35. Caux C, Favre C, Saeland S, et al. Sequential loss of CD34 and class II MHC antigens on purified cord blood hematopoietic progenitors cultured with IL-3: characterization of CD34⁺, HLA-DR⁺ cells. **Blood**, v.74, p.1287-1294, 1989.
36. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. CD34⁺CD38⁻ is a good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34⁺ cord blood cells. **Transfusion**, v.43, p.383-389, 2003.

37. Tian H, Huang S, Gong F, Tian L, Chen Z. Karyotyping, immunophenotyping, and apoptosis analyses on human hematopoietic precursor cells derived from umbilical cord blood following long-term ex vivo expansion. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.157, p.33-36, 2005.
38. Goodell MA. CD34⁺ or CD34⁻: Does it really matter? **Blood**, v.94 (8), p.2545-2547, 1999.
39. Dao MA, Arevalo J, Nolta JA. Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution. **Blood**, v.101(1), p.112-118, 2003.
40. Mayani H, Landsdorf PM. Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood. **Blood**, v.83, p.2410-2417, 1994.
41. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34⁺ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. **Blood**, v.82, p.2664-2672, 1993.
42. McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. **European Journal of Haematology**, v.71, p.341-350, 2003.
43. Bonanno G, Perillo A, Rutella S, De Ritis DG, Mariotti A, Marone M, Meoni F, Scambia G, Leone G, Mancuso S, Pierelli L. Clinical isolation and functional characterization of cord blood CD133⁺ hematopoietic progenitor cells. **Transfusion**, v.44(7), p. 1087-97, 2004.
44. Berardi AC, Wang A, Levine JD, et al. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. **Science**, v.267, p.104-108, 1995.
45. Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. **Blood**, v.90 (4), p.1345-1364, 1997.

46. Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. **Blood**, v.78, p.1403-1412, 1991.
47. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, et al. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expresión on CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. **Haematologica**, v.83, p.587-592, 1998.
48. Ikehara S. Pluripotent hemopoetic stem cells in mice and humans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.223, p.149-155. 2000.
49. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines. **Cytometry**, v.34, p.61-70, 1998.
50. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cells. **Clinical Laboratory Haematology**, v.21, p.301-308, 1999.
51. Kinniburgh D, Russell NH. Comparative study of CD34 positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. **Bone Marrow Transplantation**, v.12, p.489-494, 1993.
52. Fritsch G, Stimpfl M, Buchinger P. Does cord blood contain enough progenitor cells for transplantation? **Journal of Hematotherapy**, v.3, p.291-298, 1994.
53. Van Epps DE, Bender J, Lee W. Harvesting, characterization, and culture of CD34⁺ cells from human bone marrow, peripheral blood and cord blood. **Blood Cells**, v.20, p.411-423, 1994.
54. Pranke P, Hendriks J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, Visser JWM. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38(12), p.1775-1789, 2005

55. Cardoso AA, Li ML, Batard P, Sansilvestri P, Hatzfeld A, Levesque JP, Lebkowski JS, Hatzfeld J. Human umbilical cord blood CD34⁺ cell purification with high yield of early progenitors. **Journal of Hematotherapy**, v.2 (2), p. 275-279, 1993.
56. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. **Blood**, v.95, p.1967-1972, 2000.
57. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. **Blood**, v.86, p.3745-3753, 1995.
58. Timeus F, Crescenzo N, Basso G, Ramenghi U, Saracco P, Gabutti V. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. **Stem Cells**, v.16, p. 120-126, 1998.
59. Anderson DM, Lyman SD, Baird A, et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hemopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. **Cell**, v.63, p.235-242, 1990.
60. Xiao M, Oppenlander BK, Plunkett JM, Dooley DC. Expression of Flt3 and c-kit during growth and maturation of human CD34⁺CD38⁻ cells. **Experimental Hematology**, v.27, p.916-927, 1999.
61. Sakabe H, Yahata N, Kimura T, Zeng ZZ, Minamiguchi H, Kaneko H, Mori KJ, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Toyama K, Abe T, Sonoda Y. Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched in CD34⁺c-kit⁻ cells: correlation between long-term culture-initiating cells and telomerase expression. **Leukemia**, v.12, p.728-734, 1998.
62. Keeney M, Gratama JW, Sutherland R. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. **Cytometry**, v.58A, p.72-75, 2004.
63. Gratama JW, Keeney M, Sutherland DR. Enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. **Current Protocols Cytometry**, unit 6.4, 1999.

64. Keeney M, Sutherland DR. Stem cell enumeration by flow cytometry: current concepts and recent developments in CD34⁺ cell enumeration. **Cytotherapy**, v.2, p.395-402, 2000.
65. Sutherland DR, Keeney M, Gratama JW. Enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. **Current Protocols in Cytometry**, sup 25, unit 6.4.1-6.4.23, 2003.
66. Cairo MS, Wagner EL, Fraser J, Cohen G, Van de Vem C, Carter SL, Kernan NA, Kurtzberg J. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: A Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. **Transfusion**, v.45 (6), p.856-866, 2005.
67. Yap C, Loh MT, Heng KK, Tan P, Yu SL, Chan SH, Ren EC. Variability in CD34⁺ cell counts in umbilical cord blood: implications for cord blood transplants. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v.50, p.258-259, 2000.
68. Heimfeld S. Bone marrow transplantation: how important is CD34 cell dose in HLA-identical stem cell Transplantation? **Leukemia**, v.17, p.856-858, 2003.
69. Gasparoni A, Ciadella L, Avanzini MA, Bonfichi M, Di Mario M, Piazzzi G, Martinotti L, Vanelli L, Rondini G, Chirico G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. **Pediatric Research**, v.47, p.825-829, 2000.
70. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuka H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakayama T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34⁺ cell yield for cord blood banking. **Transfusion**, v.44, p.262-267, 2004.
71. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood progenitor cell concentration and infant sex. **Transfusion**, v.45, p.613-621, 2005.

72. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v.188 (2), p. 503-509, 2003.
73. Yamada T, Okamoto Y, Kasamatsu H, Horie Y, Yamashita N, Matsumoto K. Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 79, p. 830-833, 2000.
74. Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J. Impact of donor-and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking. **Transfusion**, v.45, p.189-194, 2005.
75. Solves P, Mirabet V, Larrea L, Moraga R, Planelles D, Saucedo E, Uberos FC, Planells T, Guillen M, Andrés A, Monleon J, Soler MA, Franco E. Comparison between two cord blood collection strategies. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.82, p.439-442, 2003.
76. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.18, p.893-908, 2004.
77. Cohena Y, Nagler A. Hematopoietic stem-cell transplantation using umbilical cord blood. **Leukemia Lymphoma**, v.44, p.1287-99, 2003.
78. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, Van Hood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.351 (22), p.2265-2275, 2004.
79. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.48, p.35-43, 2003.
80. Gluckman E. Hematopoietic stem cell transplants using umbilical cord blood. **New England Journal Medicine**, v.344, p.1860-1861, 2001.

81. Rubinstein P, Carrier C, Carpenter C, et al. Graft selection in unrelated placental/umbilical cord blood (PCB) transplantation: influence and weight of HLA match and cell dose on engraftment and survival (abstract). **Blood**, v.96, p.588, 2000.
82. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. **Blood**, v.97, p.2962-2971, 2002.
83. Barker JN, Weisdorf DJ, De For TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with Hematologic malignancy. **Blood**, v.105 (3), p.1343-1345, 2005.
84. Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, et al. Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. **Cytometry**, v.30, p.296-303, 1997.

**Immunophenotypic evaluation and physiological and laboratory correlations of
hematopoietic stem cells of umbilical cord blood**

R.L. Canabarro^{1,2}, H. Sporleder², T. Gomes^{3,5}, G. Zanatta^{3,6}, L. Scribel^{3,7}, F. Freitas⁸, J. Neumann², P. Pranke^{1,3,4}

¹ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Medical School, UFRGS

² Laboratory of Transplant Immunology, Santa Casa of Porto Alegre

³ Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, UFRGS and ⁴ PUCRS

⁵ Scientific Initiation Student, PROPESQ/UFRGS, ⁶ FAPERGS and ⁷ CNPq

⁸ Service of Gynecology and Obstetrics, Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Brazil

Financial Support:

FAPERGS and PROPESQ/UFRGS

Mailing address:

rlcanabarro@yahoo.com.br

Keywords: hematopoietic stem cells, immunophenotyping, placental/umbilical cord blood

Abstract

The use of umbilical cord blood stem cells is an efficient alternative for the transplantation of hematopoietic progenitor cells. A number of factors can influence the volume and amount of CD34⁺ cells, which are considered as immature and capable of proliferation. Quantification of CD34⁺ cells, evaluation of CD38 and CD117 (c-kit) molecules on these cells, as well as correlations of such factors as maternal age, gestational age, newborn sex and weight, umbilical cord length, placental weight with increased volume and concentration of immature cells, among others, were performed in 70 blood samples from term newborns, obtained at the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. The mean volume of umbilical cord blood collected was 53.8±33.6 mL, where 30.96±18.9 CD34⁺/μL UCB cells were found, of which 16.66±8.32% were CD34⁺CD38⁻ cells, 52.77±24.0% were CD34⁺CD117⁺ cells, and 47.23±24.0% were CD34⁺CD117⁻ cells. Newborn weight and placental weight were positively correlated with increased volume of collected UCB. The volume of collected blood was found to affect the absolute count of CD34⁺ cells and the relative value of these among total nucleated cells, as well as the percentage of CD34⁺CD117⁺ and CD34⁺CD117⁻ cells. CD34⁺ cells were positively correlated with leukocytes, and gestational age was negatively correlated with the number of CD34⁺ cells. Our results confirm that these factors may be related to the higher number of hematopoietic stem cells, which are crucial for successful transplantation.

Introduction

The umbilical cord blood (UCB) represents an alternative source of hematopoietic stem cells (HSC) for use in allogeneic transplantation of patients affected by hematological disorders, inherited immunodeficiencies, and metabolic diseases¹. As compared to other sources of hematopoietic stem cells, like peripheral blood and bone marrow, the UCB offers numerous logistic and clinical advantages such as: 1) immediate availability of cryopreserved units in public UCB banks, and which decrease an average 25-36 days the wait for transplantation as compared to bone marrow, 2) extension of the pool of donors due to the tolerance of up to two mismatches in the Human Leukocyte Antigens (HLA) system, 3) lower frequency and severity of the graft-versus-host disease (GVHD), 4) lower risk of transmission of latent infections such as cytomegalovirus (CMV) and Epstein Barr Virus (EBV), 5) absence of risk to the donor, and 6) higher incidence of rare haplotypes than those found in the records of bone marrow donors². Thus, this source of stem cells has been successfully replacing bone marrow and apheresis in transplants, such that in many countries the transplants using UCB has outnumbered those with other sources of stem cells.

The first transplantation using UCB was performed 17 years ago by Gluckman et al. ³, in 1988. Since then, the studies have progressed as to the procedures of collection, processing, characterization, quantification, cryopreservation, thawing, and transportation of UCB around the world ⁴.

Parameters commonly used to evaluate a UCB unit and predict transplant outcomes have been total nucleated cells (TNCs) and CD34⁺ ⁵ cells counts. CD34 antigen is a membrane glycoprotein that characterizes the hematopoietic progenitor cell ⁶, along with other markers of the cell surface, such as the presence of the c-kit (CD117) and the absence of molecule CD38. Thus, in several reference centers, marker CD34 has been used to identify hematopoietic stem cells. On the basis of CD34 cell count,

according to Sandhaus et al ⁷, the necessary number of these cells for the graft to “engraftment” is 2×10^6 per kilogram of patient weight.

In addition to the presence of CD34, it has been demonstrated that phenotype CD34⁺CD38⁻ characterizes a cell as a candidate of being a "true hematopoietic stem cell". Among the three available sources – bone marrow, peripheral blood and umbilical cord blood – the frequency of CD34⁺CD38⁻ cells is greater in the UCB^{8,9,10}. This fact explains the success of its use in transplants¹¹, since these cells are responsible for long term graft survival¹².

As a method for standardized analysis of CD34⁺ cells and use by worldwide banks, Sutherland et al. proposed the ISHAGE guidelines in 1996, which are based on the combination of cell characteristics measured by flow cytometry¹³. This technique uses a sequential gating strategy allowing the selection of populations of interest¹⁴. This protocol has been suffering modifications through the addition of markers of cell viability and absolute counts on a single platform, thus increasing its sensitivity.

The aims of the present study were to quantify UCB CD34⁺ cells, with an analysis of expression of CD38 molecules and c-kit. Also, correlations between physiological, hematological and immunophenotypical parameters were determined in order to check for potential influences in the volume of collected blood or in the quantification of hematopoietic stem cells.

Material and Methods

Studied sample

UCB samples were obtained by puncture of the umbilical vein of umbilical cords of term neonates (after 37 weeks) born in normal or cesarean delivery and collected into blood bags containing CPDA-1 (citrate, phosphate, dextrose and adenine) as anticoagulant. Twenty mL of UCB were used as a minimum volume for analysis to avoid excessive dilution of the sample. A total of 70 UCB samples were randomly collected on

weekdays at the obstetrics center of the Hospital das Clínicas of Porto Alegre (HCPA) and subsequently processed in the Laboratory of Transplant Immunology of the Santa Casa of Porto Alegre, Brazil, after signing of informed and free consent form (attachment I, p.102). All samples came from newborns (NB) whose mothers were HIV 1 and 2 negative and whose births occurred in duty hours. The blood samples were processed within 24 hours post-collection.

Hematological Parameters

A UCB aliquot was collected in EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) for a complete blood count through hematological counter Pentra 120 (ABX Diagnostics), at the Hematology Laboratory of the HCPA.

CD34⁺ Staining

The samples were processed according to Brocklebank and Sparrow¹⁵, undiluted, since the bags contained 63 ml of anticoagulant, leading the sample to present around $10\text{-}20 \times 10^9/\text{L}$ leukocytes, as suggested by the protocol. Later, CD34⁺ cells values and UCB volume were corrected, using the sample's anticoagulant dilution factor.

Absolute and relative CD34⁺ cells count: 100 μL of blood were incubated with 10 μL of conjugated monoclonal anti-CD45 antibody with FITC (clone HI30, BD Biosciences, San Jose, CA) and conjugated monoclonal anti-CD34 antibody with PE (clone 581, BD Biosciences, San Jose, CA) in Trucount tubes (BD Biosciences) for 20 min at room temperature (23°C) and in darkness. Trucount tubes contain a known number of lyophilized fluorescent beads of 4.2 μm in diameter. Subsequently, 2mL of lysis solution (Quicklysis – Cytognos) and 2 μL of 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) (at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in DMSO (dimethyl sulfoxide) were added and incubated for 15 min at room temperature (23°C) and in darkness. The samples were

obtained in flow cytometry within 15 min, at the most, from the termination of incubation, with acquisition of 200.000 CD45+ events. All samples were processed in duplicate.

Relative count of CD38 and CD117 cells among CD34⁺ cells: This assay was carried out in 4 tubes. Tube 1: containing cells only, without the presence of monoclonal antibodies (attachment II, p.106). Tube 2: containing 5 µL of isotype control for FITC (anti-mouse IgG1 FITC) and PE (anti-mouse IgG2A PE) (clone X40, X39) (attachment II, p.106). Tube 3: containing 5 µL of anti-CD34 FITC (clone 8G12, Becton Dickinson, San Jose, CA), 5 µL de anti-CD38 PE (clone HIT2 , Pharmingen, Becton Dickinson) and 5 µL of anti-CD45 PerCP (clone 2D1, Becton Dickinson) (attachment III, p.107). Tube 4: containing 5 µL of anti-CD34 FITC, 5 µL of anti-CD117 PE (clone 104D2, Becton Dickinson) and 5 µL of anti-CD45 PerCP (attachment IV, p.108). 100 µL of UCB was added into each tube and then incubated for 25 min at room temperature and in darkness. Afterwards, 2 mL of lysis solution (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) was added and incubated for another 15 min at room temperature and in darkness. Thereafter the samples were washed twice and re-suspended in 1mL of PBS with 10% paraformaldehyde. The samples were then read, with acquisition of 50.000 events within the selected gate.

Acquisition and analysis through flow cytometry

Data acquisition was performed using flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences) with 488-nm argon laser and the analysis was carried out with CELLQuest 3.1 software (BD Biosciences).

For absolute and percentage CD34⁺ determination the Trucount-ISHAGE gating strategy was used according to Brocklebank and Sparrow¹⁵, as shown in Figure 1. Plots were used to refer to quadrants. As shown in Fig. 1 (Plot 1), the threshold used for data analysis was set on CD45 expression caring to ensure that CD45^{low}/CD34⁺ cells were

not excluded from the analysis. The live leukocytes were identified by negative 7AAD events (Fig. 1, Plot 2), the gating out of dead cells (region 7 (R7)) served to gate out the Trucount beads from further CD34⁺ cell analysis. The Trucount beads, events with bright fluorescence, are enumerated in Region 6 (R6) (Fig. 1, Plot 8). CD34⁺ cells are represented in Region 4, Fig 1, plot 6, enumerated in gate 4 (G4). The number of CD34⁺ cells per microliter of blood was calculated as follows:

$$\frac{(\text{No of CD34}^+ \text{ cells (G4)} \times \text{No of beads per Trucount tube}) \times \text{sample dilution factor}}{(\text{No of beads counted (G6)} \times \text{sample volume (100}\mu\text{L)})}$$

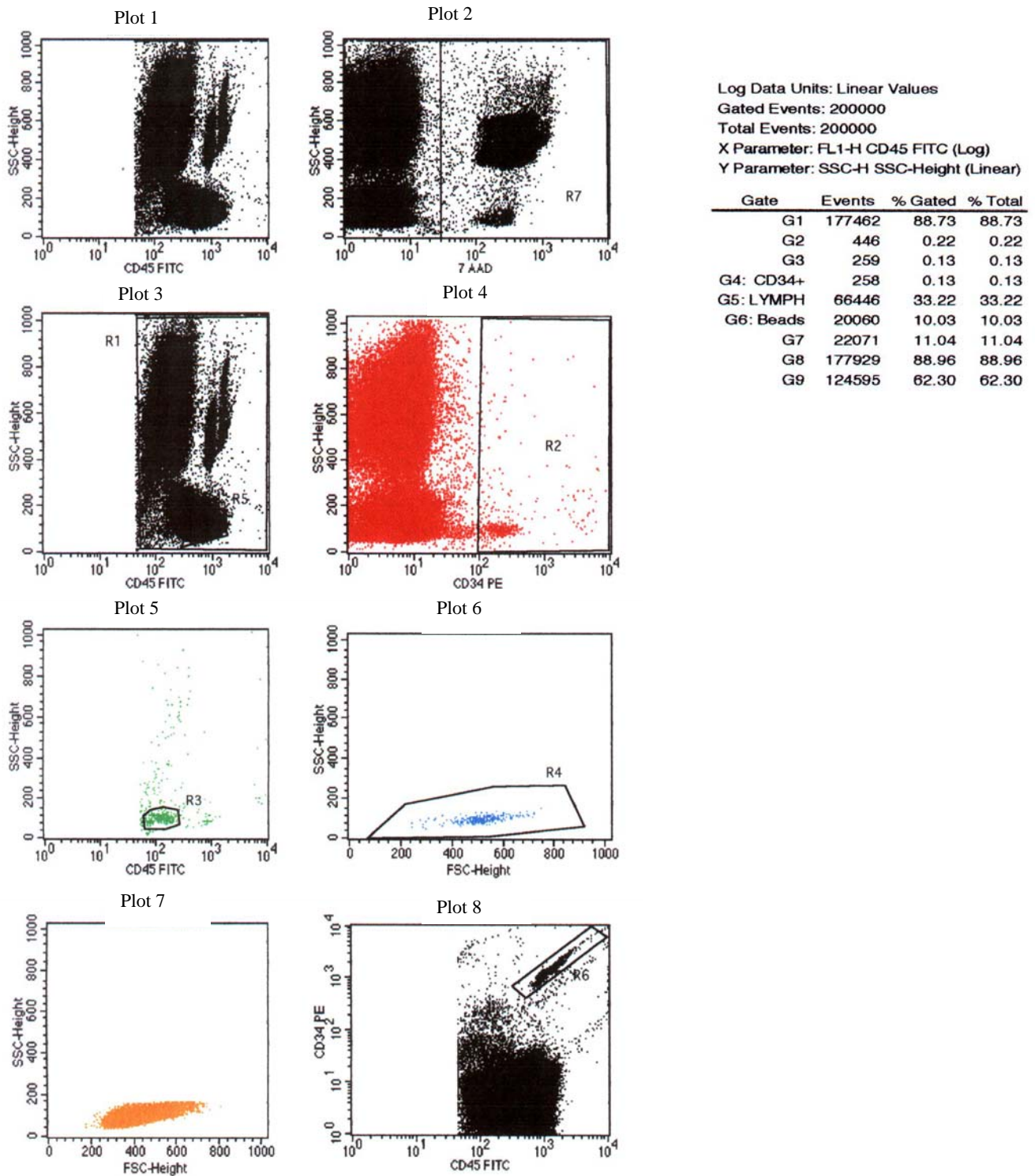


Figure 1. Modified ISHAGE gating strategy using Trucount tubes with CD45 FITC, CD34 PE and 7AAD in umbilical cord blood. Plot 1: Threshold used on the basis of CD45 expression to ensure that CD45 cells of lower fluorescence intensity and CD34⁺ cells were not excluded from the analysis. Plot 2, region 7 (R7): Exclusion of positive 7AAD events and removal of beads from CD34⁺ count. Plot 3, Region 1 (R1): Gated on live CD45⁺ cells and Region 5 (R5) defines lymphocyte population. Plot 4, Region 2 (R2): Gated on live CD45⁺CD34⁺ cells. Plot 5, Region 3 (R3): Gated on live CD45⁺CD34⁺ cells. Plot 6, Region 4 (R4): Gated on live CD45⁺CD34⁺ in forward and side scatter. Plot 7: Gated on live lymphocytes. Plot 8, Region 6 (R6): Trucount beads.

For percentage analysis of CD34⁺, CD38⁻ and CD117⁺ cells, initially the control tube and the tube containing only cells were analyzed in order to define negativity and positivity. Afterwards, a strategy was used that was similar to that of the ISHAGE guidelines, in which the CD45⁺ population was selected and then, among these, we selected those that possessed CD34, and of these we ascertained those that marked for CD38 or CD117. By analyzing the percentage in the given quadrants we obtained the CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁺ and CD34⁺CD117⁻ cells.

Correlation between physiological, hematological and immunophenotypical parameters

A total of 64 correlations were performed by analyzing physiological, hematological and immunophenotypical parameters of UCB. The parameters: volume of UCB, gestational age, NB weight, TNC, CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁺ and CD34⁺CD117⁻ cells, and number of erythroblasts were all correlated between one another and between the variables: type of delivery, NB sex, cord length, and maternal age. In addition, the number of erythroblasts was related to hemoglobin, MCV, and RDW, while gestational age was correlated with MCV, erythrocytes, neutrophils and lymphocytes, and, finally, NB weight with number of erythrocytes. Of these, we have specified only those presenting significant correlations.

Statistical analysis

The sample size was calculated from frequency values of CD34⁺/CD38⁻ cells obtained by a pilot study, using $p < 0.05$ with a power of 80%, which suggested 30 samples to be studied. This calculation was done using statistical software *n Query Advisor 3.0*. However, for effects of data enrichment 70 UCB samples were assessed.

Groups were compared using the Student's t-test and the evaluation of quantitative variables using Pearson's correlation. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS. 8) was used.

The correlations considered as statistically significant were those where $p < 0.05$ or 0.01.

Results:

Of the 70 UCB samples analyzed, 37 (53%) were obtained in cesarean section and 33 (47%) in vaginal delivery. Concerning newborn sex distribution, 43 infants (61%) were males and 27 (39%) were females. The characteristics of mothers, newborns and UCB samples are presented in Table 1. The volume of collected UCB ranged from 20 to 206 mL (Table 1), and the quantification of hematopoietic UCB stem cells showed a mean $31 \text{ CD34}^+/\mu\text{L}$ cells in the UCB (Table 2). In 49 of these 70 samples, molecules CD38 and CD117 on CD34^+ cells were investigated. Table 2 shows the values obtained for the markers of cell surface investigated.

All samples processed through the method suggested by Brocklebank and Sparrow¹⁵ were done in duplicate, and there was no significant difference between them concerning CD34 values for a confidence interval of 95% by the Student's t-test for paired samples.

Table 1: Gestational and maternal ages, newborn (NB) weight, cord length, placental weight, and collected UCB volume.

	Number (n)	Mean \pm standard deviation	Median	Range
Maternal age (years)	70	25.7 ± 6.4	25.0	16 - 40
Gestational age (weeks)	70	39.1 ± 1.3	38.6	37 - 42
NB weight (g)	70	3369.1 ± 498.0	3350.0	1930 - 4530
Umbilical cord length (cm)	70	59.6 ± 15.1	55.5	35 - 105
Placental weight (g)	66	629.7 ± 169.3	600.5	300 - 1210
Volume (mL)	70	53.8 ± 33.6	48.0	20 - 206

Table 2: Quantification of CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁻ and CD34⁺CD117⁺ cells.

	Number (n)	Mean \pm standard deviation	Median	Range
CD34 (cells/ μ L)	70	30.96 \pm 18.9	28.17	7.9 – 93.9
CD34 (%) [*]	70	0.24 \pm 0.14	0.22	0.06 – 0.65
CD34 ⁺ CD38 ⁻ (%) ^{**}	49	16.66 \pm 8.32	16.58	1.44 – 38.39
CD34 ⁺ CD117 ⁻ (%) ^{**}	49	47.23 \pm 24.0	47.12	7.67 – 92.11
CD34 ⁺ CD117 ⁺ (%) ^{**}	49	52.77 \pm 24.0	52.88	7.89 – 92.33

^{*} Among CD45⁺ cells ^{**} Among CD34⁺ cells

Among the 64 correlations investigated, 14 were statistically significant. As the volume, cord length and the variables CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁻ and CD34⁺CD117⁺ cells were compared with type of delivery and NB sex, no statistically significant difference was observed between the groups by the Student's t-test for independent samples. As to the quantity of CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ samples, there was no correlation according to Pearson's test.

A statistically significant positive correlation was found between collected UCB volume (mL) and NB weight (g), with $r = 0.49$, $p < 0.01$ (Figure 2 A). As the placental weight (g) was related with UCB (mL), we obtained significance by Pearson's correlation ($r = 0.296$) for $p < 0.05$ (Figure 2 B).

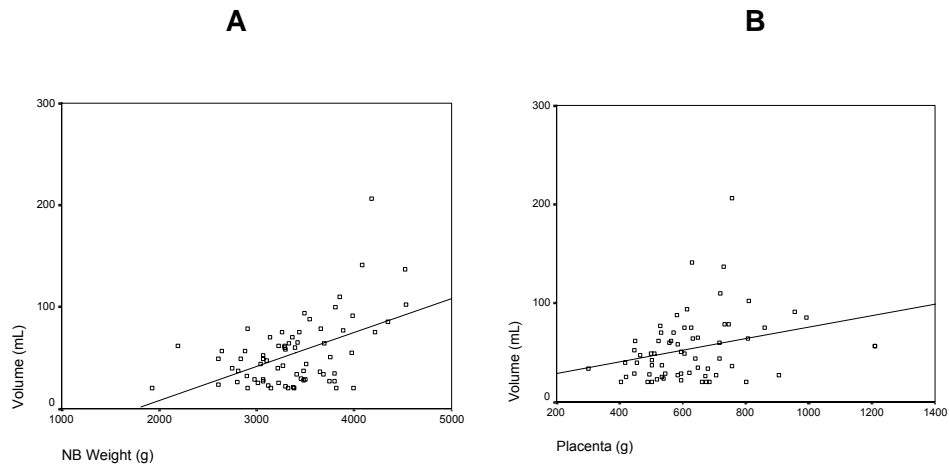


Figure 2: Correlation of the umbilical cord blood (UCB) obtained with (A) newborn weight (g) and (B) placental weight (g).

A higher quantity of CD34⁺ cells per microliter of UCB and between CD45⁺ cells was associated with a greater volume of collected UCB ($r = 0.29$, $p < 0.05$, for absolute values and $r = 0.36$, $p < 0.01$, for relative values (Figure 3 A and B, respectively). As regards gestational age (weeks) and the quantity of CD34⁺ cells per microliter of UCB, a negative correlation was observed ($r = -0.33$, $p < 0.01$), (Figure 3 C). As to the number of total nucleated cells (TNC), we found it to be correlated with absolute number of CD34⁺ cells in the UCB ($r = 0.32$, $p < 0.05$), (Figure 3 D).

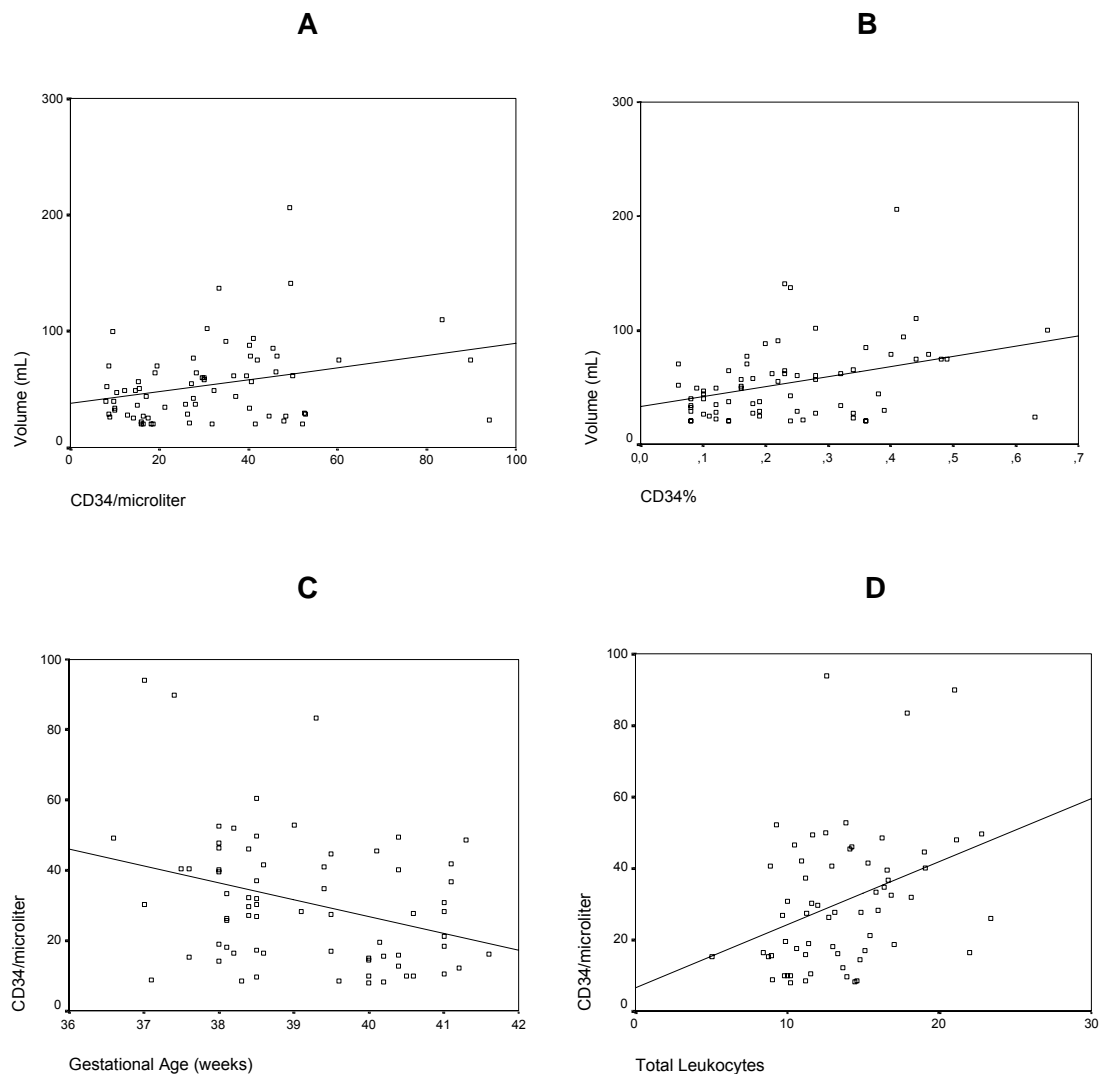


Figure 3: Correlation between the collected volume of umbilical cord blood (UCB) (mL) and (A) absolute number of CD34⁺ cells per microliter of UCB and (B) relative number of CD34⁺ cells among CD45⁺ cells. Correlation of CD34⁺ cells per microliter of UCB with (C) gestational age (weeks) and with (D) absolute number of total leukocytes.

A significant negative correlation was found between CD34⁺CD117⁺ cells and the volume of UCB were ($r = -0.41$, $p < 0.01$) (Figure 4 A), while a significant positive correlation was found between CD34⁺CD117⁻ cells and UCB volume ($r = 0.41$, $p < 0.01$), (Figure 4B). A significant negative correlation was found between CD34⁺ cells and CD34⁺CD117⁺ cells ($r = -0.41$, $p < 0.01$), (Figure 4 C), and there was a significant positive correlation ($r = 0.41$, $p < 0.01$) between CD34⁺ and CD34⁺CD117⁻ cells (Figure 4 D).

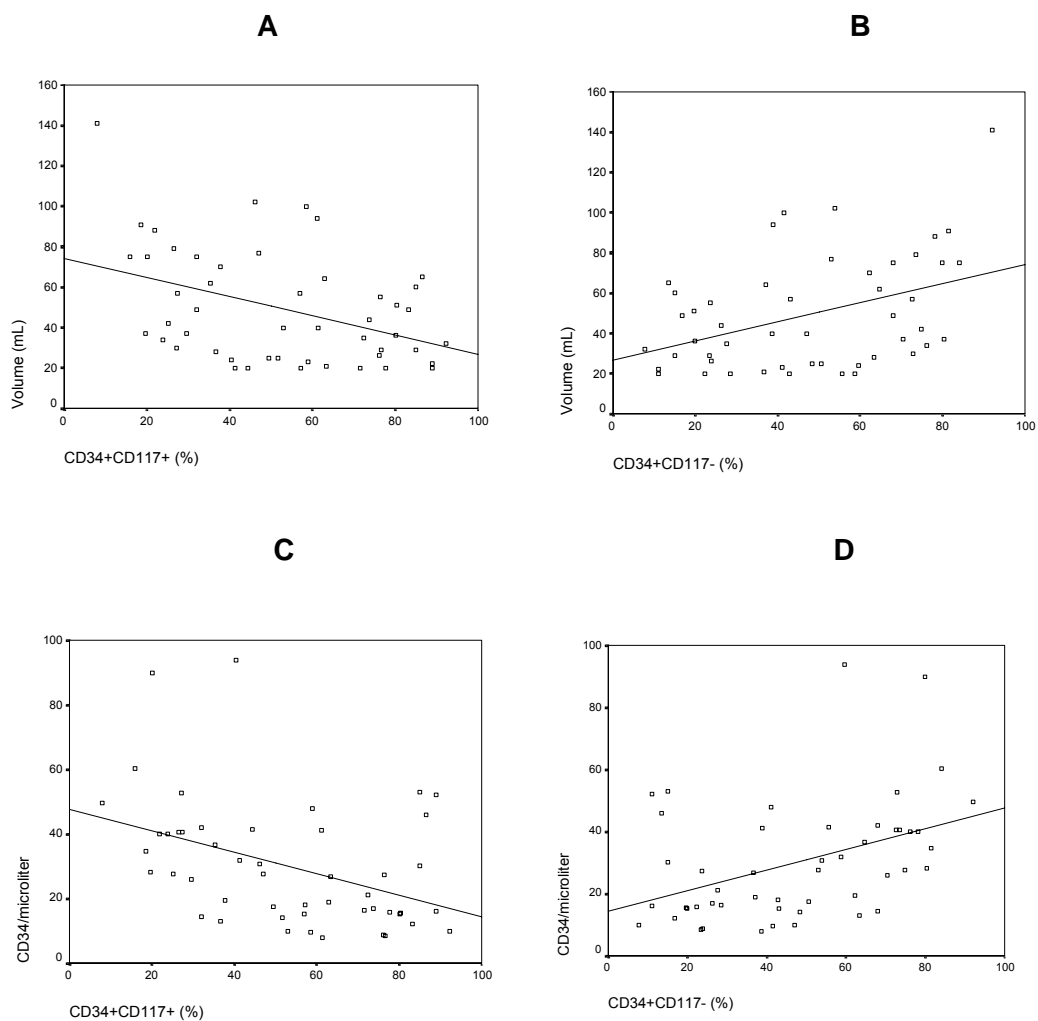


Figure 4: Correlation between UCB volume (mL) and the relative number of (A) CD34⁺CD117⁺ cells and (B) CD34⁺CD117⁻ cells, among CD34⁺ cells in UCB. Correlation between CD34⁺ cells and the relative number of (C) CD34⁺CD117⁺ cells and (D) CD34⁺CD117⁻ cells.

As regards TNCs, there was a significant negative correlation with CD34⁺CD117⁺ cells ($r = -0.45$, $p < 0.01$), (Figure 5 A) and a significant positive correlation with

CD34⁺CD117⁻ cells ($r = 0,45$, $p < 0,01$), (Figure 5 B). Also, concerning CD34⁺CD38⁻ cells, there was a significant negative correlation with CD34⁺CD117⁺ ($r = - 0.29$, $p < 0.01$), (Figure 5 C) and a significant positive correlation with CD34⁺CD117⁻ cells ($r = 0.29$, $p < 0.01$), (Figure 5 D)

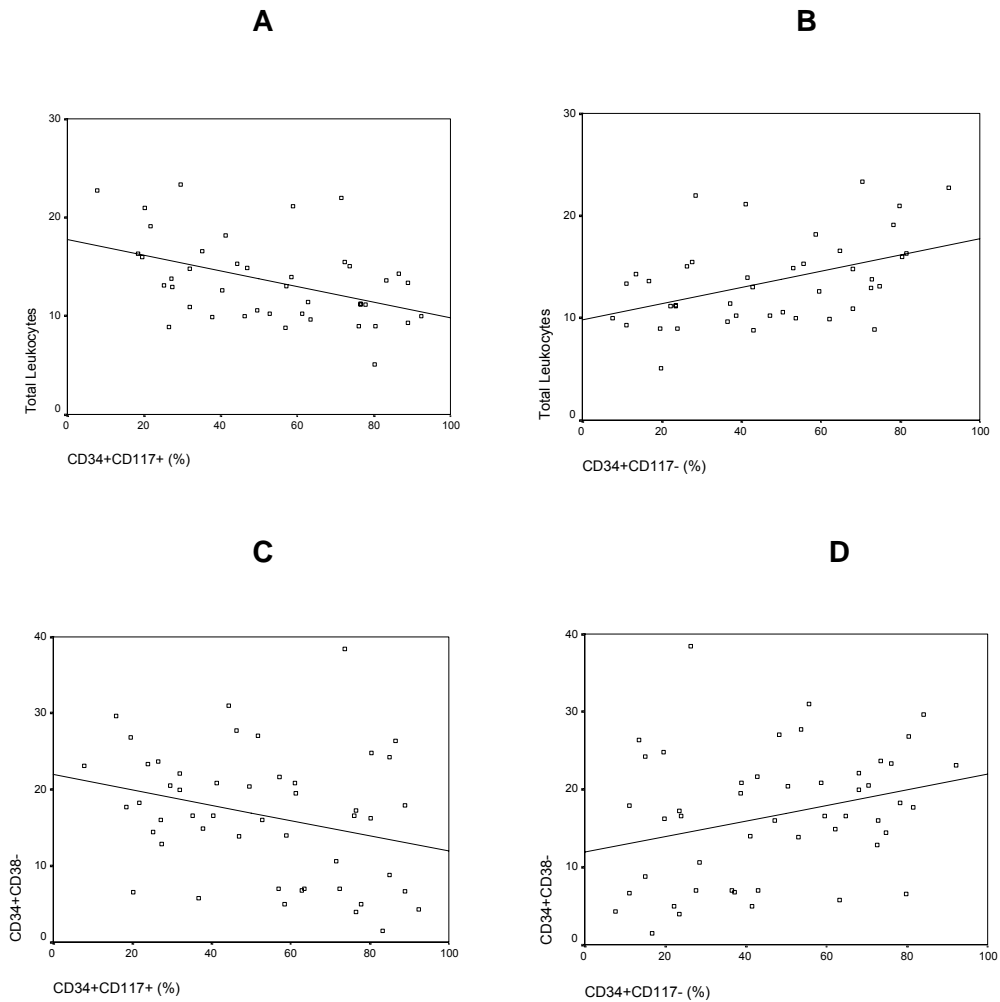


Figure 5. Correlation between TNCs and (A) CD34⁺CD117⁺ cells and (B) CD34⁺CD117⁻ cells. Correlation between CD34⁺CD38⁻ cells and (C) CD34⁺CD117⁺ cells and (D) CD34⁺CD117⁻ cells.

All of the other variables investigated were not significantly correlated (attachments V, p.109, VI, p.110, VII, p.111).

Table 3 presents the blood counts values for 62 of the 70 UCB samples that were used in the quantification of CD34.

Table 3: Blood counts values for 62 of the 70 UCB samples collected.

	Number (n)	Mean \pm standard deviation	Median	Range
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	62	4.37 ± 0.45	4.40	3.45- 5.35
Hemoglobin (g/dL)	62	14.89 ± 1.37	15.03	11.16-18.32
Hematocrit (%)	62	44.83 ± 4.24	45.13	32.42-54.21
MCHC (g/dL)	62	33.24 ± 0.84	33.23	31.72-36.86
MCV (fL)	62	102.67 ± 5.16	102.80	88.31-114.80
MCH (pg)	62	34.13 ± 1.80	34.08	29.61-40.12
RDW (%)	62	14.33 ± 1.29	14.34	11.86-17.67
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	62	13.63 ± 3.84	13.08	5.04-23.35
Band Neutrophils (%)	60	2.19 ± 3.03	1.0	0.0-15.0
Segmented Neutrophils (%)	62	50.62 ± 10.61	52.0	24.0-78.0
Lymphocytes (%)	62	35.77 ± 10.03	35.30	9.0-60.0
Erythroblasts (in 100 leukocytes)	57	7.52 ± 10.35	4.50	0.0-56.0
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	33	268.30 ± 72.93	268.0	47.0-391.0

Discussion

The public banks of umbilical cord blood rapidly provide allogeneic stem cells donors because the material is readily available for use, without the need for waiting for a bone marrow donor. With the growing number of UCB banks in several parts of the world, it has been possible to increase the diversity of HLA-compatible donors and to shorten the waiting time for a non-relative donor, either identical or not⁴.

The characterization of UCB units facilitates the understanding of factors affecting the quality and improvement of transplant outcomes¹⁶. For this reason, standards for processing, quantifying, manipulating and freezing must be established and followed in order to ensure the minimum characteristics of the unit to be used. The use of validated protocols, with a proven coefficient of low inter-laboratory variation, is of paramount importance as regards the control of quality in these UCB banks. In using a protocol which has less than 10% of inter-laboratory variation for this single-platform

technique¹⁷, we are certainly adding quality to the samples stored in our country and which may come to be used by any recipient in need.

The value of hematopoietic stem cells, considered as CD34⁺ cells, found in this study was, in average, 31±18.9 CD34⁺/μL of UCB, ranging from 8 to 94 cells, thus showing the profile of the 70 UCB samples in the population of newborns of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Pranke et al.¹⁸ used the ISHAGE protocol with exclusion of 7AAD⁺ cells and found 35.6±19.4 CD34⁺/μL cells in UCB samples collected in New York, United States. However, as studies of this type have not been performed in Brazil, there are no regional data with which these data can be compared. The values found in the present study were smaller than those reported by Brocklebank and Sparrow¹⁵, who found from 22 to 600 7AAD negative CD34⁺ cells per microliter of UCB. On the other hand, the results obtained here are similar to those reported by Chin-Yee et al.¹⁹, who found 15 to 148 CD34⁺/μL cells in UCB, as well as to those reported by Barnett et al.²⁰, who detected 14 to 63 of these cells in stabilized UCB samples. These differences may be a result of the heterogeneity proper of cord blood cells as well as of differences between the techniques used by the various groups²¹.

Furthermore, a number of factors have been described that may influence the quantification of UCB CD34 cells and that may account for the variations in the reported results. Prolonged stress during labor leads to an increase in the number of nucleated cells, granulocytes, CD34⁺ and hematopoietic progenitor cells in the UCB²². A cesarean delivery provides collection of a higher volume of blood as compared to the normal vaginal delivery, thus increasing the absolute value of CD34⁺ cells²³. Other studies have shown that factors like newborn weight and sex as well as maternal age can affect the concentration of CD34⁺ cells^{16,24}. We have not detected any connection between type of delivery and volume, neither between NB sex and weight or maternal age, and quantity of CD34⁺ cells, although there was a positive correlation of volume of collected UCB with NB weight, which can thus result in an increase in the absolute number of CD34⁺ cells.

On the other hand, the quantification of CD34⁺ cells performed without using 7AAD, another marker of dead cells, may be one of the factors responsible for the higher number of CD34⁺ cells in the UCB reported in other studies.

In a multicenter study carried out to validate the ISHAGE method across 36 international laboratories (including the Laboratory of Transplant Immunology of the Santa Casa of Porto Alegre, Brazil, where the present work was conducted), a range of 35 to 60 CD34⁺/μL cells was found in the peripheral blood samples analyzed²⁵. The present study detected 0.24 ± 0.14 CD34⁺ cells among CD45⁺ cells, and Pranke et al.¹⁸ found $0.28 \pm 0.15\%$ of these cells among the same leukocyte marker in UCB samples donated to the “Placental Blood Program” of New York. These findings suggest that the differences found in the quantification of UCB HSC are probably due to technical factors or physiological variations, rather than to ethnic origin of the donated samples.

The percentage of CD34⁺CD38⁻ cells found in this study (around 17% of total CD34⁺ cells) is in agreement with data from a few other authors, such as D’Arena²⁶, Hao²⁷ and Timeus²⁸ et al., despite the overall great variability of the results reported for these cells, ranging from 2.6% or 3.9%^{8,29,30} to around 35%³¹, among CD34⁺ cells. These findings show the great difficulty in quantifying these events, considered as rare.

Interesting results are those reported by Malangone et al⁵ at the collection of the last fractions of UCB, suggesting that the higher the volume collected, the higher the probability of obtaining more residual, immature cells from the placenta. In other studies^{32,33}, variation concerning gestational age was found to be inversely proportional to the number of CD34⁺CD38⁻ cells in the UCB, a correlation which was not found in the present study.

Another factor that may influence the variation in the percentage of CD38 negative cells among CD34 positive cells, both here and in other studies, is the fact that apoptotic cells were not excluded, i.e. the percentage was evaluated over the total CD45 cells, viable or non-viable (if any), since 7AAD was not used in the analysis.

Disagreements may also occur due to the different fluorochromes used in marking anti-CD38 monoclonal antibodies. It is known, for instance, that PE-marked antibodies (phycoerythrin), owing to low nonspecific binding to dead cells and better demarcation between positive and negative cells³⁴, may be more indicated for use in the investigation of rare events through flow cytometry. Thus, as in the present study we used the PE-marked antibody, this may have minimized the negative effect of not having used 7AAD to identify dead cells. Also, the fact that samples were processed within 24h postpartum reduces the possibility of there being dead or apoptotic cells, as demonstrated in several studies, where the viability of UCB cells within 36h after birth is around 95%^{35,36,37}. Thus, the non use of 7AAD in evaluating CD38 and CD117 molecules must not have compromised the results. However, the use of 7AAD shows controversial results too when protocols using or not using it are compared. It is known that 7AAD identifies dead or apoptotic cells³⁸, and Keeney¹⁷ has shown that addition of this marker decreases by 50% the presence of CD34⁺ cells per microliter of blood, suggesting that these were unviable cells. Cabezudo et al.³⁹, however, comparing different methods for counting CD34 cells, did not find differences between those using and not using 7AAD as regards the absolute number of CD34⁺ cells. Nevertheless, notwithstanding these conflicting results and the detection of unviable cells remaining problematic, there are situations in which the use of 7AAD may be justified. In cases where CD34 cells are clinically used, such as in umbilical cord blood banks, the measurement of cell viability through 7AAD is important, since the number of these cells is used to choose an umbilical cord blood sample. Also, in cases where the samples are cryopreserved, as in UCB banks, or after cell cultivation, whose aim is to transplant frozen or expanded cells, cell viability may be much affected^{37,38,40}. Then, the use of 7AAD, although controversial, is advised, and its use remains consensual for evaluation of cell viability¹⁷.

The success of UCB cells transplantation is largely related to the number of total nucleated (TNC) and CD34⁺ cells. On the one hand UCB CD34⁺CD38⁻ cells possess

high potential of proliferation and expansion of CD34⁺CD38⁻ cells, suggesting possible advantages concerning the homing and engraftment of more undifferentiated cells⁹. The proliferative capacity is also negatively correlated with gestational age³³, corroborating the hypothesis that CD34⁺CD38⁻ cells are more primitive hematopoietic stem cells with higher clonogenic capacity.

On the other hand, a study performed by Theunissen and Verfaillie⁴³ suggests that the superiority of using UCB in hematopoietic cells transplantation is more related to the ability to generate progenitors than to the frequency of CD34⁺CD38⁻ cells proper. Moreover, Lapidot et al.⁴⁴ suggest that UCB cells, when transplanted, possess a reduced potential for homing towards the bone marrow, as compared to more mature cells. However, this difference is compensated by the fact that the UCB cells are more easily maintained in their immature state, guaranteeing the levels of progenitor cells for longer, as compared to bone marrow transplantation. A more rapid engraftment and better graft survival are obtained when the cord blood provides at least 2.0×10^7 TNCs and 2.0×10^5 CD34⁺ cells per kilogram of the recipient's body weight, according to studies by Gluckman et al.² According to Laughlin et al.⁴⁵, who analyzed the results of transplants of UCB HSC in 68 adults patients, a mean 1.6×10^7 TNCs and 1.2×10^5 CD34⁺ cells per kilogram of the recipient's body weight were enough to ensure engraftment.

It is known that the number of TNCs and the number of HLA mismatches interact in the engraftment and in the frequency of graft-versus-host disease (GVHD), and a higher number of TNCs might be thought to partially suppress the negative impact of HLA mismatches⁴⁶. However, this hypothesis has not yet been totally proven⁴⁶. Gluckman et al.⁴⁶ observed that a higher number of TNCs and a lower number of HLA mismatches were correlated with a higher likelihood of engraftment. On the other hand, higher HLA mismatch is related to higher incidence of GVHD grades III-IV and a lower incidence of relapse of acute leukemias, evidencing the graft effect against leukemia. Thus, the choice of a good unit of umbilical cord blood to be used must be based on the

number of TNCs and on the number of compatible HLA alleles⁴⁶. In the present study the quantity of TNCs was positively correlated with the percentage value of CD34⁺ cells per microliter of blood, as described by Cairo⁴⁷ and Nakagawa et al²⁴. Solves et al.⁴⁸ found a positive correlation between quantity of TNCs and percentage value of CD34⁺ cells in higher volumes collected with the placenta still in the uterus, in agreement with results from other authors^{49,50}, even though this procedure is not performed in public banks UCB collections. Cairo et al.⁴⁷ have also shown a positive correlation between the number of erythroblasts with CD34⁺ cells and CD34⁺CD38⁻ cells, which were not found in the present study.

Our results show the existence of a positive correlation between collected volume and number of CD34⁺ cells both per microliter of UCB and in the percentage of these cells among CD45⁺ ones. Bradley et al.⁴, evaluating a study of 1,200 donors, observed that high volume samples are correlated with high doses of TNCs, CD34⁺ cells and colony forming units of granulocytes and macrophages (CFU-GM). Jones et al.⁵¹, observing 9,205 cases, found that factors like newborn and placental weight, longer umbilical cord, cesarean section and advanced gestational age significantly influence the volume of collected blood and the number of TNCs. Our results also indicate a positive correlation of newborn and placental weight with higher collected volume, just as reported by Solves et al.⁵⁰, but not in the other parameters. Also were found positive correlations of advanced gestational age with volume⁵² and number of CD34 cells⁴⁷, which were not observed in the present study.

Yamada et al.²³ reported that the number of CD34 cells per microliter of blood was significantly higher in samples coming from cesarean deliveries, due to the higher volume collected. However, Cairo et al.⁴⁷, Askari⁵² and Solves et al.⁵³ did not observe any association of cesarean delivery with number of TNC, CD34⁺ cells^{47,52,53} and CD34⁺CD38⁻ cells⁴⁷, just like in the present study.

In our study, we found that the quantity of CD34⁺ cells per microliter of UCB was inversely proportional to gestational age, as reported in several studies by other authors^{21,33,54}. Yet, if on the one hand the UCB of prematures presents a higher quantity of CD34⁺ cells per microliter, the collected volume is lower than that obtained from term fetuses, because the more advanced the gestational age, the higher the placental weight and the higher the volume of blood that can be collected⁵¹. Still, Askari et al.⁵² concluded that TNC count seems to be more affected by the variables newborn and placental weight, longer cord, collected volume, and gestational age than the CD34⁺ cells count does. Among our findings, we found a positive correlation between volume and quantity of CD34 cells (absolute and percentage values), but not between volume and number of TNCs. In addition, we observed that the quantity of CD34⁺ cells and the TNC counts are directly correlated. Also, we found negative correlations concerning the relative presence of CD34⁺CD117⁺ cells among the CD34⁺ cells population with the following parameters: volume, total leukocytes, number of CD34⁺ cells per microliter of UCB, and percentage of CD34⁺CD38⁻ cells. On the other hand, the same parameters presented positive correlations with CD34⁺CD117⁻.

The CD117 molecule is the receptor of the stem cells growth factor and is involved in the interactions of CD34⁺ cells with stromal and other cells in the bone marrow. Its expression among CD34⁺ cells may range from 58%⁵⁵ to 81%², and among CD34⁺CD38⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells, the c-kit is expressed in 80±10% and 56±24% of these cells, respectively²⁹, in the UCB. The literature findings, however, are still conflicting as to whether these more primitive, hematopoietic stem cells express this molecule in higher^{56,57,58,59,60} or lower levels³⁶, or do not express it at all⁵⁵.

Studies showed that cells with CD117^{low} phenotype have been used to describe quiescent progenitor cells, based on the fact that the low c-kit expression on the cell surface might "protect" the cells, preventing it to receive stimuli and differentiate itself,

thus characterizing it as a more primitive cell⁶¹. Other studies showed that cells with CD117^{high} phenotype may be ones related to the formation of cell colonies⁶².

We can thus suggest that cells presenting CD34⁺CD117⁻ phenotype, or low expression on the surface, appear to vary with the volume obtained, as well as with the presence of TNC and CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ cells.

Therefore, several factors may influence TNC and CD34⁺ cells counts and, hence, the success of a transplant. Procedures such as clamping the umbilical cord as closely as possible to the infant's body, in order to obtain a longer cord, and collecting cord blood as promptly as possible after birth, surely provide higher collected volume, as suggested by Jones et al.⁵¹. In addition, Nakagawa et al.²⁴ suggest that a shorter time interval between collection and handling of the sample (cell counting) can increase the concentration of CD34⁺ cells. Measures like these may be highly valuable in the acquisition and storage of samples with higher quality standards, thus avoiding that such a rich material with so much proliferative potential will not be used to the fullest.

We can thus suggest that, as the volume of collected UCB directly affects the quantity of CD34⁺ cells per microliter of blood and possibly the quantity of total nucleated cells, some measures must be taken at the moment of collection in order to increase the collected volume. These measures include the advice that this procedure must be performed by individuals trained to this end, because the longer it takes from the removal of the placenta and cord, the smaller the yield obtained and, hence, the lower the number of CD34⁺ and TNC cells.

On this account, it is crucial that further research must be done to increase our knowledge of the biology, quantification and factors that may affect UCB collections, for each day new results have shown us that we are faced with a material which has great proliferative capacity and from which, according to a recent study by McGuckin et al.⁶³, cells with embryonic characteristics have already been obtained. With this, research has shown that the UCB may in the future be a source of stem cells to treat not only

hematological disorders but also several other diseases, since investigations into the plasticity of stem cells have demonstrated the importance of these cells in restoring various other organs. Thus, a better understanding of these cells may generate outstanding findings, highly useful for preserving life, given that hitherto many questions remain unanswered, such as: if we have to choose between a unit with more nucleated cells (6×10^7) and one HLA incompatible allele, and another with less cells (4×10^7) but no HLA mismatch, what can be best for the patient?⁴⁶ . Although some studies show that the best option is to use the first sample^{46,64}, since the risk of developing acute and chronic GVHD in UCB recipients with up to two HLA incompatible alleles is similar to that of a recipient of bone marrow from an identical HLA donor⁶⁵, further studies must be performed. Doubts like this may be minimized as the biological properties of these cells are investigated and integrated into the issue that these UCB cells do include cells that are immature and highly capable of dividing before differentiating themselves, which may be crucial in evaluating transplant outcomes.

Acknowledgments

We are grateful to the team of the Obstetrics Center and Laboratory of Hematology of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

References

1. Wagner JE, Barker JN, DeFork TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldmann A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NKC, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. **Blood**, v.100, p.1611-1618, 2002.
2. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human Leukocyte Antigen Matching in Cord Blood Transplantation. **Seminars in Hematology**, v.42, p.85-9, 2005.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England Journal of Medicine**, v.321, p.1174-1178, 1989.
4. Bradley MB, Cairo MS. Cord Blood Immunology and Stem Cell Transplantation. **Human Immunology**, v. 66, p.431-446, 2005.
5. Malangone W, Belvedere O, Astori G, Adami V, Donini A, Falasca E, Sala PG, Del Frate G, Pittino M, De Anna D, Degrassi A. Increased content of CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in the last collected umbilical cord blood. **Transplantation Proceedings**, v.33, p.1766-1768, 2001.
6. Mayani H, Landsdorf PM. Biology of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**, v.16, p.153-165, 1998.
7. Sandhaus LM, Edinger MG, Tubbs RR, Goormastic M, Baucoco PA, Serafino SE, Bolwell BJ. A simplified method of CD34⁺ cell determination for peripheral blood progenitor cell transplantation and correlation with clinical engraftment. **Experimental Hematology**, v.26, p.73-78, 1998.

8. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Brennier M, Massy M, Ley P, Hemptinne D, Stryckmans P. Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34⁺ purified cells from human cord blood and bone marrow. **Stem Cells**, v.13, p.281-288, 1995.
9. Timeus F, Crescenzo N, Marranca D, Dall'Aglio M, Fazio L, Di Marco M, Saracco P, Ricotti M, Gabutti V. Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. **Bone Marrow Transplant**, v.22(1), p.61-62, 1998.
10. Cho SH, Chung IJ, Lee JJ, Park ML, Kim HJ. Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood. **Journal of Korean Medical Science**, v.14, p.520-525, 1999.
11. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, Tonutti E, Rinaldi C, Pittino M, Baccarani M, Del Frate G, Biffoni F, Sala P, Hilbert DM, Degrossi A. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34⁺ cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.25, p.141-146, 1999.
12. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34⁺ CD38⁻. **Leukemia**, v.17, p. 960-964, 2003.
13. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cells determination by flow cytometry. **Journal of Hematotherapy**, v.5, p. 213-226, 1996.
14. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van Der Schoot C E, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem progenitors cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. **Cytometry**, v.34 (3), p.128-42, 1998.

15. Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. **Cytometry**, v.46, p.254-251, 2001.
16. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood progenitor cell concentration and infant sex. **Transfusion**, v.45, p.613-621, 2005.
17. Keeney M, Gratama JW, Sutherland R. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. **Cytometry**, v.58A, p.72-75, 2004.
18. Pranke P, Hendriks J, Alespeiti G, Nardi N, Rubinstein P, Visser J. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34⁺ cells using the ProCOUNT-BD and ISHAGE protocols with evaluation of CD34⁺ bright cells. **Blood**, v.100(11), 423, p.5261, 2002.
19. Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, et al. Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. **Cytometry**, v.30, p.296-303, 1997.
20. Barnett D, Granger V, Storie I, et al. Quality assessment of CD34⁺ stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation. **British Journal of Haematology**, v.102, p.553-565, 1998.
21. Yap C, Loh MT, Heng KK, Tan P, Yu SL, Chan SH, Ren EC. Variability in CD34⁺ cell counts in umbilical cord blood: implications for cord blood transplants. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v.50, p.258-259, 2000.
22. Lim FT, Scherjon SA, van Beckhoven JM, Brand A, Kanhai HH, Hermans JM, Falkenburg JH. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.183, p.1144-1152, 2000.
23. Yamada T, Okamoto Y, Kasamatsu H, Horie Y, Yamashita N, Matsumoto K. Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 79, p. 830-833, 2000.

24. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuka H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakayama T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34⁺ cell yield for cord blood banking. **Transfusion**, v.44, p.262-267, 2004.
25. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34 hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. **Cytotherapy**, 2003, 5(1):55-65.
26. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. **Haematologica**, v.81, p.404-409,1996.
27. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. **Blood**, v.86, p.3745-3753, 1995.
28. Timeus F, Crescenzo N, Basso G, Ramenghi U, Saracco P, Gabutti V. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. **Stem Cells**, v.16, p. 120-126, 1998.
29. Pranke P, Hendriks J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, Visser JWM. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38(12), p.1775-1789, 2005.
30. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. **Blood**, v.95, p.1967-1972, 2000.
31. Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, Mangoni L, Garau D, Rizzoli V. Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. **Leukemia**, v.11, p.2143-2149,1997.

32. Opie TM, Shields LE, Andrews RG. Cell-surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. **Stem Cells**, v.16, p.343-348, 1998.
33. Gasparoni A, Ciadella L, Avanzini MA, Bonfichi M, Di Mario M, Piazzini G, Martinotti L, Vanelli L, Rondini G, Chirico G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. **Pediatric Research**, v.47, p.825-829, 2000.
34. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cells. **Clinical Laboratory Haematology**, v.21, p.301-308, 1999.
35. Shen HP, Ding CM, Chi ZY, Kang ZZ. Effects of different cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.19(4), p.489-92, 2003.
36. Xiao M, Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. **Journal Hematotherapy Stem Cell Research**, v.12(1), p.115-22, 2003.
37. Bayer-Zwirello LA, Hoffman DE, Adams LA, Wilder PT, Reece MT. The effect of processing and cryopreservation on nucleated umbilical cord blood cells. **Journal of Perinatal Medicine**, v.32(5), p.430-433, 2004.
38. Philpott NJ, Turner AJC, Scopes J, Westby M, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Dagleish AG, Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. **Blood**, v.87, p. 2244-2251, 1996.
39. Cabezudo E, Querol S, Concelas JA, Garcia J. Comparison of volumetric capillary cytometry with standard flow cytometry for routine enumeration of CD34⁺ cells. **Transfusion**, v.39 (8), p.864-872, 1999.

40. Van Haute I, Lootens N, De Smet S, De Buck C, Verdegem L, Vanheusden K, Pinxteren J, Vandekerckhove B. Viable CD34⁺ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? **Transfusion**. v.44(4), p.547-54, 2004.
41. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines. **Cytometry**, v.34, p.61-70, 1998.
42. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. CD34⁺CD38⁻ is a good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34⁺ cord blood cells. **Transfusion**, v.43, p.383-389, 2003.
43. Theunissen K, Verfaillie CM. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. **Experimental Hematology**, v. 33, p.165-172, 2005.
44. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? **Blood**, v.106, p.1901-1909, 2005.
45. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic Engraftment and Survival in Adult Recipients of Umbilical-Cord Blood from Unrelated Donors. **The New England Journal of Medicine**, v.344 (24), p. 1815-1822, 2001.
46. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michael G, Sanz G, Chan KW, Takahashi TA, Ortega J, Filipovich A, Locatelli F, Asano S, Fagioli F, Vowels M, Sirvent A, Laporte JP, Tiedelmann K, Amadori S, Abecassis M, Bordignon P, Diez B, Shaw PJ, Vora A, Caniglia M, Garnier F, Ionescu I, Garcia J, Koegler G, Rebutta P, Chevret S: Eurocord Group. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. **Experimental Hematology**, v.32, p.397-407, 2004.

47. Cairo MS, Wagner EL, Fraser J, Cohen G, Van de Vem C, Carter SL, Kernan NA, Kurtzberg J. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: A Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. **Transfusion**, v.45 (6), p.856-866, 2005.
48. Solves P, Mirabet V, Larrel L, Moraga R, Planelles D, Saucedo E, Uberos FC, Planells T, Guillen M, Andrés A, Monleon J, Soler MA, Franco E. Comparison between two cord blood collection strategies. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.82, p.439-442, 2003.
49. Pafumi C, Farina M, Bandiera S, Cavallaro A, Pernicone G, Russo A, Iemmola A, Chiarenza M, Leonardi I, Calogero AE, Calcagno A, Cianci A. Differences in umbilical cord blood units collected during cesarean section, before or after the delivery of the placenta. **Gynecological Obstetric Investigation**, v.54(2), p.73-7, 2002.
50. Solves P, Perales A, Moraga R, Saucedo E, Soler MA, Monleon J. Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units. **Acta Haematologica**, v.113(4), p.241-6, 2005.
51. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v.188 (2), p. 503-509, 2003.
52. Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J. Impact of donor-and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking. **Transfusion**, v.45, p.189-194, 2005.
53. Solves P, Moraga R, Saucedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L, Mirabet V, Planelles D, Carbonell-Uberos F, Monleon J, Planells T, Guillen M, Andres A, Franco E. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. **Bone Marrow Transplant**, v.31(4), p.269-73, 2003.

54. Jin CH, Takada H, Nomura A, Takahata Y, Nakayama M, Kajiwara M, Nakano H, Hara T. Immunophenotypic and functional characterization of CD33⁺CD34⁺ cells in human cord blood of preterm neonates. **Experimental Hematology**, v. 28, p.1174-1180, 2000.
55. Sakabe H, Yahata N, Kimura T, Zeng ZZ, Minamiguchi H, Kaneko H, Mori KJ, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Toyama K, Abe T, Sonoda Y. Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched in CD34⁺c-kit⁻ cells: correlation between long-term culture-initiating cells and telomerase expression. **Leukemia**, v.12, p.728-734, 1998.
56. Ramsfjell V, Borge O, Cui L, Jacobsen EW. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34⁺CD38⁻) human bone marrow progenitor cells. **The Journal of Immunology**, v.158, p.5169-5177, 1997.
57. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. **Haematologica**, v.83, p. 587-592, 1998.
58. Williams DA. Stem Cell Model of Hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. eds. **Hematology - Basic Principles and Practice** 3rd. ed., New York, Churchill Livingstone, 126-138, 2000.
59. Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Williams. Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. eds. **Hematology** 6th. ed., New York, McGraw-Hill, 29-58, 2001.
60. Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. **Blood**, v.78, p.1403-1412,1991.
61. Ikehara S. Pluripotent hematopoietic stem cells in mice and humans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.223, p.149-155. 2000.

62. McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. **European Journal of Haematology**, v.71, p.341-350, 2003.
63. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navrant S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. **Cell Proliferation**, v.38, p.245-255, 2005.
64. Rubinstein P, Carrier C, Carpenter C, et al. Graft selection in unrelated placental/umbilical cord blood (PCB) transplantation: influence and weight of HLA match and cell dose on engraftment and survival (abstract). **Blood**, v.96, p.588, 2000.
65. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? **Blood**, v.101 (11), p.4233-4244, 2003.

Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical

R.L. Canabarro^{1,2}, H. Sporleder², T. Gomes^{3,5}, G. Zanatta^{3,6}, L. Scribel^{3,7}, F. Freitas⁸, J. Neumann², P. Pranke^{1,3,4}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, UFRGS

² Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre

³ Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia da UFRGS e ⁴ PUCRS

⁵ Bolsista de Iniciação Científica da PROPESQ/UFRGS, ⁶ FAPERGS e ⁷ CNPq

⁸ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

Apoio Financeiro:

FAPERGS e PROPESQ/UFRGS

Endereço para correspondência:

rlcanabarro@yahoo.com.br

Palavras-chave:

células-tronco hematopoéticas, imunofenotipagem, sangue de cordão umbilical e placentário

Resumo

O uso de células-tronco do sangue de cordão umbilical e placentário é uma eficiente alternativa para o transplante de células progenitoras hematopoéticas. Diversos fatores podem influenciar no volume e na quantidade de células CD34⁺, consideradas células imaturas e com capacidade de proliferação. A quantificação das células CD34⁺, a avaliação das moléculas CD38 e CD117 (c-kit) sobre essas células, bem como correlações entre fatores como idade materna, idade gestacional, sexo e peso do recém nascido, comprimento do cordão umbilical, peso da placenta com o aumento do volume e das concentrações de células imaturas, entre outros, foram realizadas em 70 amostras de recém-nascidos a termo, obtidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O volume médio de sangue de cordão umbilical coletado foi de 53,8±33,6 mL, onde se encontrou 30,96±18,9 células CD34⁺/μL de SCUP e, entre essas, 16,66±8,32% eram células CD34⁺CD38⁻, 52,77±24,0% eram células CD34⁺CD117⁺ e 47,23±24,0% eram células CD34⁺CD117⁻. Foram encontradas correlações entre o peso do recém-nascido e o peso da placenta com o aumento do volume de SCUP coletado. Verificou-se que o volume de sangue coletado afeta a contagem absoluta das células CD34⁺ e o valor relativo dessas entre as células nucleadas totais, bem como o percentual de células CD34⁺CD117⁺ e CD34⁺CD117⁻. Observou-se correlação entre as células CD34⁺ e os leucócitos e que o aumento da idade gestacional é inversamente proporcional ao número de células CD34⁺. Nossos resultados confirmam que esses fatores podem estar relacionados ao maior número de células-tronco hematopoéticas às quais são fundamentais para o sucesso do transplante.

Introdução

O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) representa uma fonte alternativa de células-tronco hematopoéticas (CTH) para serem utilizadas no transplante alogênico de pacientes afetados por doenças hematológicas, imunodeficiências hereditárias e doenças metabólicas¹. Em comparação a outras fontes de células-tronco hematopoéticas, como o sangue periférico e a medula óssea, o SCUP fornece inúmeras vantagens logísticas e clínicas tais como: 1) disponibilidade imediata de unidades criopreservadas em bancos públicos de SCUP, e que diminuem em média em 25 a 36 dias a espera pelo transplante em relação à medula óssea, 2) extensão do *pool* de doadores devido a tolerância de até dois *mismatches* (incompatibilidades no sistema HLA, *Human Leucocyte Antigens*), 3) menor frequência e gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), 4) menor risco da transmissão de infecções latentes tais como citomegalovírus (CMV) e Epstein Barr Vírus (EBV), 5) ausência de riscos ao doador e 6) maior incidência de haplótipos raros comparados aos encontrados nos registros de doadores de medula óssea². Assim, essa fonte de células-tronco vem substituindo, com sucesso, a medula óssea e a aférese em transplantes, sendo que em muitos países, o número de transplante a partir das células SCUP, já supera as outras fontes de células-tronco.

O primeiro transplante utilizando sangue de cordão umbilical e placentário aconteceu há 17 anos, por Gluckman e colaboradores³, em 1988. Desde então, os estudos têm evoluído quanto aos procedimentos de coleta, processamento, caracterização, quantificação, criopreservação, descongelamento e transporte do SCUP, ao redor do mundo⁴.

Parâmetros comumente utilizados para avaliar uma unidade de SCUP e prever os resultados do transplante têm sido a contagem de células nucleadas totais (CNTs) e de células CD34⁺⁵. O antígeno CD34 é uma glicoproteína de membrana que caracteriza a célula progenitora hematopoética⁶, juntamente com outros marcadores de superfície

celular como a presença de c-kit (CD117) e ausência da molécula CD38. Assim, tem sido utilizado, em vários centros de referência, o marcador CD34⁺ para identificar a célula-tronco hematopoética. Baseando-se na contagem de células CD34⁺, segundo Sandhaus e colaboradores⁷, o número necessário destas células para a “pega” do enxerto é de, pelo menos, 2×10^6 por quilograma de peso do paciente.

Além da presença do CD34, tem sido demonstrado que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ caracteriza a célula candidata a ser a “verdadeira célula-tronco hematopoética”. Entre as três fontes disponíveis, medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical, a frequência das células CD34⁺CD38⁻ é maior no SCUP^{8,9,10}. Esse fato explica o sucesso de seu uso em transplantes¹¹, visto que estas células são responsáveis pela sobrevivência do enxerto a longo prazo¹².

Como metodologia para uma análise padronizada para a quantificação de células CD34⁺, e utilizada por bancos de todo o mundo, Sutherland e colaboradores propuseram, em 1996, o método ISHAGE que se baseia na combinação de características celulares medidas por citometria de fluxo¹³. Essa técnica utiliza uma estratégia de *gates* (janelas) sequenciais os quais permitem a seleção das populações de interesse¹⁴. Esse protocolo vem sofrendo modificações através da adição de marcadores de viabilidade celular e contagens absolutas em uma única plataforma¹⁵ aumentando, assim, a sua sensibilidade.

Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram quantificar as células CD34⁺ do SCUP, com análise da expressão das moléculas CD38 e c-kit. Foram avaliadas, também, correlações entre parâmetros fisiológicos, hematológicos e imunofenotípicos, para verificar possíveis influências no volume do sangue coletado ou na quantificação de células-tronco hematopoéticas.

Material e métodos

Amostra estudada

As amostras de SCUP foram obtidas por punção da veia umbilical de cordões umbilicais e placentas de neonatos nascidos a termo (após 37 semanas) após o parto normal ou cesareano e coletados em bolsas de sangue contendo CPDA -1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) como anticoagulante. Como volume mínimo para a análise, foi utilizado 20 mL de SCUP, para evitar a grande diluição da amostra. Foram analisadas 70 amostras de SCUP as quais foram coletadas aleatoriamente em dias da semana junto ao centro obstétrico do Hospital Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e processadas no Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, Brasil, após assinatura do consentimento livre e esclarecido (anexo I, p.102). Todas as amostras eram provenientes de recém-nascidos cujas mães eram HIV 1 e 2 negativas, cujos partos ocorreram nos períodos de plantão. As amostras foram processadas em um período inferior a 24 horas pós-coleta.

Parâmetros Hematológicos

Uma alíquota de SCUP foi coletado em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para realização do hemograma completo através do contador hematológico Pentra 120 (ABX Diagnostics), no laboratório de Hematologia do HCPA.

Marcação das células CD34⁺

As amostras foram processadas de acordo com Brocklebank e Sparrow¹⁵, sem diluição, uma vez que as bolsas continham 63 ml de anticoagulante, levando a amostra a apresentar um número de leucócitos em torno de $10\text{-}20 \times 10^9/\text{L}$, conforme sugerido pelo protocolo. Posteriormente, os valores de células CD34⁺ e do volume de SCUP foram corrigidos, utilizando-se o fator de diluição da amostra pelo anticoagulante.

Contagem absoluta e relativa de células CD34⁺: 100 μ L de sangue foram incubados com 10 μ L de anticorpo monoclonal anti CD45 (anti CD45) conjugado com FITC (clone HI30, BD Biosciences, San Jose, CA) e anticorpo monoclonal anti CD34 (anti CD34) conjugado com PE (clone 581, BD Biosciences) em tubos Trucount (BD Biosciences) por 20 minutos (min) à temperatura ambiente (23°C) e no escuro. Os tubos Trucount contêm um número conhecido de pérolas (*beads*) fluorescentes liofilizadas com 4,2 μ m de diâmetro. Após este período, 2mL de solução de lise (Quicklysis – Cytognos) e 2 μ L de 7AAD (7-Amino Actinomycin D) (Molecular Probes, Eugene) (na concentração de 1 μ g/ml) em DMSO (dimetil sulfóxido) foram adicionados e incubados por 15 min à temperatura ambiente e no escuro. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo em, no máximo 15 minutos após o término da incubação, com aquisição de 200.000 eventos CD45⁺. Todas as amostras foram processadas em duplicata.

Contagem relativa de células CD38 e CD117 entre as células CD34⁺: Esta análise foi realizada em 4 tubos. Tubo 1: contendo somente células, sem a presença de anticorpos monoclonais (anexo II, p.106). Tubo 2: contendo 5 μ L de controle isotípico para FITC (anti-mouse IgG1 FITC) e PE (anti-mouse IgG2A PE) (clone X40, X39) (anexo II, p.106). Tubo 3: contendo 5 μ L de anticorpo anti CD34 FITC (clone 8G12 , Becton Dickinson), 5 μ L de anticorpo anti CD38 PE (clone HIT2 , Pharmingen, Becton Dickinson) e 5 μ L de anticorpo anti CD45 PerCP (clone 2D1 , Becton Dickinson) (anexo III, p.107). Tubo 4: contendo 5 μ L de anticorpo anti CD34 FITC, 5 μ L de anticorpo anti CD117 PE (clone 104D2, Becton Dickinson) e 5 μ L de anticorpo anti CD45 PerCP (anexo IV, p.108). Em cada tubo foram adicionados 100 μ L de SCUP e incubados por 25 min à temperatura ambiente e no escuro. Após, houve a adição de 2 mL de solução de lise (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) e incubação por mais 15 min à temperatura ambiente e no escuro. Decorrido esse período, as amostras foram lavadas

duas vezes e ressuspensas em 1mL de PBS com paraformaldeído 10%. As amostras foram lidas em seguida, com aquisição de 50.000 eventos dentro do *gate* selecionado.

Aquisição e análise por citometria de fluxo

A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com laser de argônio para 488-nm e a análise foi feita através do *software* CELLQuest versão3.1 (BD Biosciences).

Para a análise da contagem absoluta e percentual de células CD34⁺ utilizou-se a estratégia de *gates* (janelas) Trucount-ISHAGE preconizado por Brocklebank e Sparrow¹⁵, mostrado na figura 1 (fig 1). Utilizou-se *plots* para se referir aos quadrantes. Como exposto no plot 1, fig 1, o limite (*threshold*) utilizado para análise dos dados baseou-se na expressão do CD45 a fim de garantir que células com CD45 de menor intensidade de fluorescência e células CD34⁺ não fossem excluídas da análise. Os leucócitos vivos foram identificados pelos eventos 7AAD negativos (fig 1, plot 2), a demarcação das células mortas (região 7, (R7)) serviu também para a retirada dos *beads* da contagem do CD34⁺. Os *beads* Trucount, eventos com fluorescência brilhante, estão enumerados na Região 6 (R6), fig 1, plot 8. As células CD34⁺ estão representadas na Região 4, fig, plot 6, enumerados no *gate* 4 (G4). O número de células CD34⁺ por microlitro de sangue foi calculado da seguinte forma:

$$\frac{(\text{N}^\circ \text{ de céls CD34}^+ (\text{G4}) \times \text{N}^\circ \text{ de } \textit{beads} \text{ Trucount do tubo})}{(\text{N}^\circ \text{ de } \textit{beads} \text{ contados (G6)} \times 100\mu\text{L})} \times \text{fator de diluição da amostra}$$

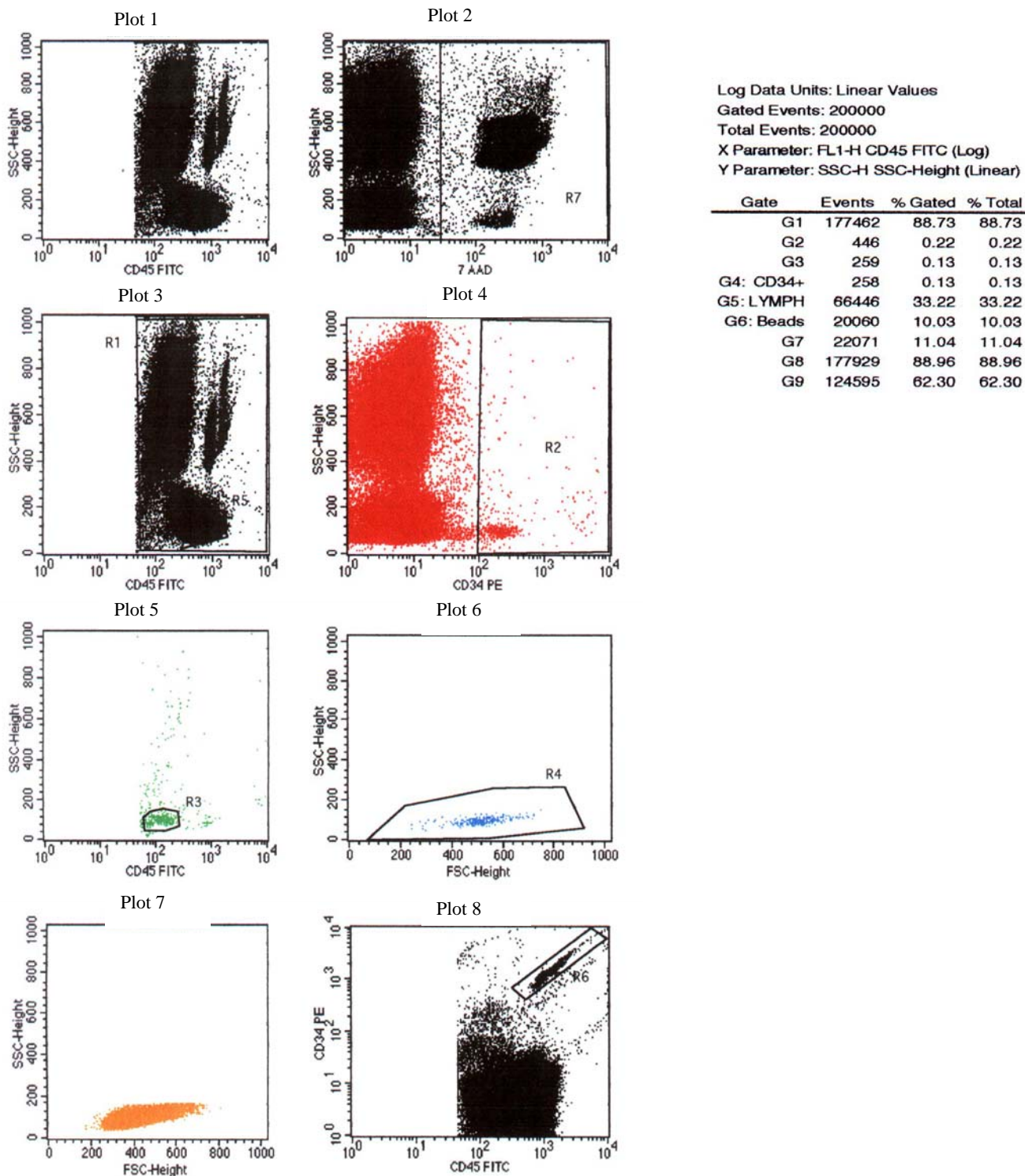


Figura 1. Estratégia de Gates ISHAGE modificada utilizando tubos Trucount com CD45 FITC, CD34 PE e 7AAD em sangue de cordão umbilical e placentário. Plot 1: limite utilizado baseando-se na expressão do CD45 para de garantir que células com CD45 de menor intensidade de fluorescência e células CD34⁺ não fossem excluídas da análise. Plot 2, região 7 (R7): para exclusão de eventos 7AAD positivos e retirada dos beads da contagem do CD34⁺. Plot 3, Região 1 (R1): células CD45⁺ vivas e Região 5 (R5) define a população de linfócitos. Plot 4, Região 2 (R2): gate em células, CD45⁺CD34⁺ vivas. Plot 5, Região 3 (R3): células CD45⁺CD34⁺ vivas. Plot 6, Região 4 (R4): células CD45⁺CD34⁺ vivas em *forward* e *side scatter*. Plot 7: linfócitos vivos. Plot 8, Região 6 (R6): beads Trucount.

Para a análise do percentual de células CD34⁺, CD38⁻ e CD117⁺ inicialmente analisou-se o tubo controle e tubo contendo somente células a fim de definir negatividade e positividade. A seguir foi utilizada estratégia similar àquela preconizada pelo método ISHAGE em que foi selecionada a população CD45⁺, e após, dentre as células CD45⁺, selecionou-se as que possuíam CD34, e entre estas verificou-se as que marcavam CD38⁻ ou CD117⁻, CD117⁺. Pela análise dos percentuais nos determinados quadrantes obtivemos as células CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁺ e CD34⁺CD117⁻.

Correlações entre parâmetros fisiológicos, hematológicos e imunofenotípico

Foram realizadas 64 correlações, analisando-se parâmetros fisiológicos, imunofenotípicos e hematológicos do SCUP. Os parâmetros: volume de SCUP, idade gestacional, peso do RN, CNT, células CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁺ e CD34⁺CD117⁻ e o número de eritroblastos, foram todos correlacionados entre si e entre as variantes: tipo de parto, sexo do RN, comprimento do cordão e idade materna. Ainda, o número de eritroblastos foi relacionado com hemoglobina, VCM, RDW, enquanto que a idade gestacional foi correlacionada com VCM, eritrócitos, neutrófilos e linfócitos e, por fim, o peso do RN com o número de eritrócitos. Dessas, detalhamos apenas as que apresentaram correlações significativas.

Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado a partir de valores de freqüência de células CD34⁺/CD38⁻ obtidos por estudo piloto, utilizando-se um $p < 0,05$ com um poder de 80% e sugeriu 30 amostras a serem estudadas. Este cálculo foi feito pelo programa estatístico *n Query Advisor 3.0*. No entanto, para efeitos de enriquecimento dos dados foram avaliadas 70 amostras de SCUP.

A comparação entre os grupos foi realizada utilizando-se o teste t de Student e a avaliação das variáveis quantitativas utilizando-se a correlação de Pearson. Utilizou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) vs 8.

As correlações consideradas com significância estatística são aquelas onde os valores de p são menores que 0,05 ou 0,01.

Resultados:

Entre as 70 amostras de SCUP analisadas, 37 amostras (53%) foram obtidas por parto cesareano e 33 (47%) por parto normal. Em relação ao sexo dos recém-nascidos, 43 bebês (61%) eram do sexo masculino e 27 (39%) do sexo feminino. As características das mães, dos recém-nascidos e das amostras de SCUP estão apresentadas na tabela 1. O volume de SCUP coletado variou de 20 até 206 mL (tabela 1) e a quantificação de células-tronco hematopoéticas no SCUP mostrou uma média de 31 células CD34⁺/μL do SCUP (tabela 2). Dessas 70 amostras, em 49 as moléculas CD38 e CD117 foram investigadas sobre as células CD34+. A tabela 2 apresenta os valores encontrados para os marcadores de superfície celular pesquisados.

Todas as amostras processadas pelo método sugerido por Brocklebank e Sparrow¹⁵ foram realizadas em duplicata não havendo diferença significativa entre elas, em relação aos valores de CD34, para um intervalo de confiança de 95%, pelo teste t de Student para amostras pareadas.

Tabela 1: Idades materna e gestacional, peso do recém-nascido (RN), comprimento do cordão, peso da placenta e volume de SCUP coletado.

	Número (n)	Média \pm desvio padrão	Mediana	Varição
Idade materna (anos)	70	25,7 \pm 6,4	25,0	16 - 40
Idade gestacional (semanas)	70	39,1 \pm 1,3	38,6	37 - 42
Peso do RN (g)	70	3369,1 \pm 498,0	3350,0	1930 - 4530
Comprimento do cordão umbilical (cm)	70	59,6 \pm 15,1	55,5	35 - 105
Peso da placenta (g)	66	629,7 \pm 169,3	600,5	300 - 1210
Volume (mL)	70	53,8 \pm 33,6	48,0	20 - 206

Tabela 2: Quantificação de células CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁻ e CD34⁺CD117⁺.

	Número (n)	Média \pm desvio padrão	Mediana	Varição
CD34 (céls/ μ L)	70	30,96 \pm 18,9	28,17	7,9 – 93,9
CD34 (%) [*]	70	0,24 \pm 0,14	0,22	0,06 – 0,65
CD34 ⁺ CD38 ⁻ (%) ^{**}	49	16,66 \pm 8,32	16,58	1,44 – 38,39
CD34 ⁺ CD117 ⁻ (%) ^{**}	49	47,23 \pm 24,0	47,12	7,67 – 92,11
CD34 ⁺ CD117 ⁺ (%) ^{**}	49	52,77 \pm 24,0	52,88	7,89 – 92,33

* Entre as células CD45⁺, ** Entre as células CD34⁺

Entre as 64 correlações analisadas, 14 correlações mostraram significância estatística. Quando comparados o volume, o comprimento do cordão e as variáveis células CD34⁺, CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD117⁻ e células CD34⁺CD117⁺ com o tipo de parto e o sexo do bebê não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pelo teste t de Student para amostras independentes. Em relação à quantidade de células CD34⁺ e CD34⁺CD38⁻ não houve correlação observada segundo a correlação de Pearson.

Correlacionando-se o volume de SCUP coletado (mL) e o peso do recém-nascido (g), obtivemos significância estatística com $r = 0,49$, $p < 0,01$ (Figura 2 A). Ao relacionarmos o peso da placenta (g) com o volume de SCUP (mL) obtivemos significância pela correlação de Pearson ($r = 0,296$) para um $p < 0,05$ (Figura 2 B).

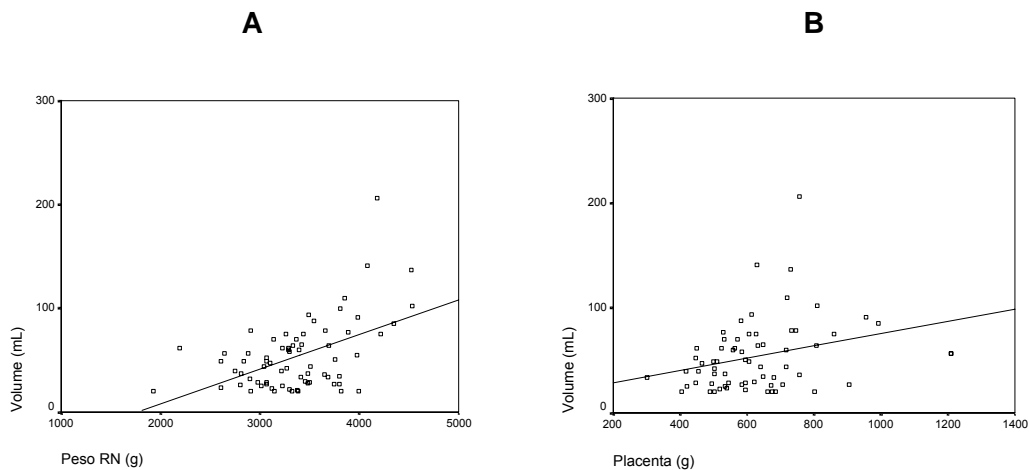


Figura 2: Correlação do volume de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) obtido com (A) o peso do recém-nascido (g) e (B) o peso da placenta (g).

Uma maior quantidade de células $CD34^+$ por microlitro de SCUP e entre as células $CD45^+$ foi associada com um maior volume de SCUP coletado ($r = 0,29$, $p < 0,05$, para valores absolutos e $r = 0,36$, $p < 0,01$, para valores relativos), (Figura 3 A e B, respectivamente). Em relação à idade gestacional (semanas) e a quantidade de células $CD34^+$ por microlitro de SCUP, observou-se correlação negativa ($r = - 0,33$, $p < 0,01$), (Figura 3 C). Em relação ao número de células nucleadas totais (CNT), encontramos correlação com o número absoluto de células $CD34^+$ no SCUP ($r = 0,32$, $p < 0,05$), (Figura 3 D).

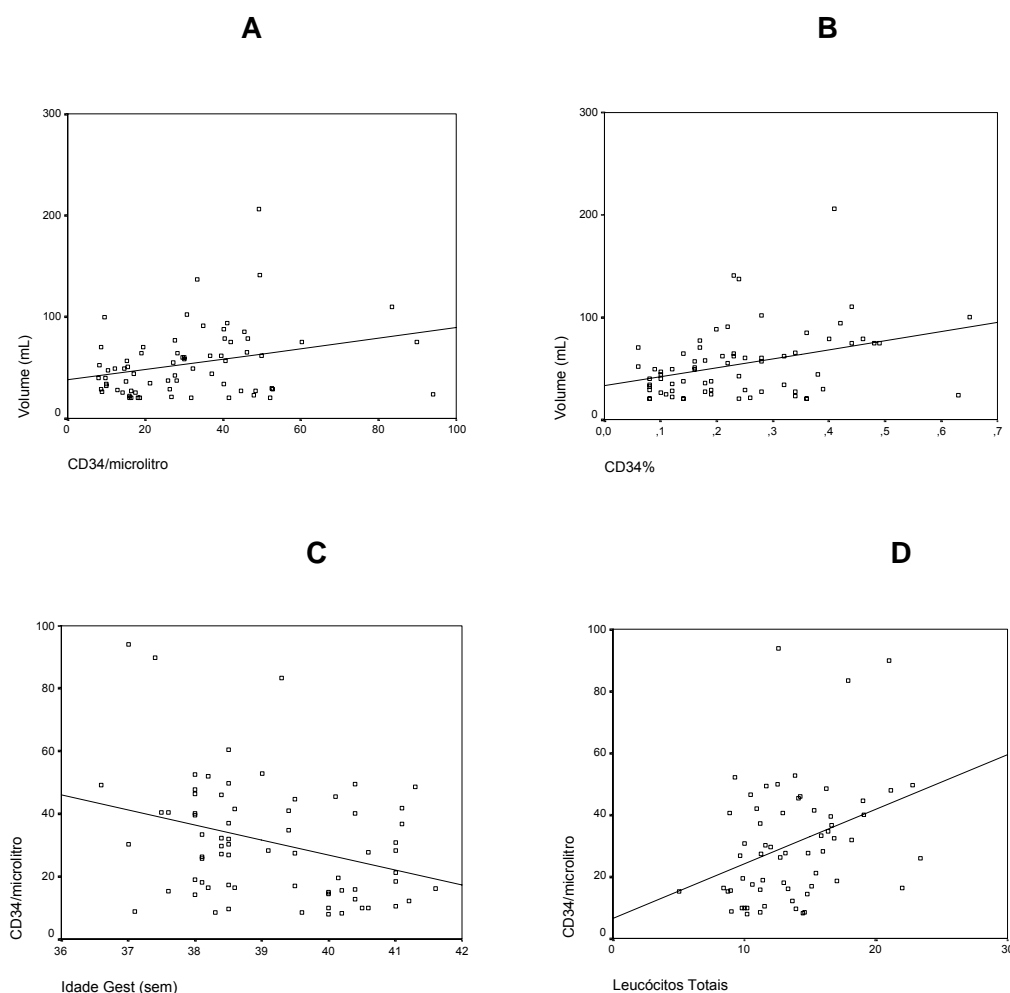


Figura 3: Correlação entre o volume coletado de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) (mL) e (A) o número absoluto de células $CD34^+$ por microlitro de SCUP e (B) o número relativo de células $CD34^+$ entre as células $CD45^+$. Correlação entre o número de células $CD34^+$ por microlitro de SCUP e (C) a Idade Gestacional (semanas) e (D) o número absoluto de leucócitos totais.

Entre as células $CD34^+CD117^+$ e o volume de SCUP houve correlação significativa e negativa ($r = -0,41$, $p < 0,01$) (figura 4 A) enquanto que entre as células $CD34^+CD117^-$ e o volume houve correlação significativa positiva ($r = 0,41$, $p < 0,01$), (figura 4B). Entre as células $CD34^+$ e as células $CD34^+CD117^+$ houve correlação significativa e negativa ($r = -0,41$, $p < 0,01$), (figura 4 C) e correlação significativa e positiva ($r = 0,41$, $p < 0,01$) entre as células $CD34^+$ e $CD34^+CD117^-$ (figura 4 D).

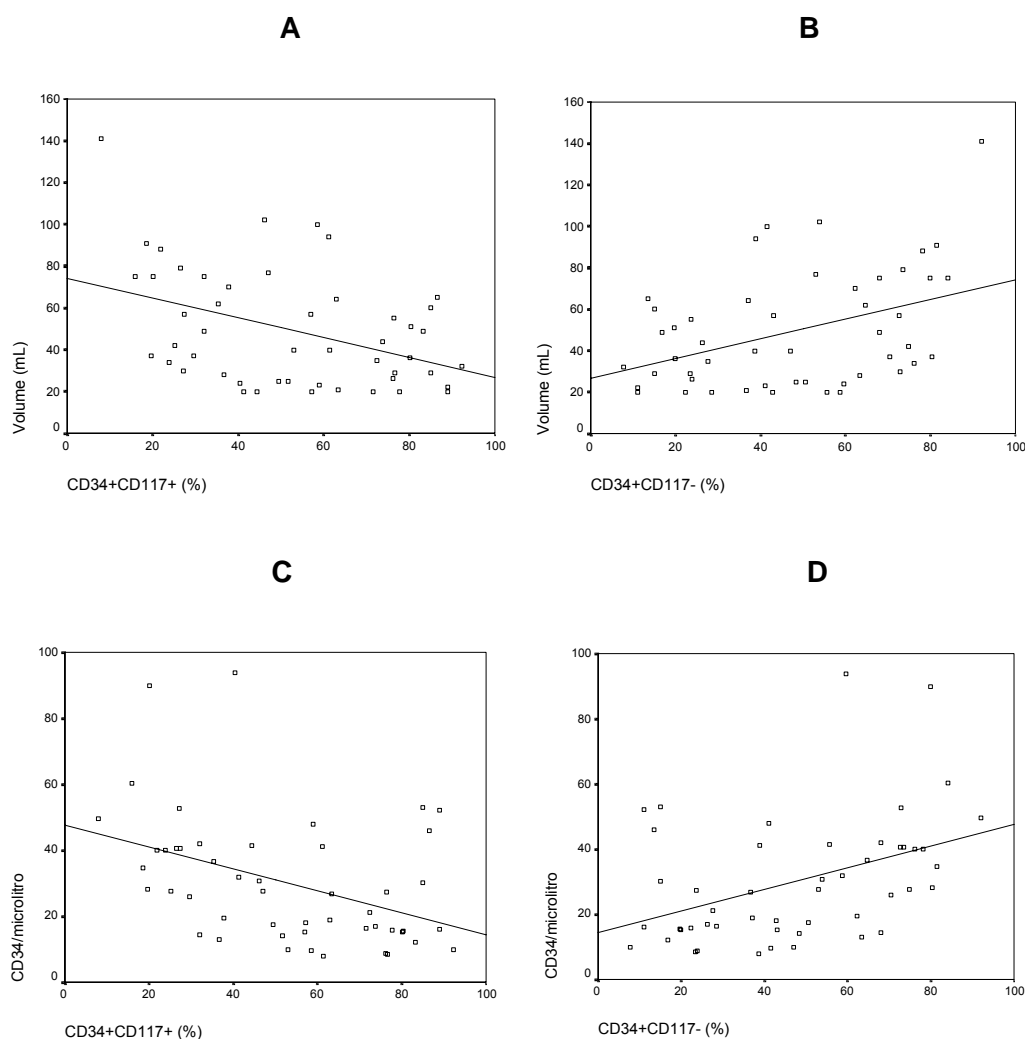


Figura 4: Correlação entre o volume (mL) de SCUP e o número relativo de (A) células $CD34^+CD117^+$ e de (B) células $CD34^+CD117^-$, entre as células $CD34^+$ no SCUP. Correlação entre células $CD34^+$ e o número relativo de (C) células $CD34^+CD117^+$ e de (D) células $CD34^+CD117^-$.

Em relação às CNTs houve correlação significativa e negativa com as células $CD34^+CD117^+$ ($r = -0,45$, $p < 0,01$), (figura 5 A) e correlação significativa e positiva entre

as CNTs e as células $CD34^+CD117^-$ ($r = 0,45$, $p < 0,01$), (figura 5 B). Ainda, em relação às células $CD34^+CD38^-$ houve correlação significativa e negativa com as células $CD34^+CD117^+$ ($r = -0,29$, $p < 0,01$), (figura 5 C) e correlação significativa e positiva entre as células $CD34^+CD38^-$ e as células $CD34^+CD117^-$ ($r = 0,29$, $p < 0,01$), (figura 5 D)

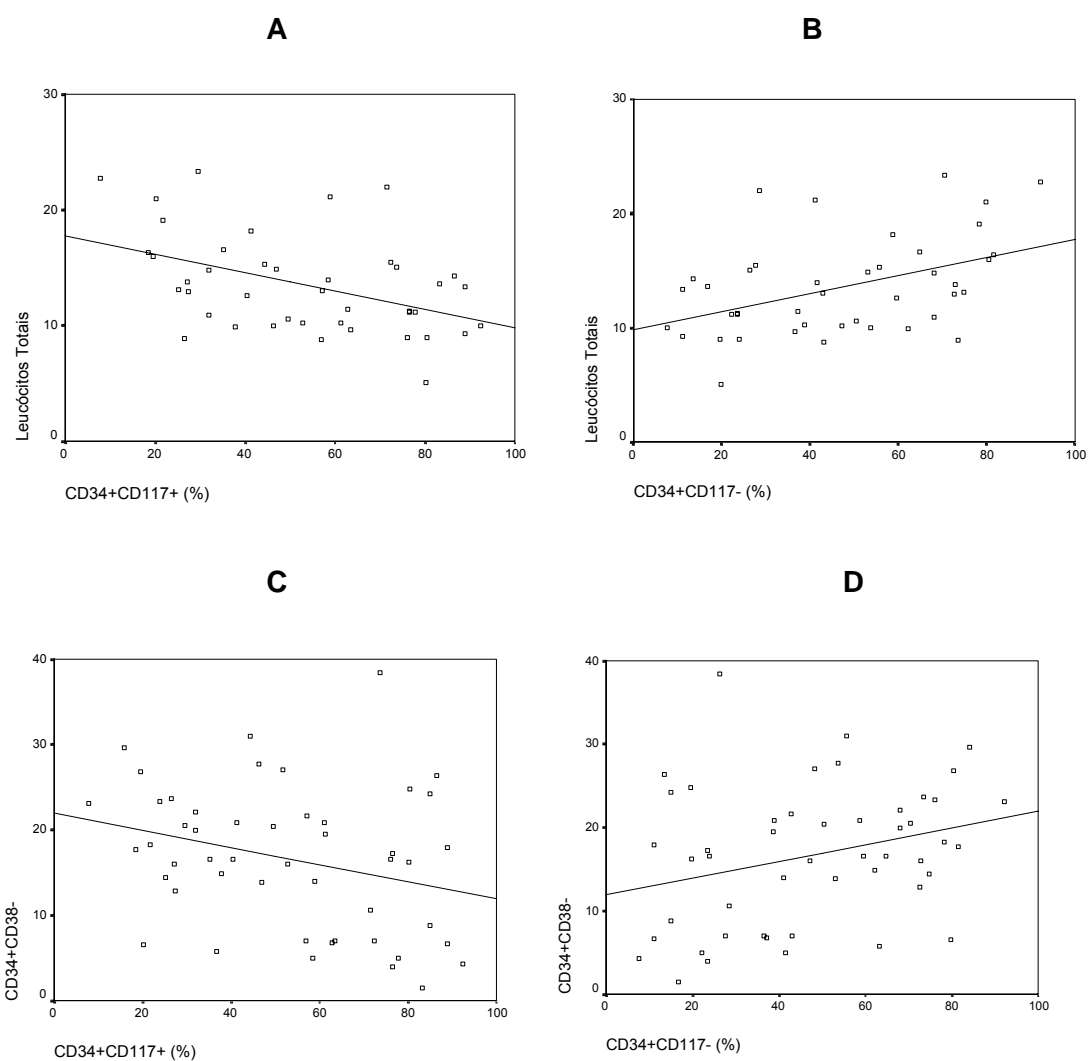


Figura 5. Correlação entre CNTs e (A) células $CD34^+CD117^+$ e (B) células $CD34^+CD117^-$. Correlação entre células $CD34^+CD38^-$ e (C) células $CD34^+CD117^+$ e (D) células $CD34^+CD117^-$.

Todas as outras variantes analisadas não mostraram correlações significativas (anexos V, p.109, VI, p.110 e VII, p.111)

A tabela 3 apresenta os valores dos hemogramas de 62 das 70 amostras de SCUP que foram utilizadas na quantificação de CD34.

Tabela 3: Valores dos hemogramas de 62 das 70 amostras de SCUP coletadas.

	Número (n)	Média ± desvio padrão	Mediana	Varição
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	62	4,37 ± 0,45	4,40	3,45- 5,35
Hemoglobina (g/dL)	62	14,89 ± 1,37	15,03	11,16-18,32
Hematócrito (%)	62	44,83 ± 4,24	45,13	32,42-54,21
CHCM (g/dL)	62	33,24 ± 0,84	33,23	31,72-36,86
VCM (fL)	62	102,67 ± 5,16	102,80	88,31-114,80
HCM (pg)	62	34,13 ± 1,80	34,08	29,61-40,12
RDW (%)	62	14,33 ± 1,29	14,34	11,86-17,67
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	62	13,63 ± 3,84	13,08	5,04-23,35
Bastões (%)	60	2,19 ± 3,03	1,0	0,0-15,0
Segmentados(%)	62	50,62 ± 10,61	52,0	24,0-78,0
Linfócitos (%)	62	35,77 ± 10,03	35,30	9,0-60,0
Eritroblastos (em 100 leucócitos)	57	7,52 ± 10,35	4,50	0,0-56,0
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	33	268,30 ± 72,93	268,0	47,0-391,0

Discussão

Os bancos públicos de sangue cordão umbilical e placentário fornecem doadores alogênicos de células-tronco com grande rapidez devido ao material estar prontamente disponível para o uso, sem a necessidade de se aguardar um doador de medula óssea. Com a expansão do número de bancos de SCUP em diversas partes do mundo, cada vez mais se tem conseguido ampliar a diversidade de doadores HLA compatíveis e diminuir o tempo de espera por um doador não aparentado, idêntico ou não⁴.

A caracterização de unidades de SCUP facilita o entendimento de fatores que afetam a qualidade e a melhoria dos resultados do transplante¹⁶. Por esta razão, normas para o processamento, quantificação, manipulação e congelamento devem ser estabelecidas e seguidas, a fim de garantir as características mínimas da unidade a ser utilizada. A utilização de protocolos validados, e que comprovadamente possuem reduzido coeficiente de variação entre os laboratórios que realizam essas contagens, é

de fundamental importância no que se refere ao controle de qualidade dos bancos de SCUP. Ao utilizarmos um protocolo que possui menos de 10% de variação interlaboratorial para esta técnica com plataforma única¹⁷, estamos certamente agregando qualidade às amostras estocadas em nosso país e que podem vir a ser utilizadas por qualquer receptor que delas necessite.

O valor de células-tronco hematopoéticas, consideradas células CD34⁺, encontradas neste estudo foi em média $31 \pm 18,9$ CD34⁺ / μ L de SCUP, variando de 8 a 94 células, revelando o perfil de 70 amostras de SCUP da população de recém-nascidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Pranke e colaboradores¹⁸ usaram o protocolo ISHAGE com exclusão de células 7AAD⁺ e encontraram $35,6 \pm 19,4$ células CD34⁺ / μ L em amostras de SCUP coletadas em Nova York, Estados Unidos. Porém, como esse tipo de estudo é inexistente no Brasil, não existem dados regionais com os quais os mesmos possam ser comparados. Em relação ao estudo de Brocklebank e Sparrow¹⁵ os valores encontrados no presente estudo foram menores em relação ao estudo daqueles autores que encontraram, por microlitro de SCUP, entre 22 a 600 células CD34⁺ 7AAD negativas. Por outro lado, resultados similares aos do presente estudo foram encontrados por Chin-Yee e colaboradores¹⁹ que encontraram de 15 a 148 células CD34⁺/ μ L de SCUP, assim como Barnett e colaboradores²⁰ os quais encontraram entre 14 a 63 dessas células em amostras de SCUP estabilizado. Essas diferenças podem ser decorrentes da própria heterogeneidade das células do sangue de cordão, bem como de diferenças entre as técnicas utilizadas pelos grupos²¹.

Além disso, já foram descritos uma série de fatores que podem influenciar a quantificação de células CD34 no SCUP e que poderiam explicar as variações entre os resultados na quantificação destas células. Uma longa duração de estresse durante o trabalho de parto mostra um aumento no número de células nucleadas, granulócitos, células CD34⁺ e células progenitoras hematopoéticas no SCUP²². O parto cesareano proporciona a coleta de um maior volume de sangue quando comparado ao parto

normal aumentando, conseqüentemente, o valor absoluto de células CD34⁺²³. Outros estudos mostraram que fatores como peso e sexo do recém-nascido e idade da mãe podem influenciar a concentração de células CD34⁺^{16,24}. Nós não encontramos nenhuma influência do tipo de parto com o volume, bem como do sexo e peso do neonato ou idade da mãe na quantificação das células CD34⁺, embora houve correlação positiva entre o volume do SCUP coletado com o peso do RN o que, conseqüentemente, pode influenciar no aumento absoluto de células CD34⁺. Por outro lado, quantificação de células CD34⁺ realizada sem a utilização do 7AAD, ou outro marcador para células mortas, pode ser um dos fatores responsáveis pelo maior número de células CD34⁺ no SCUP em outros estudos.

Em um estudo multicêntrico realizado para validação do método ISHAGE entre 36 laboratórios internacionais (entre estes o Laboratório de Imunologia de Transplantes da Santa Casa de Porto Alegre, Brasil, onde o presente trabalho foi realizado) encontrou-se uma variação de 35 a 60 de células CD34⁺/μL nas amostras de sangue periférico analisadas²⁵. O presente estudo mostrou $0,24 \pm 0,14$ de células CD34⁺ entre as células CD45⁺ e Pranke e colaboradores¹⁸ encontraram $0,28 \pm 0,15\%$ destas células entre o mesmo marcador leucocitário em amostras de SCUP doados para o “*Placental Blood Program*” de Nova York. Esses achados sugerem que as variações encontradas nas quantificações de CTH do SCUP sejam, provavelmente, devido a fatores técnicos ou a variações fisiológicas, e não em relação à origem étnica das amostras doadas.

Em relação ao percentual de células CD34⁺CD38⁻ encontrado no presente estudo (ao redor de 17% sobre o total de células CD34⁺) observa-se que este valor está em conformidade com alguns dados já referidos por outros autores, como nos estudos realizados por D’Arena²⁶, Hao²⁷ e Timeus²⁸ e seus colaboradores, apesar da grande divergência dos resultados encontrados em relação a essas células, variando desde 2,6% ou 3,9%^{8,29,30} até ao redor de 35%³¹ entre as células CD34⁺. Esses achados mostram a grande dificuldade em quantificar esses eventos considerados raros.

Resultados interessantes são ainda os descritos por Malangone e colaboradores⁵ quando da coleta das últimas frações de SCUP, sugerindo que quanto maior o volume, maior a probabilidade de se obter células mais imaturas residuais oriundas da placenta. Em outros estudos^{32,33}, a variação em relação à idade gestacional já foi indicada ser um fator inversamente proporcional ao número de células CD34⁺CD38⁻ no SCUP, correlação esta não encontrada no presente trabalho.

Outro fator que pode influenciar na variação do percentual de células CD38 negativas entre as células CD34 positivas, no presente ou em outros estudos, pode ser devido ao fato das células em apoptose não terem sido excluídas, ou seja, o percentual foi avaliado sobre as células CD45 totais, viáveis ou não-viáveis (se presente), uma vez que nesta análise o 7AAD não foi utilizado. Divergências também podem ocorrer devido aos diferentes fluorocromos utilizados na marcação de anticorpos monoclonais anti CD38. Sabe-se, por exemplo, que anticorpos marcados com PE (ficoeritrina), pela baixa ligação não específica com células mortas e melhor demarcação entre células positivas e negativas³⁴, podem ser mais indicados para o uso na pesquisa de eventos raros por citometria de fluxo. Assim, uma vez que no presente estudo utilizou-se o anticorpo anti-CD38 marcado com PE, tal fato pode ter minimizado o efeito negativo da não utilização do 7AAD para identificar células mortas. Ainda, o fato das amostras terem sido processadas dentro de 24 horas após o parto, diminui a possibilidade de haver células mortas ou em apoptose, como tem sido mostrado em diversos estudos, onde a viabilidade das células do SCUP até 36 horas após o nascimento do RN é ao redor de 95%^{35,36,37}. Assim, a não utilização do 7AAD na avaliação das moléculas CD38 e CD117 não deve ter comprometido os resultados das análises. Entretanto, a utilização do 7AAD também possui resultados controversos quando as metodologias que o usam e que não o usam são comparadas. Sabe-se que o 7AAD identifica células mortas e em apoptose³⁸ e que, no estudo de Keeney¹⁷, evidenciou-se que a adição deste marcador diminuiu em 50% a presença de células CD34⁺ por microlitro de sangue, sugerindo que

se tratavam de células inviáveis. No entanto, Cabezudo e colaboradores³⁹ comparando diferentes metodologias para contagem de células CD34 não encontrou diferenças entre aquelas que usaram 7AAD e as que não usaram, no que se refere ao número absoluto de células CD34⁺. Porém, apesar desses resultados conflitantes e de a detecção de células inviáveis permanecer problemática, existem situações em que se pode afirmar que o uso do 7AAD se justifica. Em casos onde as células CD34 são clinicamente utilizadas, como nos bancos de sangue de cordão umbilical, a medida da viabilidade celular através do uso do 7AAD é importante, desde que o número destas células é usado para escolher uma amostra de SCUP. Também em casos onde as amostras são criopreservadas, como ocorre nos bancos de SCUP, ou após o cultivo celular, cujo objetivo é o transplante das células congeladas ou expandidas, a viabilidade celular pode ser bastante afetada^{37,38,40}. Assim, o uso do 7AAD, apesar de controverso, é preconizado, permanecendo como consenso a sua utilização, para avaliação da viabilidade celular¹⁷.

A eficácia do transplante de células de SCUP está, em grande parte, relacionada com o número de células nucleadas totais (CNTs) e células CD34⁺. As células CD34⁺CD38⁻ de SCUP possuem alto potencial de proliferação e expansão de células CD34⁺⁴², sugerindo possíveis vantagens quanto ao *homing* e “pega” de células mais indiferenciadas⁹. A capacidade proliferativa também apresenta correlação inversa à idade gestacional³³, corroborando a hipótese de que células CD34⁺CD38⁻ sejam células-tronco hematopoéticas mais primitivas com maior capacidade clonogênica.

Por outro lado, estudo como o realizado por Theunissen e Verfaillie⁴³ sugere que a superioridade do uso do SCUP nos transplantes de células hematopoéticas esteja mais relacionada à habilidade de gerar progenitores do que propriamente à frequência de células imaturas CD34⁺CD38⁻. Além disso, Lapidot e colaboradores⁴⁴ sugerem que as células do SCUP quando transplantadas possuem um potencial reduzido de *homing* para a medula óssea, em comparação às células mais maduras. Entretanto, essa

diferença é compensada pelo fato de que as células do SCUP são mais facilmente mantidas em seu estado imaturo, garantindo os níveis de células progenitoras por mais tempo, quando comparadas ao transplante de medula óssea. Uma “pega” mais rápida e melhor sobrevivência do enxerto são obtidas quando o sangue do cordão fornece, no mínimo, $2,0 \times 10^7$ CNTs e $2,0 \times 10^5$ de células CD34⁺ por quilo de peso corporal de receptor² segundo estudos de Gluckman e colaboradores² ou, de acordo com Laughlin e colaboradores⁴⁵ onde, analisando os resultados dos transplantes de CTHs de SCUP em 68 pacientes adultos, observaram que a média de $1,6 \times 10^7$ de CNTs e de $1,2 \times 10^5$ células CD34⁺ por quilo de peso corporal do receptor foram suficientes para garantir a “pega” do enxerto.

Sabe-se que o número de CNT e o número de incompatibilidades HLA (*mismatches*) interagem mutuamente na “pega” e na frequência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), podendo-se pensar que um maior número de CNT poderia suprimir parcialmente o impacto negativo de *mismatches* HLA⁴⁶. Entretanto, esta hipótese ainda não está totalmente comprovada⁴⁶. Gluckman e colaboradores⁴⁶, no entanto, observaram a correlação entre um maior número de CNT e um menor número de disparidades HLA com a maior probabilidade de “pega” do enxerto. Por outro lado, a maior disparidade HLA relaciona-se com uma alta incidência de DECH graus III-IV e uma menor incidência de recaída em leucemias agudas, evidenciando o efeito enxerto contra leucemia. Sendo assim, a escolha de uma boa unidade de sangue de cordão umbilical a ser utilizada deve se basear no número de CNT e no número de alelos HLA compatíveis⁴⁶. No presente estudo encontrou-se correlação entre a quantidade de CNTs e a quantidade de células CD34⁺ por microlitro de sangue, como descrito por Cairo⁴⁷ e Nakagawa²⁴ e seus colaboradores. Solves e colaboradores⁴⁸ encontraram correlação entre a quantidade de CNTs e o valor percentual de células CD34⁺ em maiores volumes coletados com a placenta ainda no útero, em concordância com resultados de outros autores^{49,50}, apesar deste procedimento não ser realizado nas

coletas dos bancos públicos de SCUP. Cairo e colaboradores⁴⁷ mostraram correlação, também, entre o número de eritroblastos com células CD34⁺ e células CD34⁺CD38⁻, correlações estas não encontradas no presente estudo.

Nossos achados demonstram a existência de correlação entre o volume coletado e o número de células CD34⁺ tanto por microlitro de SCUP, quanto no percentual destas células entre as células CD45⁺. Bradley e colaboradores⁴, avaliando um estudo com 1.200 doadores, observaram que amostras com grandes volumes estão correlacionados com altas doses de CNT, células CD34⁺ e unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Jones e colaboradores⁵¹, observando 9.205 casos, verificaram que fatores como o peso do recém-nascido e da placenta, maior comprimento do cordão umbilical, parto cesareano e idade gestacional avançada influenciam significativamente o volume de sangue coletado e número de CNTs. Nossos resultados também mostraram correlação entre o peso do recém-nascido e da placenta com o maior volume coletado, assim como nos estudos de Solves e colaboradores⁵⁰, mas não nos outros parâmetros. Também foram encontradas correlações entre a idade gestacional avançada com o volume⁵² e o número de células CD34⁺. No presente estudo, essas correlações não foram observadas.

Yamada e colaboradores²³ relataram que o número de células CD34 por microlitro de sangue foi significativamente maior nas amostras provenientes de partos cesareanos, devido ao grande volume coletado. Entretanto, Cairo⁴⁷, Askari⁵² e Solves⁵³ e seus colaboradores não observaram associação entre o parto cesareano com o número de CNT, células CD34⁺^{47,52,53} e células CD34⁺CD38⁻⁴⁷, bem como no presente estudo.

Em nosso estudo, encontramos que a quantidade de células CD34⁺ por microlitro de SCUP foi inversamente proporcional à idade gestacional, bem como em achados de diversos outros autores^{21,33,54}. Porém, se por um lado, o SCUP de prematuros apresenta uma maior quantidade de células CD34⁺ por microlitro, o volume

coletado neste material é menor que o obtido de SCUP de fetos nascidos a termo, uma vez que quanto mais avançada a idade gestacional, maior o peso da placenta e maior volume de sangue se pode coletar⁵¹. Askari e colaboradores⁵² concluíram ainda, que a contagem de CNTs parece ser mais afetada pelas variáveis peso do recém-nascido e da placenta, maior comprimento do cordão, volume coletado e idade gestacional do que a contagem de células CD34⁺. Entre nossos achados, encontramos correlação entre o volume e a quantidade de células CD34 (valor absoluto e percentual), mas não entre o volume e o número de CNTs. Além disso, observamos que a quantidade de células CD34⁺ e a contagem de CNTs estão diretamente correlacionadas. Ainda no presente estudo, encontramos correlações negativas quanto à presença relativa de células CD34⁺CD117⁺ entre a população de células CD34⁺ com os parâmetros: volume, leucócitos totais, número de células CD34⁺ por microlitro de SCUP e percentual de células CD34⁺CD38⁻. Por outro lado, os mesmos parâmetros apresentaram correlações positivas em relação às células CD34⁺CD117⁻.

A molécula CD117 é o receptor do fator de crescimento de células-tronco e está envolvida nas interações das células CD34⁺ com as células do estroma e outras células na medula óssea. A sua expressão entre as células CD34⁺ pode variar desde 58%⁵⁵ até 81%²⁶ e entre as células CD34⁺CD38⁺ e CD34⁺CD38⁻, o c-kit é expresso em 80±10% e 56±24% dessas células, respectivamente²⁹, no SCUP. Porém, os achados na literatura ainda são conflitantes sobre se as células-tronco hematopoéticas mais primitivas expressam essa molécula em altos^{56,57,58,59,60} ou baixos níveis³⁶, ou não o expressam⁵⁵.

Estudos mostraram que células com fenótipos CD117^{low} têm sido utilizadas para descrever células progenitoras quiescentes, baseando-se no fato de que a baixa expressão do c-kit na superfície celular poderia “proteger” a célula, impedindo-a de receber estímulos e diferenciar-se caracterizando-a assim, como uma célula mais primitiva⁶¹. Outros estudos mostraram que células com fenótipos CD117^{high} sugerem ser células relacionadas com formação de colônias celulares⁶².

Assim, podemos sugerir que células apresentando o fenótipo CD34⁺CD117⁻, ou baixa expressão na superfície, parecem variar com o volume obtido, bem como com a presença de CNTs, células CD34⁺ e CD34⁺CD38⁻.

Dessa forma, pode-se observar que vários fatores podem influenciar na contagem de CNTs e de células CD34⁺ e, conseqüentemente, no sucesso do transplante. Procedimentos como o clampeamento do cordão o mais perto possível do corpo do bebê, visando obter um cordão mais longo, e a coleta do sangue do cordão efetuada o mais rápido possível após o nascimento, certamente fornecem um maior volume coletado, como sugere Jones e colaboradores⁵¹. Além disso, Nakagawa e colaboradores²⁴, sugerem que um menor tempo entre a coleta e a manipulação da amostra (contagem celular) pode aumentar a concentração de células CD34⁺. Cuidados como estes podem ser de grande valor na aquisição e armazenamento de amostras com melhor padrão de qualidade, evitando-se assim que um material tão rico e com tanto potencial proliferativo não seja aproveitado em toda a sua plenitude.

Sendo assim, podemos sugerir que como o volume de SCUP coletado afeta diretamente a quantidade de células CD34⁺ por microlitro de sangue e possivelmente a quantidade de células nucleadas totais é necessário que alguns cuidados sejam tomados no momento da coleta visando aumentar o volume a ser coletado. Entre eles, o fato de que a coleta desse material deve ser realizada por indivíduos treinados para este fim, pois quanto mais tempo decorrer do momento da retirada da placenta e do cordão, menor será o rendimento obtido e conseqüentemente menor o número de células CD34⁺ e CNTs.

Com isto, é imprescindível que mais pesquisas sejam feitas no sentido de se obter cada vez mais informações a respeito da biologia, quantificação e fatores que podem afetar as coletas do SCUP, pois a cada dia novos resultados mostram que estamos diante de um material com grande capacidade proliferativa e de onde já se conseguiu, segundo estudo recente de McGuckin e colaboradores⁶³, obter células com

características de células embrionárias. Com isso, os estudos mostram que o SCUP poderá ser uma fonte futura de células-tronco para tratar não só as doenças hematológicas, mas várias outras doenças, cujos estudos de plasticidade das células-tronco têm demonstrado a importância destas células na reconstituição de diversos outros órgãos. Deste modo, uma maior compreensão dessas células pode gerar descobertas extraordinárias e de grande valor para a manutenção da vida, visto que até o momento muitas questões ainda permanecem sem respostas como, por exemplo: se tivermos de escolher entre uma unidade com mais células nucleadas (6×10^7) e uma incompatibilidade HLA e outra com menos células (4×10^7) e nenhuma incompatibilidade HLA, o que pode ser melhor para o paciente?⁴⁶. Embora, alguns estudos têm mostrado que a melhor opção parece ser a utilização da primeira amostra^{46,64} uma vez que o risco de desenvolver DECH aguda e crônica em receptores de SCUP com até dois alelos HLA incompatíveis é similar ao receptor de medula óssea de um doador HLA idêntico⁶⁵, mais estudos deverão ser realizados. Dúvidas como essa podem ser minimizadas à medida que as propriedades biológicas dessas células forem sendo investigadas e acrescentadas à questão de que as células do SCUP contêm, de fato, células imaturas e com grande capacidade de se dividirem antes de se diferenciarem, o que pode ser decisivo na avaliação dos resultados do transplante.

Agradecimentos

Agradecemos a equipe do Centro Obstétrico e do Laboratório de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Referências

1. Wagner JE, Barker JN, DeFork TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldmann A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NKC, Davies SM. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. **Blood**, v.100, p.1611-1618, 2002.
2. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human Leukocyte Antigen Matching in Cord Blood Transplantation. **Seminars in Hematology**, v.42, p.85-9, 2005.
3. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse E. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England Journal of Medicine**, v.321, p.1174-1178, 1989.
4. Bradley MB, Cairo MS. Cord Blood Immunology and Stem Cell Transplantation. **Human Immunology**, v. 66, p.431-446, 2005.
5. Malangone W, Belvedere O, Astori G, Adami V, Donini A, Falasca E, Sala PG, Del Frate G, Pittino M, De Anna D, Degrassi A. Increased content of CD34⁺CD38⁻ hematopoietic stem cells in the last collected umbilical cord blood. **Transplantation Proceedings**, v.33, p.1766-1768, 2001.
6. Mayani H, Landsdorf PM. Biology of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Stem Cells**, v.16, p.153-165, 1998.
7. Sandhaus LM, Edinger MG, Tubbs RR, Goormastic M, Baucoco PA, Serafino SE, Bolwell BJ. A simplified method of CD34⁺ cell determination for peripheral blood progenitor cell transplantation and correlation with clinical engraftment. **Experimental Hematology**, v.26, p.73-78, 1998.

8. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Brennier M, Massy M, Ley P, Hemptinne D, Stryckmans P. Comparison of the coexpression of CD38, CD33 and HLA-DR antigens on CD34⁺ purified cells from human cord blood and bone marrow. **Stem Cells**, v.13, p.281-288, 1995.
9. Timeus F, Crescenzo N, Marranca D, Dall'Aglio M, Fazio L, Di Marco M, Saracco P, Ricotti M, Gabutti V. Cell adhesion molecules in cord blood hematopoietic progenitors. **Bone Marrow Transplant** , v.22(1), p.61-62,1998.
10. Cho SH, Chung IJ, Lee JJ, Park ML, Kim HJ. Comparison of CD34⁺ subsets and clonogenicity in human bone marrow, granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood, and cord blood. **Journal of Korean Medical Science**, v.14, p.520-525, 1999.
11. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A, Dorotea L, Tonutti E, Rinaldi C, Pittino M, Baccarani M, Del Frate G, Biffoni F, Sala P, Hilbert DM, Degrossi A. Phenotypic characterization of immunomagnetically purified umbilical cord blood CD34⁺ cells. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v.25, p.141-146, 1999.
12. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34⁺ CD38⁻. **Leukemia**, v.17, p. 960-964, 2003.
13. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cells determination by flow cytometry. **Journal of Hematotherapy**, v.5, p. 213-226, 1996.
14. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando B, Huber A, Janossy G, Johnsen HE, Keeney M, Marti GE, Preijers F, Rothe G, Serke S, Sutherland DR, Van Der Schoot C E, Schmitz G, Papa S. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem progenitors cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. **Cytometry**, v.34 (3), p.128-42, 1998.

15. Brocklebank AM, Sparrow RL. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. **Cytometry**, v.46, p.254-251, 2001.
16. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood progenitor cell concentration and infant sex. **Transfusion**, v.45, p.613-621, 2005.
17. Keeney M, Gratama JW, Sutherland R. Critical role of flow cytometry in evaluating peripheral blood hematopoietic stem cell grafts. **Cytometry**, v.58A, p.72-75, 2004.
18. Pranke P, Hendriks J, Alespeiti G, Nardi N, Rubinstein P, Visser J. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34⁺ cells using the ProCOUNT-BD and ISHAGE protocols with evaluation of CD34⁺ bright cells. **Blood**, v.100 (11), 423b, p.5261, 2002.
19. Chin-Yee I, Anderson L, Keeney M, et al. Quality assurance of stem cell enumeration by flow cytometry. **Cytometry**, v.30, p.296-303, 1997.
20. Barnett D, Granger V, Storie I, et al. Quality assessment of CD34⁺ stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation. **British Journal of Haematology**, v.102, p.553-565, 1998.
21. Yap C, Loh MT, Heng KK, Tan P, Yu SL, Chan SH, Ren EC. Variability in CD34⁺ cell counts in umbilical cord blood: implications for cord blood transplants. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v.50, p.258-259, 2000.
22. Lim FT, Scherjon SA, van Beckhoven JM, Brand A, Kanhai HH, Hermans JM, Falkenburg JH. Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.183, p.1144-1152, 2000.
23. Yamada T, Okamoto Y, Kasamatsu H, Horie Y, Yamashita N, Matsumoto K. Factors affecting the volume of umbilical cord blood collections. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 79, p. 830-833, 2000.

24. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuka H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakayama T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34⁺ cell yield for cord blood banking. **Transfusion**, v.44, p.262-267, 2004.
25. Gratama JW, Kraan J, Keeney M, Sutherland DR, Granger V, Barnett D. Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34 hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. **Cytotherapy**, 2003, 5(1):55-65.
26. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio, Zendoli F, Carotenuto M. Human umbilical cord blood: immunophenotypic heterogeneity of CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. **Haematologica**, v.81, p.404-409,1996.
27. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM. A functional comparison of CD34⁺CD38⁻ cells in cord blood and bone marrow. **Blood**, v.86, p.3745-3753, 1995.
28. Timeus F, Crescenzo N, Basso G, Ramenghi U, Saracco P, Gabutti V. Cell adhesion molecule expression in cord blood CD34⁺ cells. **Stem Cells**, v.16, p. 120-126, 1998.
29. Pranke P, Hendriks J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nardi N, Visser JWM. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38(12), p.1775-1789, 2005.
30. Campagnoli C, Fisk N, Overton T, Bennett P, Watts T, Roberts I. Circulating hematopoietic progenitor cells in first trimester fetal blood. **Blood**, v.95, p.1967-1972, 2000.
31. Almici C, Carlo-Stella C, Wagner JE, Mangoni L, Garau D, Rizzoli V. Biologic and phenotypic analysis of early hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. **Leukemia**, v.11, p.2143-2149,1997.

32. Opie TM, Shields LE, Andrews RG. Cell-surface antigen expression in early and term gestation fetal hematopoietic progenitor cells. **Stem Cells**, v.16, p.343-348, 1998.
33. Gasparoni A, Ciadella L, Avanzini MA, Bonfichi M, Di Mario M, Piazzini G, Martinotti L, Vanelli L, Rondini G, Chirico G. Immunophenotypic changes of fetal cord blood hematopoietic progenitor cells during gestation. **Pediatric Research**, v.47, p.825-829, 2000.
34. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, Matutes E, Newland A, Reilly JT. Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34⁺ haematopoietic stem cells. **Clinical Laboratory Haematology**, v.21, p.301-308, 1999.
35. Shen HP, Ding CM, Chi ZY, Kang ZZ. Effects of different cooling rates on cryopreservation of hematopoietic stem cells from cord blood. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.19(4), p.489-92, 2003.
36. Xiao M, Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. **Journal Hematotherapy Stem Cell Research**, v.12(1), p.115-22, 2003.
37. Bayer-Zwirello LA, Hoffman DE, Adams LA, Wilder PT, Reece MT. The effect of processing and cryopreservation on nucleated umbilical cord blood cells. **Journal of Perinatal Medicine**, v.32(5), p.430-433, 2004.
38. Philpott NJ, Turner AJC, Scopes J, Westby M, Marsh JCW, Gordon-Smith EC, Dagleish AG, Gibson FM. The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. **Blood**, v.87, p. 2244-2251, 1996.
39. Cabezudo E, Querol S, Concelas JA, Garcia J. Comparison of volumetric capillary cytometry with standard flow cytometry for routine enumeration of CD34⁺ cells. **Transfusion**, v.39 (8), p.864-872, 1999.

40. Van Haute I, Lootens N, De Smet S, De Buck C, Verdegem L, Vanheusden K, Pinxteren J, Vandekerckhove B. Viable CD34⁺ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? **Transfusion**. v.44(4), p.547-54, 2004.
41. Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometric absolute CD34⁺ cell counts based on the ISHAGE guidelines. **Cytometry**, v.34, p.61-70, 1998.
42. Encabo A, Mateu E, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. CD34⁺CD38⁻ is a good predictive marker of cloning ability and expansion potential of CD34⁺ cord blood cells. **Transfusion**, v.43, p.383-389, 2003.
43. Theunissen K, Verfaillie CM. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. **Experimental Hematology**, v. 33, p.165-172, 2005.
44. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? **Blood**, v.106, p.1901-1909, 2005.
45. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic Engraftment and Survival in Adult Recipients of Umbilical-Cord Blood from Unrelated Donors. **The New England Journal of Medicine**, v.344 (24), p. 1815-1822, 2001.
46. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michael G, Sanz G, Chan KW, Takahashi TA, Ortega J, Filipovich A, Locatelli F, Asano S, Fagioli F, Vowels M, Sirvent A, Laporte JP, Tiedelmann K, Amadori S, Abecassis M, Bordignon P, Diez B, Shaw PJ, Vora A, Caniglia M, Garnier F, Ionescu I, Garcia J, Koegler G, Rebutta P, Chevret S: Eurocord Group. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. **Experimental Hematology**, v.32, p.397-407, 2004.

47. Cairo MS, Wagner EL, Fraser J, Cohen G, Van de Vem C, Carter SL, Kernan NA, Kurtzberg J. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: A Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. **Transfusion**, v.45 (6), p.856-866, 2005.
48. Solves P, Mirabet V, Larrel L, Moraga R, Planelles D, Saucedo E, Uberos FC, Planells T, Guillen M, Andrés A, Monleon J, Soler MA, Franco E. Comparison between two cord blood collection strategies. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.82, p.439-442, 2003.
49. Pafumi C, Farina M, Bandiera S, Cavallaro A, Pernicone G, Russo A, Iemmola A, Chiarenza M, Leonardi I, Calogero AE, Calcagno A, Cianci A. Differences in umbilical cord blood units collected during cesarean section, before or after the delivery of the placenta. **Gynecological Obstetric Investigation**, v.54(2), p.73-7, 2002.
50. Solves P, Perales A, Moraga R, Saucedo E, Soler MA, Monleon J. Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units. **Acta Haematologica**, v.113(4), p.241-6, 2005.
51. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. **American Journal of Obstetric Gynecology**, v.188 (2), p. 503-509, 2003.
52. Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J. Impact of donor-and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking. **Transfusion**, v.45, p.189-194, 2005.
53. Solves P, Moraga R, Saucedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L, Mirabet V, Planelles D, Carbonell-Uberos F, Monleon J, Planells T, Guillen M, Andres A, Franco E. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. **Bone Marrow Transplant**, v.31(4), p.269-73, 2003.

54. Jin CH, Takada H, Nomura A, Takahata Y, Nakayama M, Kajiwara M, Nakano H, Hara T. Immunophenotypic and functional characterization of CD33⁺CD34⁺ cells in human cord blood of preterm neonates. **Experimental Hematology**, v. 28, p.1174-1180, 2000.
55. Sakabe H, Yahata N, Kimura T, Zeng ZZ, Minamiguchi H, Kaneko H, Mori KJ, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Toyama K, Abe T, Sonoda Y. Human cord blood-derived primitive progenitors are enriched in CD34⁺c-kit⁻ cells: correlation between long-term culture-initiating cells and telomerase expression. **Leukemia**, v.12, p.728-734, 1998.
56. Ramsfjell V, Borge O, Cui L, Jacobsen EW. Thrombopoietin directly and potently stimulates multilineage growth and progenitor cell expansion from primitive (CD34⁺CD38⁻) human bone marrow progenitor cells. **The Journal of Immunology**, v.158, p.5169-5177, 1997.
57. D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Carotenuto M. Thy-1 (CDw90) and c-kit receptor (CD117) expression on CD34⁺ hematopoietic progenitor cells: a five dimensional flow cytometric study. **Haematologica**, v.83, p. 404-409, 1998.
58. Williams DA. Stem Cell Model of Hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P. eds. **Hematology - Basic Principles and Practice** 3rd. ed., New York, Churchill Livingstone, 126-138, 2000.
59. Quesenberry PJ, Colvin GA. Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: Williams. Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. eds. **Hematology** 6th. ed., New York, McGraw-Hill, 29-58, 2001.
60. Papayannopoulou T, Brice M, Broudy VC, Zsebo KM. Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. **Blood**, v.78, p.1403-1412,1991.
61. Ikehara S. Pluripotent hematopoietic stem cells in mice and humans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.223, p.149-155. 2000.

62. McGuckin CP, Pearce D, Forraz N, Tooze JA, Watt SM, Pettengell R. Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. **European Journal of Haematology**, v.71, p.341-350, 2003.
63. McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navrant S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. **Cell Proliferation**, v.38, p.245-255, 2005.
64. Rubinstein P, Carrier C, Carpenter C, et al. Graft selection in unrelated placental/umbilical cord blood (PCB) transplantation: influence and weight of HLA match and cell dose on engraftment and survival (abstract). **Blood**, v.96, p.588, 2000.
65. Grewal SS, Barker JN, Davies SM, Wagner JE. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? **Blood**, v.101 (11), p.4233-4244, 2003.

Anexos

Anexo I

Consentimento Livre e Esclarecido

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE DE
CORDÃO UMBILICAL PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA:**“Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical”****A- PROPOSTA DO PROGRAMA:**

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa “Avaliação imunofenotípica e correlações fisiológicas e laboratoriais das células-tronco hematopoéticas do sangue de cordão umbilical”.

B- OBJETIVOS DO PROGRAMA

As células sanguíneas que ficam na placenta e no cordão umbilical após o nascimento do bebê podem ser úteis para pacientes que necessitam de transplante, já que são células capazes de desenvolver uma nova medula óssea. A reconstituição da medula óssea pode salvar a vida de pacientes com certos tipos de leucemia e outras doenças sanguíneas ou imunes que dependem de uma doação de tecido para obter a cura.

O sangue de placenta que resta após o nascimento é normalmente desprezado. Você está sendo convidada a participar deste projeto de pesquisa porque acaba de dar a luz a um bebê e o sangue da placenta será/foi guardado, ao invés de desprezado. A coleta ocorrerá/ocorreu após o nascimento do seu bebê e não afetou/afetará de nenhuma maneira o parto ou os cuidados dispensados ao seu filho.

O objetivo do projeto de pesquisa é aprendermos mais a respeito do uso das células do cordão umbilical para pacientes que necessitam de um transplante de células de medula óssea. O maior conhecimento da biologia das células tronco hematopoéticas do

sangue de cordão umbilical, poderá auxiliar no sucesso do transplante e melhorar a sobrevida destes pacientes.

Com a sua permissão, o sangue do cordão umbilical de seu filho, poderá ser usado para os objetivos citados anteriormente. Porém, no dado momento, o sangue do cordão umbilical de seu filho (a) **não** será usado para doação para pacientes que precisam de um transplante, mas apenas para pesquisa.

C – RISCOS E DESCONFORTOS POTENCIAIS:

Não existe qualquer tipo de risco na participação no programa. O sangue coletado da placenta não é necessário para o seu bebê após o cordão umbilical ter sido cortado, uma vez que este material seria descartado.

Para proteger a sua privacidade, a sua identificação e a do seu bebê serão guardadas confidencial e temporariamente para os dados da pesquisa. Um número de identificação será colocado na bolsa que acondicionará o sangue, sem que seja identificado o seu nome ou de seu bebê. Todas as informações coletadas serão mantidas confidenciais. Nem você e nem o seu bebê serão identificados em qualquer publicação dos dados que seja realizada.

D- BENEFÍCIOS

O único benefício em participar deste programa é que, doando o sangue da placenta de seu bebê para pesquisa, você poderá ajudar-nos a melhor conhecer a biologia das células tronco do sangue de cordão umbilical humana.

E – CUSTOS:

Não haverá, para a participante, nenhum custo com a realização da pesquisa aqui proposta. Caso você decida não participar do programa, não sofrerá nenhum prejuízo

no atendimento dispensado a você e a seu filho. A decisão de não participar do programa não irá afetar o seu atendimento no Hospital.

F – TERMO DE PARTICIPAÇÃO:

Assuntos de importância para você serão esclarecidos antes de o consentimento ser assinado.

G – ALTERNATIVAS PARA PARTICIPAÇÃO:

Você pode decidir não doar o sangue da placenta de seu filho (a) para o projeto. Caso decida não participar do programa, o sangue da placenta não será coletado, ou, se já coletado, será desprezado, não sendo utilizado para pesquisa.

CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE DE PLACENTA

Declaro que li as informações anteriormente descritas a respeito do projeto de pesquisa “Perfil imunofenotípico e quantificação das células tronco hematopoéticas no sangue de cordão umbilical humano” e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas. Aceito participar da doação de sangue de placenta para o projeto proposto, com o objetivo de pesquisa, não sendo usado para doação.

_____ _/ _/ _

Assinatura da mãe

_____ _/ _/ _

Assinatura do aplicador do consentimento

_____ _/ _/ _

Testemunha

NOTA: Caso a mãe decida não participar, o sangue de placenta não será coletado ou, se já coletado, será descartado. Nas situações descritas o consentimento não deve ser assinado.

AFIRMAÇÃO DO INVESTIGADOR: Foi oferecido ao participante a oportunidade de tirar dúvidas a respeito dos riscos e desconfortos que podem se associar à participação no programa. Todas as respostas foram devidamente respondidas.

_____ _/___/___

Assinatura do investigador

Telefones de contato do investigador

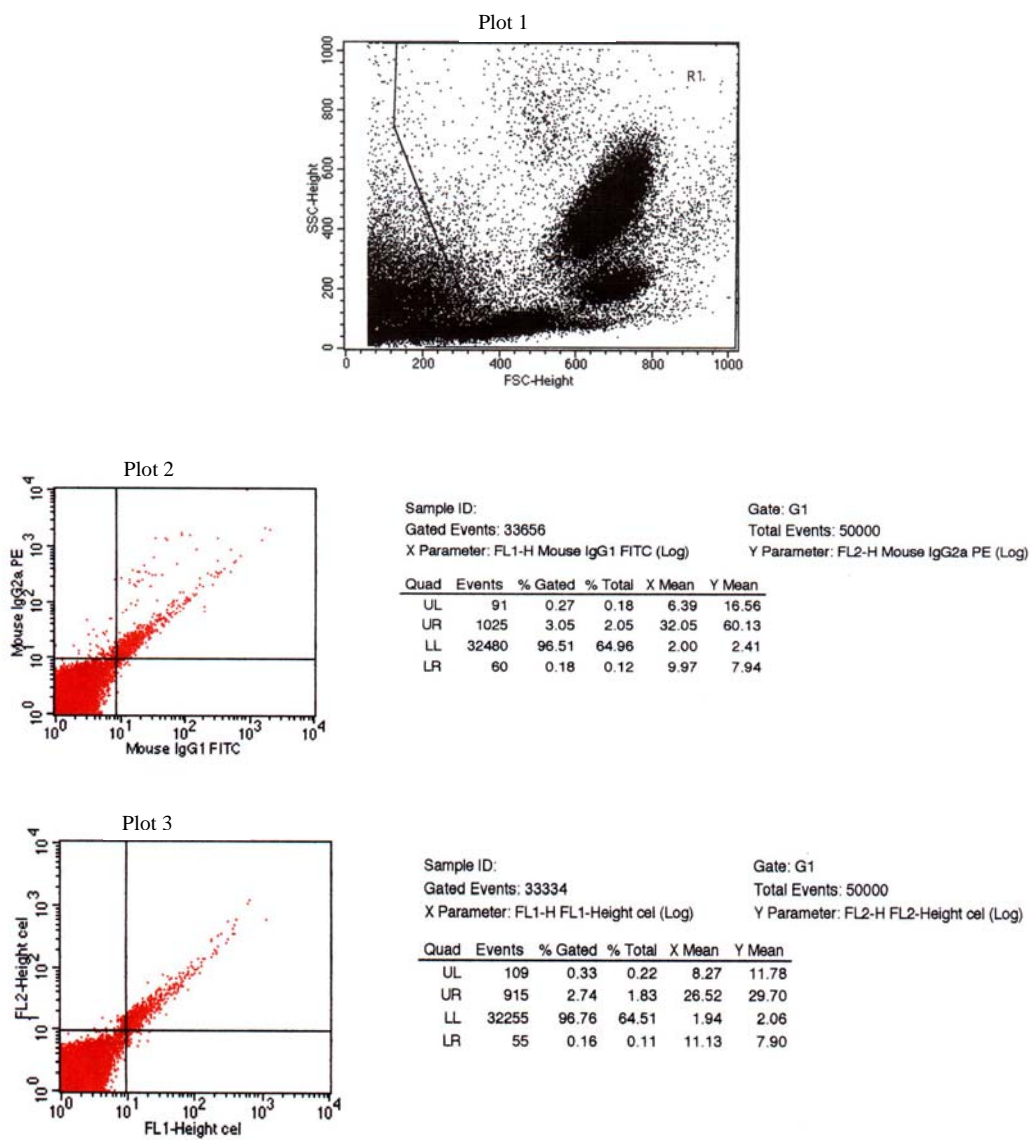
Aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital em 08/08/03

Número: GPPG – HCPA 03 -116

NOTA: Dar uma cópia deste formulário para o paciente ou representante.

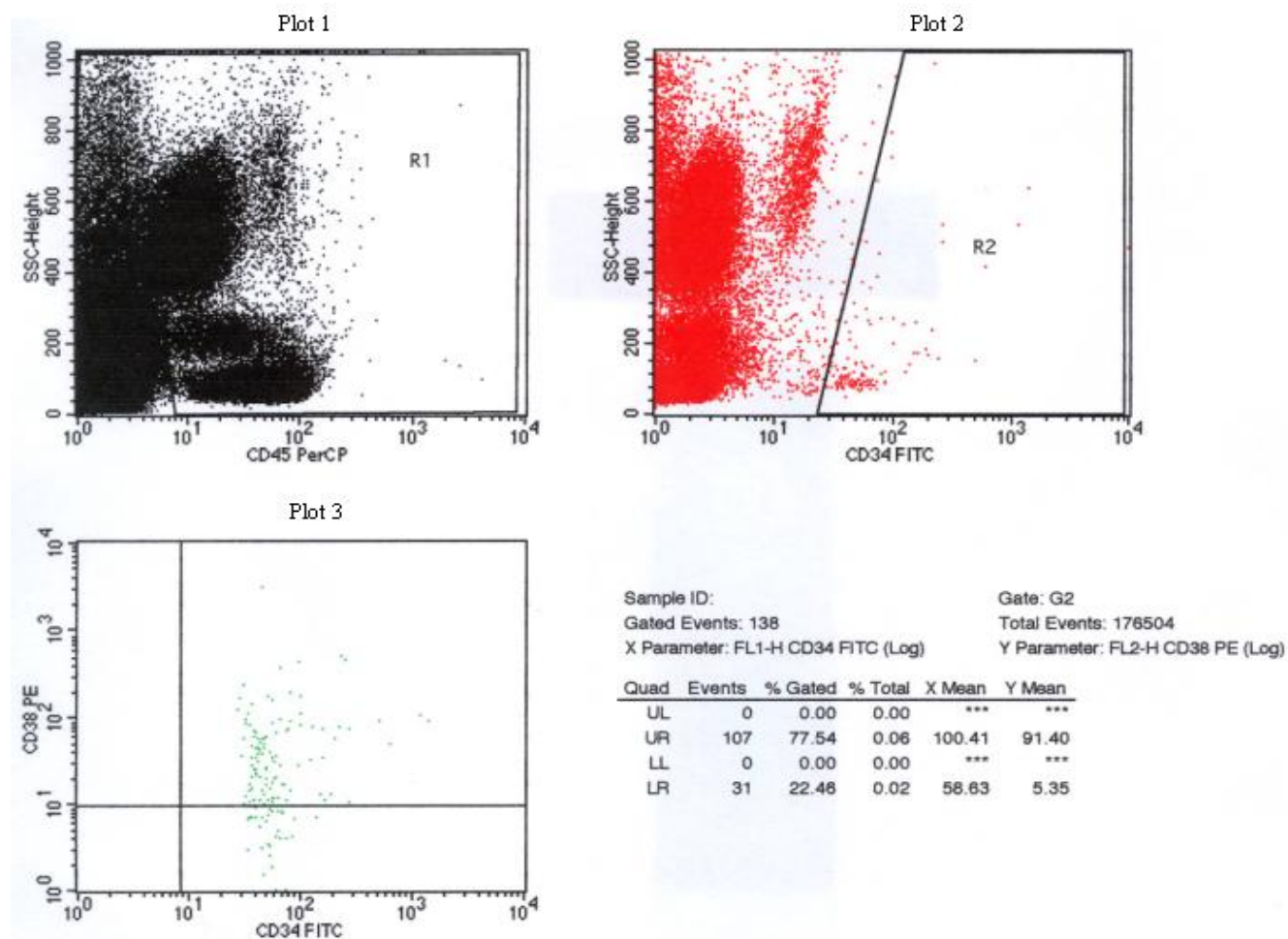
Anexo II

Figura 1. Células e controle negativo utilizados para demarcar ausência de auto-fluorescência e ligações inespecíficas das células



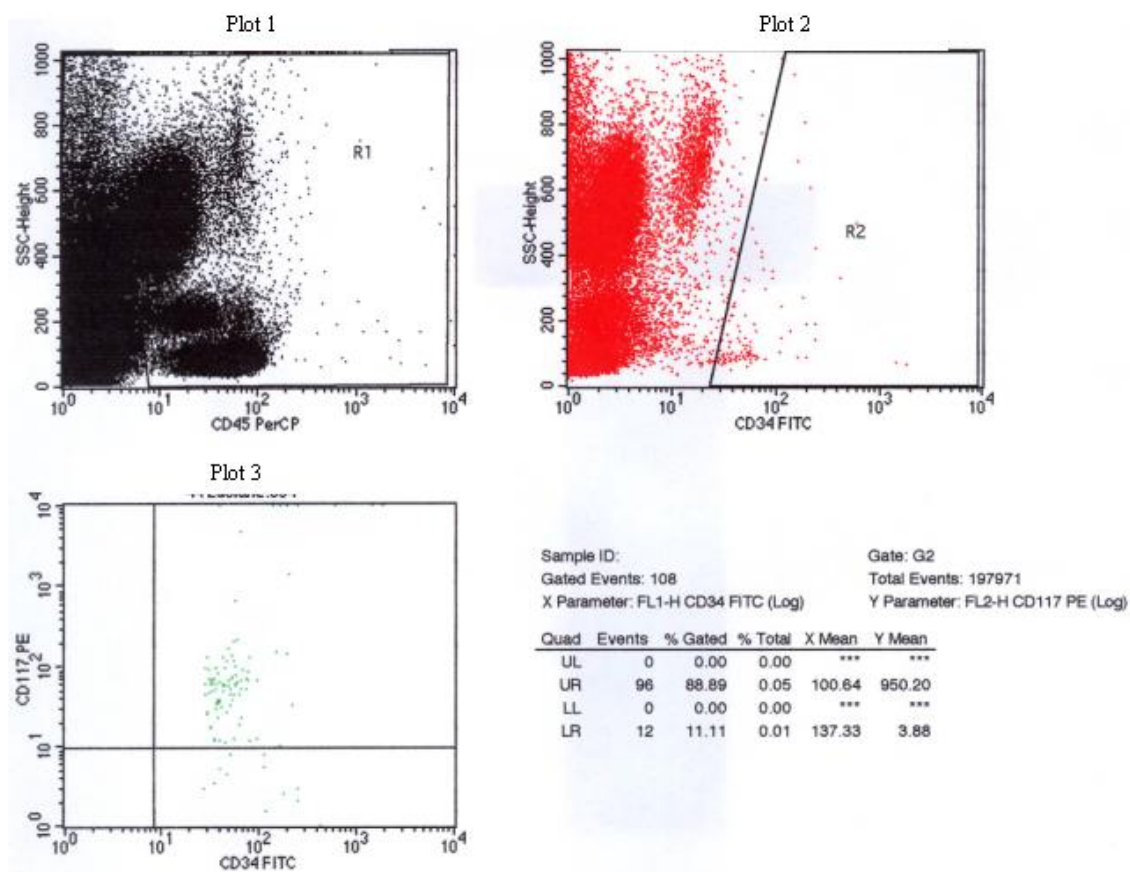
Anexo III

Figura 2. Análise de células CD34CD38.



Anexo IV

Figura 3. Análise de células CD34CD117.



Anexo V

Tabela 1. Correlações avaliando o volume de sangue coletado com parâmetros fisiológicos do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP).

Parâmetro	Avaliada correlação com:
Volume coletado	Tipo de parto
	Sexo do recém nascido
	Comprimento do cordão
	Idade materna
	Células Nucleadas Totais (CNT)
	Peso do recém nascido
	Peso da placenta
	Idade gestacional
	Comprimento do cordão
	Idade gestacional

Anexo VI

Tabela 2. Correlações entre marcadores imunofenotípico e parâmetros fisiológicos do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP).

Parâmetro	Avaliada correlação com:
Células CD34 ⁺ / μ L	Volume Tipo de parto Sexo do recém nascido Comprimento do cordão Idade materna Células Nucleadas Totais (CNT) Idade gestacional Peso do recém nascido Células CD34 ⁺ CD38 ⁻ Células CD34 ⁺ CD117 ⁺ Células CD34 ⁺ CD117 ⁻
% células CD34 ⁺ entre as células CD45 ⁺	Volume
Células CD34 ⁺ CD38 ⁻	Tipo de parto Sexo do recém nascido Comprimento do cordão Idade materna Peso do recém nascido Idade gestacional Volume coletado Células Nucleadas Totais (CNT) Células CD34 ⁺ CD117 ⁺ Células CD34 ⁺ CD117 ⁻
Células CD34 ⁺ CD117 ⁺	Volume coletado Células Nucleadas Totais (CNT)
Células CD34 ⁺ CD117 ⁻	Volume coletado Células Nucleadas Totais (CNT)

Anexo VII

Tabela 3. Correlações entre valores hematológicos e parâmetros fisiológicos e imunofenotípico do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP).

Parâmetro	Avaliada correlação com:
Células Nucleadas Totais (CNT)	Tipo de parto
	Sexo do recém nascido
	Comprimento do cordão
	Idade materna
	Peso do recém nascido
	Idade gestacional
Eritroblastos	Tipo de parto
	Sexo do recém nascido
	Comprimento do cordão
	Idade materna
	Peso do recém nascido
	Idade gestacional
	CD34 ⁺ CD38 ⁻
	CD34 ⁺ CD117 ⁺
	VCM *
	RDW**
	Hemoglobina
	Leucócitos totais
	Volume
	Células CD34 ⁺
Células CD34 ⁺ CD117 ⁺	
Células CD34 ⁺ CD38 ⁻	
Idade Gestacional	VCM*
	Eritrócitos
	Leucócitos totais
	Neutrófilos (valores relativos)
	Linfócitos (valores relativos)
Peso do recém nascido	Eritrócitos

* VCM: Volume Corpuscular Médio.

** RDW: avaliação da anisocitose