

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS DO
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE NEONATOS PRÉ-
TERMOS E NASCIDOS A TERMO E AVALIAÇÃO DOS
FATORES MATERNO E NEONATAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

RAQUEL ARRIECHE FERNANDES

Porto Alegre, Brasil
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

**PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DAS CÉLULAS DO
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL DE NEONATOS PRÉ-
TERMOS E NASCIDOS A TERMO E AVALIAÇÃO DOS
FATORES MATERNO E NEONATAIS**

RAQUEL ARRIECHE FERNANDES

A apresentação desta dissertação
é exigência do Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança
e do Adolescente, da
Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, para obtenção do
título de mestre

Orientador: Marcelo Zubaran Goldani

Co-orientadora: Patricia Pranke

Porto Alegre, Brasil
2011

Ficha catalográfica

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO
ADOLESCENTE

ESSA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

09/09/2011

E FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Carla da Silva Benetti

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Dra. Isabel Cristina Ribas Werlang

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DEDICATÓRIA

À minha família, Moacir, Izolda, Vó Gui, Pety, Moa,
Adriana, Paola e Diego, pelo apoio, incentivo,
paciência e, sobretudo pelo amor incondicional
dedicado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e mestres Marcelo Goldani e Patricia Pranke pelo apoio, orientação, paciência, disponibilidade e suporte, além dos conhecimentos e experiências transmitidas no decorrer do mestrado.

À minha amiga e chefe Andréa Cauduro de Castro, por todo seu incentivo, apoio, colaboração e amizade.

Aos amigos e colegas do **Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição**, principalmente à Hilda, Karina, Consuelo, Marli, Louise, Bianca e Analu por toda ajuda e apoio dispensados durante a execução do meu trabalho.

Aos colegas do **Setor de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição** pela colaboração.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul** e ao **Programa de Pós-Graduação em Saúde da criança e do Adolescente da faculdade de Medicina** desta Universidade pela excelência científica no ensino.

Ao **Instituto de Pesquisa de Células Tronco**, principalmente à Patrícia, Gean, Lisi, Dani, Daikely e Cris pela colaboração e contribuição no trabalho.

Aos bolsistas do **Instituto de Pesquisa de Células Tronco**, Cris, Laura, Tobias, pelas coletas de sangue de cordão realizadas junto aos Centros Obstétricos dos hospitais HNSC e HCPA.

Ao **Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde** pela permissão do uso do equipamento FACSCalibur e a utilização do software CELLQUEST fundamentais para a realização das análises por citometria de fluxo.

À **Gerência de Pesquisa e Ensino do Grupo Hospitalar Conceição** pela verba concedida para realização do trabalho através do Fundo de Fomento à pesquisa.

RESUMO

O melhor conhecimento das populações de células-tronco presentes no sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) é de fundamental importância para que seja possível ampliar o seu uso, visto que a mesma é descartada. Vários fatores maternos e *intrapartum* influenciam a seleção da placenta para coleta de SCUP. A maioria das amostras de SCUP coletadas e, posteriormente, armazenadas em bancos de SCUP é de recém-nascidos a termo, preferencialmente saudáveis e de partos sem complicações. Entretanto, mesmo em crianças nascidas a termo, os fatores perinatais e maternos podem prever o conteúdo de progenitores hematopoéticos do SCUP. Muitos bancos públicos de SCUP armazenam sangue de cordão de recém-nascido (RN) a partir de 37 semanas. Sabe-se que no SCUP de um RN com menor idade gestacional, a quantidade de células-tronco por mililitro de sangue é maior do que no SCUP do RN a termo. Porém, quanto menor a idade gestacional, menor o volume coletado, levando ao descarte de amostras de RN pré-termos. Então, o melhor conhecimento do perfil imunofenotípico do SCUP de RN em diferentes idades gestacionais pode ser útil uma vez que a quantidade de células-tronco em amostras de SCUP com, por exemplo, 34 semanas pode conter mais células-tronco por microlitro de sangue do que amostras com 40 semanas, o que poderia justificar o armazenamento dessa amostra mesmo se for coletado um volume menor de 60-70 mL de SCUP. Outro parâmetro importante é o conhecimento de diferentes populações celulares no SCUP, tais como as células-tronco mesenquimais, as quais são amplamente conhecidas por sua maior plasticidade, com isso, melhor que as hematopoéticas na regeneração de algumas doenças.

Objetivos: Avaliar o perfil imunofenotípico do SCUP de RN pré-termos e comparar com o SCUP de neonatos nascidos a termo. Avaliar as correlações no SCUP, analisando parâmetros fisiológicos, imunofenotípicos e hematológicos.

Métodos: Foram analisadas, por citometria de fluxo, 53 amostras de SCUP de RN pré-termos e RN a termo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences) e as análises quantitativas e qualitativas foram realizadas através do *software* CELLQuest versão 3.1 (BD Biosciences). Para a análise do CD34⁺ absoluto e percentual utilizou-se

a estratégia de *gates* Trucount-ISHAGE preconizado por Brocklebank & Sparrow. Controles isotípicos foram utilizados para evitar marcação inespecífica.

Resultados e Conclusões: Não houve influência de nenhuma característica materna, neonatal e perinatal no conteúdo de células CD34+ e nem diferença entre RN pré-termos e a termo. Entretanto, pode-se observar a influência do peso no nascimento, idade gestacional, volume de SCUP coletado e comprimento do cordão na quantidade de CNT (células nucleadas totais). O estudo não encontrou associações significativas que justificassem o armazenamento de unidades oriundas de RN pré-termos, sendo necessários mais estudos nessa área.

ABSTRACT

Greater knowledge about stem cell populations present in umbilical cord blood (UCB) is fundamental to better understand the different cell populations present in the stem cell source and to widen their use, considering that they are naturally discarded. Various maternal and intrapartum factors influence the selection of placenta for the collection of UCB. Despite the fact that it is known that the number of hematopoietic stem cells is naturally heterogeneous, it is also known that the quantity of heterogeneity of these cells also varies due to perinatal factors such as gestation age and the type of birth. The majority of collected UCB samples which are later stored in UCB banks are from full-term newborns, preferably healthy and from uncomplicated births. However, even in full-term born children, the perinatal and maternal factors can predetermine the content of UCB hematopoietic progenitors. Many public UCB banks store NB cord blood after 37 weeks. It is known that in the UCB of a NB with a lower gestation age, the quantity of stem cells per millilitre of blood is greater than that of full-term NB UCB. However, the lower the gestation age, the less volume is collected, leading to the discarding of samples with less gestational age. Therefore, greater knowledge of the immunophenotypic profile of NB UCB in different gestational ages could be useful, providing that the number of stem cells in UCB samples with, for example, 34 weeks, can contain more stem cells per microlitre of blood than in samples with 40 weeks. This could justify the storing of these samples even if they were collected in a UCB volume of less than 60-70 mL. Another important parameter is the knowledge of the different UCB cell populations, such as mesenchymal stem cells, which are widely known for their greater plasticity and, for this reason, more suitable than hematopoietic stem cells in promoting tissue regeneration in some diseases.

Objectives: Evaluate the immunophenotypic profile of UCB in preterm and term newborn babies. Evaluate the UCB correlations, analyzing physiological, immunophenotypic and hematological parameters.

Methods: 53 samples of preterm and term RN UCB were analyzed using flow cytometry. Data was acquired using FACSCalibur (BD Biosciences) and the quantitative and qualitative analyses were carried out using the software CELLQuest versão 3.1 (BD Biosciences). For CD34⁺ absolute and percentual analysis, gates Trucount-ISHAGE strategy was used, according to Brocklebank & Sparrow. Isotypical controls were used to avoid unspecific marking

Results and Conclusions: No influence of maternal, neonatal and perinatal characteristic occurred in the content of the CD34+ cells, and there was no difference between preterm and full-term NB. However, TNC quantity was influenced by birth weight, gestational age, UCB volume collected and umbilical cord length. This study did not find significant associations which can justify the storage of blood units from preterm NB, concluding that more investigations are necessary in this scientific field.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Análise Quantitativa de Células CD34+ - ISHAGE	95
FIGURA 2 – Análise Imunofenotípica das Células 7AAD⁻CD45⁺CD34⁺	96
FIGURA 3 – Análise Imunofenotípica das Células 7AAD⁻CD45⁻CD44⁺	98
FIGURA 4 – Análise Imunofenotípica das Células 7AAD⁻CD45⁻CD29⁺	99
FIGURA 5 – Ajustes e Controles	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Combinação de Anticorpos Utilizados Para Análise Imunofenotípica	36
TABELA 2 – Perfil Imunofenotípico das Células obtidas no SCUP (Subpopulações de CT no SCUP)	40
TABELA 3 – Análise Descritiva das Variáveis Maternas e Neonatais da Amostra Obtida	41
TABELA 4 – Características Perinatais e Neonatais Encontradas	42
TABELA 5 – Frequência de Tendência Central das Variáveis Placentárias Perinatais	43
TABELA 6 – Correlação entre Variáveis Independentes e o Desfecho	44
TABELA 7 – Desfecho Não Ajustado – Mann Whitney U	47
TABELA 8 – Estudos Publicados nos Últimos 10 anos	50

LISTA DE ABREVIATURAS

7AAD	7-Amino Actinomicina D
AIG	Adequados para idade gestacional
APC	<i>Allophycocyanin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i> (unidade formadora de colônia)
CNT	Células nucleadas totais
CPDA	<i>Citrate Phosphate Dextrose Adenine</i> (citrato, fosfato, dextrose e adenina)
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DUM	Data da última menstruação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GVHD	<i>Graft versus host disease</i> (Doença do Enxerto Contra Hospedeiro)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígenos Leucocitários Humanos)
ISHAGE	<i>International Society for Hematotherapy and Graft Engineering</i>
PE	Ficoeritrina
RN	Recém nascido
SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

SDF-1 *Stromal-derived factor-1*(fator derivado de estroma-1)

SCF *Stem cell factor* (fator de crescimento de células-tronco)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Células-tronco	16
1.1.1 Células-tronco Hematopoéticas	18
1.1.2 Células-tronco Mesenquimais	21
1.2 Sangue de Cordão Umbilical e Placentário e Transplante	23
1.3 Fatores Maternos e Neonatais Associados à Viabilidade do SCUP	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
4. METODOLOGIA	31
4.1 Delineamento	31
4.2 População em Estudo	31
4.2.1 Critérios de Exclusão	31
4.3 Tamanho Amostral	31
4.4 Variáveis Dependentes	32
4.5 Variáveis Independentes	32
4.6 Logística	32
4.6.1 Coleta de SCUP	32
4.6.2 Parâmetros Hematológicos	33
4.6.3 Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo	33
4.6.3.1 Contagem Absoluta de Células CD34 ⁺	34
4.6.3.2 Avaliação Imunofenotípica Qualitativa	35
4.7 Aspectos Éticos	37
4.8 Análise Estatística	38
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	55
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
9. ARTIGO	64
ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

A terapia celular busca restaurar o funcionamento de tecidos ou órgãos através da proteção da integridade celular ou reposição de células danificadas por células saudáveis. Nesse sentido, as células-tronco se tornaram ferramentas promissoras para o estudo da medicina regenerativa, pois podem ser transplantadas diretamente no sítio da lesão ou recrutadas a ele mediante estimulação da síntese de moléculas quimiotáticas (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; TÁRNOK *et al.*, 2010). A caracterização mais detalhada de novos tipos de células-tronco em tecidos já formados e a exploração de fontes alternativas dessas células, como o sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), trazem muitos avanços na área (OKAMOTO e CAMPOS, 2004).

Nos últimos vinte anos, estudos vêm mostrando, cada vez mais, a possibilidade de utilização das células-tronco no reparo de lesões de vários órgãos e no tratamento de várias doenças, como nas cardiopatias, diabetes, doença de Parkinson, lesão de medula espinhal entre outras. Assim, é importante conhecer melhor a biologia das células-tronco do SCUP, uma fonte em potencial para uso dessas células no futuro, para outras doenças, além das hematológicas, já utilizadas há mais de 20 anos (GLUCKMAN *et al.*, 1989).

1.1 Células-tronco

As células-tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas e que apresentam uma grande capacidade de divisão e proliferação celular. São capazes de se diferenciar em células maduras e funcionais dos tecidos. As CT têm a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que originam células precursoras com capacidade de diferenciação,

produzem células indiferenciadas que repõem a população de células-tronco (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; ZAGO, 2006; VEN *et al.*, 2007).

As CT são classificadas quanto a sua origem em embrionárias ou adultas (somáticas). As células-tronco embrionárias (CTE) são células totipotentes (até o terceiro dia de desenvolvimento embrionário) ou pluripotentes (na fase de blastocisto), ou seja, capazes de originar todos os tecidos de um indivíduo adulto (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; ZAGO, 2006; VEN *et al.*, 2007) e, no caso das totipotentes, incluindo os anexos embrionários (a placenta e o cordão umbilical). As CTE são extraídas da massa celular interna do blastocisto e são capazes de dar origem aos 3 folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma. As células-tronco adultas (somáticas) são as obtidas de tecidos após a fase embrionária (feto, recém-nascido, adulto). A maioria das CT adultas é tecido-específica (capacidade de diferenciação mais limitada a um único tipo de tecido ou a alguns poucos tecidos relacionados) (HALL *et al.*, 1999; FORBES *et al.*, 2002; ZAGO, 2006; WALKER *et al.*, 2009) e têm sido isoladas a partir de células de vários tecidos, sendo mais relatadas na literatura as provenientes da medula óssea, cordão umbilical e do tecido adiposo (VEN *et al.*, 2007). No entanto, algumas células-tronco adultas, como as células-tronco mesenquimais (CTM) são conhecidas por sua maior plasticidade (a capacidade de uma célula dar origem a diversos outros tipos celulares diferenciados), sendo inclusive consideradas, por alguns autores, como células pluripotentes, por serem as células que mais se assemelham, quanto à plasticidade, com as CTE. Apesar de ainda haver controvérsia se as CTM são chamadas de pluri ou multipotentes, não há dúvidas sobre a sua plasticidade superior às outras CT adultas (JIANG *et al.*, 2002; DOMINICI *et al.*, 2006).

O microambiente específico em que as células-tronco adultas residem, o qual controla a sua auto-renovação e produção de progenitores, é definido como nicho (SPRADLING *et al.*, 2001; MORRISON e SPRADLING, 2008; WALKER *et al.* 2009).

1.1.1 Célula-tronco Hematopoética

As células-tronco hematopoéticas (CTH) são CT adultas progenitoras das células sanguíneas. Foram as primeiras células-tronco adultas descritas e, conseqüentemente, o tipo de CT mais bem estudado e compreendido, além de ser a CT mais amplamente aplicada em protocolos clínicos. Esse fato é compreensível, se considerarmos a facilidade de acesso ao tecido hematopoético (sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical) o que propiciou seu estudo muito precocemente (NARDI *et al.*, 1999).

As CTH possuem 2 propriedades funcionais que definem as CT órgão-específicas: 1) a capacidade de auto-renovação, que permite que o compartimento de CT seja mantido ao longo do tempo; e 2) a multipotência, ou seja, a capacidade de originar células maduras diferenciadas em uma ou mais linhagens (MORRISON *et al.*, 1997; NARDI *et al.*, 1999; OKAMOTO e CAMPOS, 2004; WATT *et al.*, 2005; MAJETI *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2009). Embora o conhecimento da biologia das CT seja ainda parcial, já que elas são identificadas mais por aspectos funcionais do que morfológicos, algumas características são de consenso geral como, por exemplo, sua heterogeneidade com relação a tamanho, densidade e perfil antigênico (NARDI *et al.*, 1999; PRANKE *et al.*, 2001; WATT *et al.*, 2005).

Um fenótipo específico para as CTH tem sido definido com dificuldade. Uma combinação de marcadores de superfície tem sido usada para identificar a CTH humana ou, pelo menos, uma

subpopulação precursora hematopoética primitiva. O fenótipo, entretanto, muda dependendo do *status* de ativação das populações celulares precursoras, assim como da fonte dessas células, e não fornece informações sobre sua capacidade funcional *in vivo* (WATT *et al.*, 2005; TÁRNOK *et al.*, 2010). A presença do antígeno CD34 é o principal marcador dessa população. Aproximadamente de 1 a 3% das células mononucleares da medula óssea expressam essa proteína (SUTHERLAND *et al.*, 1993), cuja função parece estar relacionada aos processos de localização/adesão das células-tronco e progenitoras, bem como à manutenção do fenótipo precursor (KRAUSE *et al.*, 1996).

Além da presença do CD34, outros marcadores de superfície têm sido utilizados para a caracterização da CTH. Tem sido demonstrado que o fenótipo CD34⁺CD38⁻ caracteriza a célula candidata a ser a “verdadeira célula-tronco hematopoética”. (DE BRUYN *et al.*, 1995; TIMEUS *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 1999; PRANKE *et al.*, 2005). Essa subpopulação tem sido demonstrada em maior proporção em recém-nascidos (RN) com menor idade gestacional (NAKAJIMA *et al.*, 2009) e há um declínio em sua proporção a medida que a idade gestacional avança (WYRSCH *et al.*, 1999; GASPARONI *et al.*, 2000; DIMITRIOU *et al.*, 2006).

A molécula CD117 (c-kit) por sua vez, é o receptor do fator de crescimento de células-tronco (SCF – *Stem cell factor*) e está envolvida nas interações das células CD34⁺ com as células do estroma e outras células na medula óssea. Outros marcadores celulares são importantes no reparo da lesão de um órgão, bem como na migração das células-tronco para o local da lesão. O marcador CD133 pode estar associado a uma CTH diferente (talvez mais precoce) da célula mais convencionalmente estudada (WOGNUM *et al.*, 2003). As células CD34⁺CD133⁺ indicam células-tronco primitivas importantes no reparo de lesões, pois a molécula CD133 é expressa em células progenitoras endoteliais e contribuem para a vasculogênese (HE *et al.*, 2005; LEOR *et al.*, 2006; MASSA *et al.*, 2005; TONDREAU *et al.*, 2005; NAKAJIMA *et al.*, 2009).

A expressão de vários marcadores de superfície e moléculas de adesão em CTH de SCUP depende da idade gestacional e o potencial de *homing* (capacidade de migração para a medula óssea) das CTH é maior em RN a termo, o que sugere que este potencial aumenta durante a gestação, tornando o SCUP de RN a termo uma fonte potencialmente melhor de CTH do que RN pré-termos (NAKAJIMA *et al.*, 2009). O papel central da molécula CXCR4 (CD184) e do receptor para *Stromal-derived factor-1* (SDF-1) na migração e no *homing* das CTH para seu nicho foi demonstrado por Burguer e colaboradores através da maior capacidade de migração *in vitro* de células CD34⁺ derivadas de SCUP (BURGUER *et al.*, 2003). Quando ocorre um dano tecidual, células CD34⁺CXCR4⁺ migram para o local da lesão, atraídas pela secreção de SDF-1, o ligante do receptor CXCR4. Nichos de SDF-1 são encontrados em órgãos quando sofrem uma lesão e são liberados durante o dano tecidual. Assim, as células com CXCR4⁺ são importantes na regeneração de lesão de órgãos, indicando a capacidade regenerativa das células-tronco (DENNING-KENDALL *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004). O marcador CXCR4 é um novo marcador de atração das células-tronco para os sítios de lesão tecidual, sinalizados pelo SDF, e ainda muito pouco estudado nas células do SCUP.

As CTH (CD34⁺CD38⁻) são raras, correspondendo a 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e do SCUP, e bem menos no sangue periférico, e apresentam baixa taxa de proliferação. Entre as três fontes disponíveis, medula óssea, sangue periférico e SCUP, a frequência das células CD34⁺CD38⁻ é maior no SCUP (DE BRUYN *et al.*, 1995; TIMEUS *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 1999).

1.1.2 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) correspondem a uma população de células progenitoras multipotentes capazes de atuar na hematopoese e de se diferenciar em tecidos mesenquimais, como células das linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. (BARRY *et al.*, 2004; BIEBACK *et al.*, 2004; RAAIJMAKERS e SCADDEN, 2008).

As CTM têm mostrado ser um tipo de célula-tronco adulta com maior plasticidade que as células-tronco hematopoéticas, sendo, portanto, mais eficientes na capacidade de diferenciação celular (REYES & VERFAILLIE, 2001; JIANG *et al.*, 2002). Essas células são encontradas em uma variedade de tecidos como a medula óssea, cérebro, baço, fígado, rins, pulmões, músculo, timo, pâncreas entre outros órgãos (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006).

As CTM são importantes para formar o microambiente medular (estroma) e promover o suporte à hematopoese, fundamentais para o sucesso do transplante de células-tronco. As CTM enxertam, também, em vários tecidos não-hematopoéticos quando injetadas sistemicamente (RAAIJMAKERS e SCADDEN, 2008).

A presença de CTM no SCUP é controversa segundo alguns autores (ROMANOV *et al.*, 2003; SECCO *et al.*, 2008). Secco e colaboradores demonstraram que o SCUP não é rico em CTM, mas que a parede (vasos) do cordão é rico nessas células. Esse estudo comparou a eficiência na obtenção de CTM de amostras de SCUP e de cordão umbilical pareadas e coletadas dos mesmos doadores. Somente foram isoladas CTM de uma unidade de SCUP frente à grande quantidade de CTM multipotentes isoladas de todas as 10 amostras de cordão. Portanto, o cordão seria uma fonte melhor para o isolamento de CTM do que o SCUP (SECCO *et al.*, 2008).

Dominici e colaboradores propuseram critérios mínimos para definir as CTM humanas que incluem aderência à superfície de cultivo, expressão de antígenos de superfície específicos e seu potencial de diferenciação (DOMINICI *et al.*, 2006).

Em relação ao seu fenótipo, as CTM também expressam o marcador CXCR4+ em sua superfície celular, assim como a molécula c-kit. Além da expressão de c-kit, as CTM são identificadas pela presença de CD29, CD44, CD90, Stro-1 e ausência dos marcadores CD45, CD34 e CD38 (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; LU *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005; NARDI *et al.*, 2006; VEN *et al.*, 2007).

Sachetti e colaboradores identificaram células subendoteliais que expressam a molécula de adesão M-CAM (CD146), outro marcador de CTM. Tais células parecem ser importantes para a capacidade de autorenovação das CTH através da expressão de altos níveis da quimiocina CXCL-12/SDF-1 (SACHETTI *et al.*, 2007). Além disso, esse marcador é capaz de transferir o microambiente hematopoético aos sítios heterotrópicos após o transplante (RAAIJMAKERS e SCADDEN, 2008).

1.2 Sangue de Cordão Umbilical e Placentário e Transplante

A utilização do SCUP tem aumentado significativamente nos últimos anos, mostrando a sua importância como fonte de pesquisa clínica e científica (OMORI *et al.*, 2008). Isso se deve ao fato do SCUP ser rico em progenitores hematopoéticos promovendo o seu uso para o tratamento de doenças hematológicas malignas ou não malignas há mais de 20 anos (GLUCKMAN *et al.*, 1989, WYRSCH *et al.*, 1999; GASPARONI *et al.*, 2000; MALANGONE *et al.*, 2001; PRANKE *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2001) e ser uma fonte alternativa de transplante em pacientes que não apresentam doadores HLA totalmente compatíveis, uma vez que estas células parecem induzir com menor frequência a doença do enxerto contra hospedeiro alogênico (GVHD, *graft versus host disease*) (BALLEN, 2001; PRANKE *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2005; MCGUCKIN *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2008).

Desde o trabalho pioneiro de Gluckman e colaboradores em 1989 (GLUCKMAN *et al.*, 1989), o SCUP tem sido clinicamente investigado como uma fonte alternativa de transplante alogênico em pacientes que não apresentam doadores HLA totalmente compatíveis (McNIECE e BRIDDELL, 2001), uma vez que estas células parecem induzir com menor frequência a GVHD (BALLEN, 2001; PRANKE *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2005; MCGUCKIN *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2008). O sucesso do uso destas células em transplantes culminou com a necessidade de armazenamento do sangue de cordão umbilical. Desta forma, o primeiro banco de cordão umbilical humano foi estabelecido em 1993 pelo Dr. Pablo Rubinstein no *New York Blood Center* (RUBINSTEIN *et al.*, 1995) encorajando o estabelecimento de outros bancos de cordão umbilical humano em diversas partes do mundo. Atualmente, no mundo, existem mais de 400.000 unidades de SCUP armazenadas em bancos públicos (BALLEN *et al.*, 2008; BALLEN *et al.*, 2010).

Muitas são as vantagens do uso de SCUP como fonte de células-tronco hematopoéticas em relação à medula óssea ou sangue periférico: 1) a ilimitada oferta de sangue de cordão umbilical, uma vez que o mesmo é descartado após o parto; 2) a disponibilidade imediata do mesmo, uma vez que as células se encontram prontas para o uso, armazenadas nos bancos públicos de sangue de cordão umbilical humano, 3) o menor risco de contaminação por doenças infecto-contagiosas, visto que a unidade de SCUP só é liberada para o uso depois de todos os testes sorológicos serem repetidos, no sangue da mãe, após o período das janelas imunológicas, 4) a menor incidência de GVHD (WYRSCH *et al.*, 1999; McNIECE *et al.*, 2000; McNIECE e BRIDDELL, 2001) e 5) a maior chance de achar um doador, uma vez que há menor restrição HLA, já que há tolerância de até dois *mismatches* (BARKER e WAGNER, 2003; LAUGHLIN *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2005). Além disso, vários estudos comparando a frequência da célula candidata a ser a “verdadeira célula-tronco hematopoética” entre as três fontes conhecidas (medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical) mostraram que a frequência das células CD34⁺CD38⁻ é maior no sangue de cordão umbilical (DE BRUYN *et al.*, 1995; TIMEUS *et al.*, 1998; CHO *et al.*, 1999). Esse fato explica o sucesso no uso de SCUP em transplantes (BELVEDERE *et al.*, 2000), visto que estas células são responsáveis pela sobrevivência do enxerto a longo prazo (ISHIKAWA *et al.*, 2003).

Sendo assim, dois critérios são fundamentais para o sucesso de um transplante utilizando-se o SCUP: a compatibilidade HLA e o número de células coletadas. O número limitado de CTH e de células progenitoras que podem ser coletados de uma única placenta representa o obstáculo mais importante para o sucesso do transplante de SCUP (WAGNER *et al.*, 2002), cuja presença é de fundamental importância para a recuperação das linhagens hematopoéticas nos transplantes (BARKER *et al.*, 2003). Nos critérios necessários para a coleta e seleção de doadores de SCUP deve-se considerar também a quantidade de células nucleadas totais (CNT) (MIGLIACCIO *et al.*,

2000; AROVIITA *et al.*, 2004). Estudos recentes têm mostrado que em torno de 2×10^5 células CD34 e uma quantidade igual ou maior a 2×10^7 CNT por quilograma de peso corporal do receptor são suficientes para que ocorra “pega” do transplante (GLUCKMAN *et al.*, 2005).

Quanto maior for o volume de sangue coletado, maior será o número de células. Jones e colaboradores (JONES *et al.*, 2003) demonstraram associação significativa do volume de SCUP coletado e fatores maternos, obstétricos e neonatais como a idade gestacional, peso ao nascimento, tipo de parto e outros. Dados da literatura têm mostrado que há uma correlação linear entre o número de CNT e o número de células CD34⁺, o qual é considerado o marcador de células-tronco hematopoéticas. Portanto, pode-se considerar que quanto maior o volume de SCUP coletado, maior deverá ser o número de CTH neste material (SURBEK *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000; PRANKE, *et al.*, 2006; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010) e, portanto, maior a chance de haver a “pega” do enxerto.

1.3 Fatores Maternos e Neonatais Associados à Viabilidade do SCUP

Vários fatores maternos e *intrapartum* influenciam a seleção da placenta para coleta de SCUP. Apesar de ser conhecido o fato de que o número de CTH é heterogêneo por natureza, sabe-se que a heterogeneidade na quantidade dessas células varia também por fatores perinatais como a idade gestacional e o tipo de parto, entre outros (YAP *et al.*, 2000; PRANKE *et al.*, 2005; CERVERA *et al.*, 2006; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010). Demonstrou-se que a quantidade de células CD34⁺ por microlitro de SCUP, bem como células CD34⁺CD38⁻, é inversamente proporcional à idade gestacional (SURBEK *et al.*, 2000; GASPARONI *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000; CERVERA *et al.*, 2006). A utilidade clínica desses estudos é limitada, pois, a maioria das amostras de SCUP coletadas e, posteriormente, armazenadas em bancos de SCUP é de recém-nascidos (RN) a termo, saudáveis e de partos sem complicações. Entretanto, mesmo em crianças

nascidas a termo, os fatores perinatais e maternos podem predizer o conteúdo de progenitores hematopoéticos do SCUP (SURBEK *et al.*, 2000; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010).

Existem na literatura, estudos que comprovam a existência de uma diferença em relação à quantidade de CT existente no SCUP (WYRSCH *et al.*, 1999; GASPARONI *et al.*, 2000). Estudos prévios, que revelaram a presença de células hematopoéticas na circulação fetal, demonstraram que o conteúdo de progenitores CD34+ no SCUP é maior durante a vida fetal do que ao nascimento, e que o SCUP de RN pré-termos é rico em precursores formadores de colônia (SURBEK *et al.*, 1998). O pico da concentração de progenitores hematopoéticos é observado durante a transição da hematopoese hepática para a medula óssea e o declínio ocorre com o fim desse processo ao nascimento (WYRSCH *et al.*, 1999), o que explica a presença de CTH mais primitivas no SCUP de pré-termos e mais diferenciadas em a termos (SURBEK *et al.*, 1998; WYRSCH *et al.*, 1999; CERVERA *et al.*, 2006).

Vários estudos demonstraram a associação negativa do efeito da idade gestacional (SURBEK *et al.*, 2000; GASPARONI *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000; PRANKE *et al.*, 2005) e a correlação positiva do peso ao nascer (JONES *et al.*, 2003; NAKAGAWA *et al.*, 2004; McGUICKIN *et al.*, 2007) com o volume e a quantidade de CNT e de CTH no SCUP. Dessa forma, preditores maternos e neonatais poderiam ser usados para viabilizar e processar unidades ótimas de SCUP. Entretanto, para o armazenamento e, conseqüentemente, uso em transplantes, esses estudos sugerem que ótimos resultados são obtidos, pela seleção de recém nascidos a termo e adequados para idade gestacional (AIG) (BALLEN, 2001; JONES *et al.*, 2003; McGUICKIN *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2008).

Fatores perinatais relacionados ao *stress* fetal agudo como baixo pH da artéria umbilical (Apgar < 7), pré-eclampsia, líquido amniótico mecônio demonstraram uma associação positiva com

a quantidade de CNT e CD34⁺ no SCUP (SOLVES *et al.*, 2007; CERVERA *et al.*, 2006; MANEGOLD *et al.*, 2008; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010).

A pré-eclampsia foi positivamente associada com os níveis placentários aumentados de CD34⁺ e CD44⁺, os quais podem ser explicados pelo aumento de CT para o reparo da disfunção ou dano vascular endotelial generalizado, demonstrando indiretamente o papel desses marcadores em sua fisiopatologia (BENIAN *et al.*, 2008).

Manegold e colaboradores demonstraram que, na população estudada por este grupo, a correlação negativa de variáveis hematopoéticas (CNT, células CD34⁺ e CFUs) com o pH da veia umbilical indica que o *stress* fetal tem impacto no conteúdo de CTH do SCUP. Esse estudo demonstrou que o *stress* fetal causa maior mobilização de células CD34⁺ e aumenta a contagem de CNT (MANEGOLD *et al.*, 2008).

Recentemente, Juutistanaho e colaboradores estudaram características perinatais que refletem *stress* durante a gestação e o parto (pH da artéria umbilical, peso ao nascimento, peso da placenta e a razão entre o peso da placenta e o peso ao nascimento) como preditores do conteúdo de progenitores hematopoéticos do SCUP de 167 RN a termo saudáveis. Nesse estudo, as CTH do SCUP se correlacionaram com todas as variáveis avaliadas. Entretanto o peso ao nascimento somente apresentou correlação significativa no parto cesariano, enquanto a correlação do peso da placenta e quantidade de CTH independe do tipo de parto. Quando a associação do pH da artéria umbilical (indicador do status ácido-base do RN) foi analisada em subgrupos de acordo com o tipo de parto (vaginal e cesariano), o efeito do pH mostrou-se pronunciado nos partos vaginais, o que pode refletir *stress* de curta duração com mobilização de células progenitoras, possivelmente, através de um aumento da produção de citocinas. (JUUTISTANAHO *et al.*, 2010). Conseqüentemente, esse indicador neonatal seria um bom candidato a ser utilizado para seleção de coleta e armazenamento de SCUP (CERVERA *et al.*, 2006; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010). O

estudo também mostrou que a correlação do peso da placenta com a quantidade de CTH foi maior do que a correlação do peso ao nascimento com CTH. Provavelmente, isso se deva à função da placenta como nicho para as CTH, o que pode resultar em aumento da concentração local dessas células (JUUTISTANAHO *et al.*, 2010).

Outro estudo recente demonstrou forte associação entre a camada de células mononucleares de baixa densidade/CD34+ e fatores obstétricos, como peso da placenta, idade materna, número de partos, peso do cordão, peso ao nascimento, idade gestacional e comprimento de cordão. O total de células da camada mononuclear de baixa densidade por unidade de cordão analisada nesse estudo poderia ser uma variável substituta de CNT descrita em outros estudos (OMORI *et al.*, 2010).

Em relação ao tipo de parto, partos cesarianos estão associados a uma idade gestacional significativamente menor e um conteúdo relativamente maior de células CD34+ (NAKAGAWA *et al.*, 2004; JAN *et al.*, 2008; OMORI *et al.*, 2010). Em contrapartida, alguns estudos sugerem que SCUP provenientes de partos vaginais tem maior número de CNT (BONAB *et al.*, 2004), enquanto outros estudos demonstraram resultados contrários a esses achados (DIMITRIOU *et al.*, 2006). Omori e colaboradores demonstraram uma correlação positiva entre o peso ao nascimento e o total de células da camada mononuclear de baixa densidade em neonatos nascidos de partos vaginais confirmando, os achados de Ballen *et al* de que quanto maior o RN melhor (BALLEN *et al.*, 2000; OMORI *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que mulheres com poucas gestações produzem unidades de SCUP com níveis mais elevados de CNT e com o aumento da idade materna há uma redução da quantidade de CTH (BALLEN *et al.*, 2000; McGUCKIN *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2010). Entretanto, esses achados não foram consistentes com de outros estudos (NAKAGAWA *et al.*, 2004).

Alguns estudos demonstraram a relação do gênero do RN com a quantidade de CNT e de células CD34+ (NAKAGAWA *et al.*, 2004; AROVIITA *et al.*, 2005; MANCINELLI *et al.*, 2006;

JAN *et al.*, 2008). Nakagawa e colaboradores compararam a concentração de células em RN do sexo feminino e masculino e encontraram uma concentração de CNT maior no SCUP de meninas (NAKAGAWA *et al.*, 2004), enquanto em um outro estudo o gênero foi o único parâmetro investigado que não apresentou nenhum impacto para a concentração de CNT, embora tenha demonstrado uma leve tendência de concentrações de CTH mais altas em meninas do que em meninos (McGUCKIN *et al.*, 2007). Por sua vez, Mancinelli demonstrou que, além da influência do sexo feminino e do peso ao nascimento na contagem total de células CD34+, o aumento da idade gestacional (demora no parto) também pode influenciar, pois existe um “envelhecimento da placenta” e o feto encontra uma situação de hipóxia progressiva resultando em mecanismos de defesa que tendem a aumentar o número de CTH e também o volume sanguíneo circulante (MANCINELLI *et al.*, 2006)

Em contrapartida, Aroviita e colaboradores observaram maior concentração de progenitores hematopoéticos no SCUP de RN do gênero masculino medidos como células CD34+. A explicação para isso seria que a concentração de CFU- *mixed colony* é maior em meninos do que em meninas (AROVIIITA *et al.*, 2005; JAN *et al.*, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

O melhor conhecimento das populações de células-tronco presentes no SCUP é de fundamental importância para que se possa ampliar a sua obtenção, armazenamento e utilização.

No entanto, os fatores que se correlacionam com o perfil imunofenotípico do SCUP de RN em diferentes idades gestacionais ainda são controversos e seu conhecimento pode ser útil uma vez que a quantidade de células-tronco em amostras de SCUP com, por exemplo, 34 semanas pode conter mais células-tronco do que amostras com 40 semanas. Esse fato poderia justificar o armazenamento dessa amostra mesmo se for coletado um volume menor de 60-70 mL de SCUP.

3. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar os parâmetros fisiológicos, imunofenotípicos e hematológicos do SCUP de RN, correlacionando com fatores maternos, perinatais e neonatais.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento

Trata-se de um estudo observacional transversal.

4.2 População em Estudo

Recém-nascidos (RN) com idade igual ou superior a 24 semanas de gestação.

4.2.1 Critérios de Exclusão

Mães portadoras de HIV 1 e 2, HTLV 1 e 2, vírus de hepatite dos tipos B e C, ou qualquer outro patógeno.

4.3 Tamanho Amostral

Com base em um estudo anterior (CANABARRO *et al.*, 2007), calculou-se o tamanho de amostra, utilizando o programa estatístico do Laboratório de Epidemiologia e Estatística da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

(<http://www.lee.dante.br/pesquisa/amostragem/amostra.html>), de 40 RN para cada grupo de acordo com a faixa de idade gestacional, totalizando 120 RN ($\alpha = 0,05$, poder de 80%, teste bicaudal).

4.4 Variáveis Dependentes

As contagens absoluta (células/ μL) e relativa (%) de células-tronco e CNT correspondem às variáveis dependentes.

4.5 Variáveis Independentes

As variáveis independentes são: idade materna (em anos completos), fumo materno (zero – não fumantes e após número de cigarros/dia), consumo de álcool durante a gestação (sim e não), uso de medicação durante a gestação (sim e não), tipo de parto (cesariano e vaginal), escolaridade materna (em anos escolares completos), peso de nascimento do RN (em gramas), Apgar, comprimento (em cm), gênero do RN, idade gestacional (em semanas, conforme data da última menstruação - DUM - e ou ecografia precoce), volume de sangue coletado (cm^3), peso da placenta (gramas).

4.6 Logística

4.6.1 Coleta de SCUP

Foram realizadas 53 coletas de SCUP, entre julho de 2009 e março de 2011, junto aos Centros Obstétricos do Hospital Nossa Senhora da Conceição e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1) e preenchimento de protocolo de coleta (anexo 2). Utilizando uma amostragem de conveniência, foram coletados, de forma seqüencial, SCUP de 28 de recém-nascidos (RN) pré-termos, (24 a 36 semanas), e 25

amostras de SCUP de RN nascidos a termo (acima de 37 semanas). As coletas foram realizadas por pessoal capacitado e treinado para isso.

As amostras foram obtidas por punção da veia umbilical, após a retirada da placenta do útero, de neonatos nascidos a termo e pré-termos e coletadas em bolsas de sangue contendo CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) como anticoagulante. Uma alíquota de SCUP foi coletada em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização do hemograma, para a quantificação de CNT. Para análise por citometria de fluxo foram utilizadas amostras frescas e de sangue total. As amostras foram transportadas acondicionadas em recipientes adequados em um período inferior a 2 horas. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição em um período inferior a 24 horas pós-coleta.

4.6.2 Parâmetros Hematológicos

Os hemogramas de SCUP foram realizados pelo equipamento SYSMEX XE (Roche), no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

4.6.3 Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada no Setor de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição.

A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com 2 lasers (laser de argônio para 488 nm e laser de diodo para 635nm) e as análises quantitativas e qualitativas feitas através do *software* CELLQuest versão3.1 (BD Biosciences).

4.6.3.1 Contagem absoluta de células CD34⁺

Para a análise do CD34⁺ absoluto utilizou-se a estratégia de *gates* (janelas) Trucount-ISHAGE preconizado por Brocklebank & Sparrow (Figura 1, anexo 4). Essa técnica utiliza uma estratégia de *gates* sequenciais e a utilização de marcadores de viabilidade celular permitindo a seleção das populações de interesse e a contagem absoluta em plataforma única (BROCKLEBANK e SPARROW, 2001).

. Foram incubados 100µL de SCUP com 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD45 conjugado com FITC (clone HI30, BD Biosciences, San Jose, CA) e 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD34 conjugado com PE (clone 581, BD Biosciences, San Jose, CA) em tubos Trucount (BD Biosciences) por 20 minutos à temperatura ambiente (23°C) e no escuro. Após incubação, 2 mL de solução de lise (Facs Lysing Solution – BD Biosciences) foram adicionados e incubados por mais 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, 2 µL do marcador de viabilidade 7AAD (Invitrogen) (na concentração de 1 µg/ml) em DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo em, no máximo, 15 minutos após a adição de 7AAD, com aquisição de 200.000 eventos de CD45+. Todas as amostras foram processadas em duplicata. O número de células CD34⁺ por microlitro de sangue foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{número de células CD34}^+ \text{ contadas} \times \text{número de } beads \text{ do tubo TRUCOUNT}) \times \text{fator de diluição}}{(\text{número de } beads \text{ contadas} \times 100 \mu\text{L})}$$

4.6.3.2 Avaliação Imunofenotípica Qualitativa

As moléculas de superfície CD29, CD34, CD38, CD44, CD117, CD133, CD184, HLA-DR (Pharmingen-BD Biosciences), CD146 e STRO-1 (Santa Cruz) foram avaliadas em tubos separados, juntamente com o anticorpo anti-CD45 conjugado com APC e com o marcador de viabilidade 7AAD conforme combinação da Tabela 1.

A população de células mononucleares foi selecionada a partir da estratégia de *gate* FSC/SSC. Apenas células vivas foram analisadas através da exclusão de células mortas a partir da utilização do 7AAD em todas as análises. As células vivas foram avaliadas para três marcadores de superfície celular simultaneamente, usando os anticorpos monoclonais contra os antígenos citados anteriormente. As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo abaixo:

Em cada tubo foram adicionados 50 μ L de SCUP e 5 μ L de cada anticorpo. As amostras, então, foram incubados por 25 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após a primeira incubação, foram adicionados 950 μ L de solução de lise (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) e incubados por mais 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Decorrido esse período, foram adicionados 5 μ L de solução de 7AAD na concentração de 1:5 em PBS.

As amostras foram adquiridas em seguida, com aquisição de, no mínimo, 30.000 eventos dentro do *gate* de população de células mononucleares viáveis (7AAD-CD45+) ou 100 eventos dentro do *gate* de população de células CD34+, viáveis quando marcadas com esse anticorpo.

Foram utilizados controles isotípicos (Pharmingen-BD Biosciences) para evitar marcação inespecífica.

Tabela 1 – Combinação de Anticorpos Utilizados Para Análise Qualitativa

TUBOS	Amostra	FITC	PE	APC	7AAD
01	Células				
02	Células	HLA-DR			
03	Células		CD38		
04	Células			CD45	
05	Células				7AAD
06	Células	Controle Isotípico Mouse IgG1 k	Controle Isotípico Mouse IgG1 k		7AAD
07	Células			Controle Isotípico Rat Anti- Mouse IgG1 k	7AAD
08	Células	CD38	CD34	CD45	7AAD
09	Células	HLA-DR	CD34	CD45	7AAD
10	Células	CD44	CD34	CD45	7AAD
11	Células	CD34	CD29	CD45	7AAD
12	Células	CD34	CD117	CD45	7AAD
13	Células	CD34	CD133	CD45	7AAD
14	Células	CD34	CD184	CD45	7AAD
15	Células	CD44	CD29	CD45	7AAD
16	Células	CD44	CD133	CD45	7AAD
17	Células	CD44	CD184	CD45	7AAD
18	Células	Mel CAM	CD29	CD45	7AAD
19	Células	Stro1	CD29	CD45	7AAD

4.7 Aspectos Éticos

Este estudo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética do Grupo Hospitalar Conceição e do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As gestantes que aceitaram participar do estudo deram seu consentimento através da leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Somente após o consentimento, o SCUP foi coletado.

4.8 Análise Estatística

As características contínuas foram expressas como mediana e percentis (P25 e P75) e as variáveis categóricas foram expressas em percentagem. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para verificar a distribuição de normalidade das variáveis estudadas, as quais, em sua maioria, apresentaram distribuição assimétrica. Foram testadas as associações entre as características maternas, neonatais e perinatais (variáveis independentes) e as populações celulares encontradas (variáveis dependentes). Para tal, a correlação de Spearman e o teste de Kruskal-Wallis foram utilizadas. A significância das diferenças entre os grupos de diferente idade gestacional (pré-termos e a termos) foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney U. O nível de significância de 0,05 foi definido para todas as análises. Foram excluídos das análises estatísticas os RN de muito baixo peso (<1.000 gramas) devido a problemas com tais amostras.

As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 18.0.

5. RESULTADOS

A Tabela 2 descreve o perfil imunofenotípico encontrado na população estudada, em que se pode observar a grande heterogeneidade no conteúdo de CT no SCUP. A mediana encontrada para a quantidade de células CD34+ por microlitro de SCUP foi 60,22 variando de 4,32 a 451,99 células e a mediana da percentagem de células CD34 entre as mononucleares viáveis foi 0,53%, variando de 0,05 a 18,2%. Para a percentagem de CTH entre as células mononucleares viáveis (CD34+CD38-), a mediana foi 19,61%. Já a mediana encontrada para as CT não hematopoéticas entre as células CD45- foi de 0,55 para CD44+ e de 55,63 para CD29+.

Tabela 2 – Perfil imunofenotípico das células obtidas no SCUP (Subpopulações de células tronco no SCUP)

Variável	n	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Range
CD34+ (células/ μ L)	48	60,22	31,08	108,83	4,32 - 451,99
CNT (10^3 / μ L)	39	11,60	9,45	17,39	1,45 - 28,42
CD34+ (%)*	43	0,53	0,37	0,95	0,05 - 18,2
CD34+CD38-(%)**	43	19,61	6,60	41,11	0,00 – 100
CD34+HLADR+ (%)**	41	89,87	81,36	94,97	0,05 - 100
CD34+CD117+(%)**	42	74,65	55,32	85,77	0,00 - 100
CD34+CD133+(%)**	40	95,17	82,25	100	0,23 - 100
CD34+CD184+(%)**	42	9,92	2,51	48,30	0,00 – 100
Células-tronco não hematopoéticas					
CD44+ (%)***	41	0,55	0,16	4,40	0,01 – 28,72
CD44+CD29+(%)****	40	94,43	89,17	98,36	0,00 - 100
CD44+CD133+(%)****	23	35,77	16,68	44,17	0,00 - 100
CD44+CD184-(%)****	24	97,18	92,00	98,62	17,69 - 100
CD29+ (%)***	41	55,63	43,45	66,88	34,88 – 95,73
CD29+CD146-(%)*****	41	98,08	95,03	99,25	70,78 – 99,93
CD29+STRO-1-(%)*****	38	96,40	93,31	98,72	61,54 – 99,89

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75

***Entre as células CD45+ viáveis**

**** Entre as células CD34+ viáveis**

*****Entre as células CD45- viáveis**

******Entre as células CD44+ não viáveis**

*******Entre as células CD29+ não viáveis**

Entre as características maternas e neonatais, a idade gestacional conforme ultrassom apresentou mediana de 37 semanas variando de 27 a 40 semanas, enquanto a mediana encontrada para o peso ao nascimento foi 2805 gramas, variando de 1385 a 4336 gramas. Outras características estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Análise Descritiva das Variáveis Maternas e Neonatais da Amostra Obtida.

Variável	n	Mediana	P₂₅	P₇₅	Range
Idade gestacional conforme ultrassom (em semanas)	49	37	33	39	27 - 40
Idade da mãe (em anos)	49	27	20,50	31	14 -41
Nº de gestações	48	2,00	1	4	1 - 8
Peso ao nascimento (em gramas)	49	2805	1935	3242,5	1385 - 4336
Apgar 1o minuto	47	8	7	9	1 - 9
Apgar 5o minuto	49	9	8,5	9	6 - 10

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75

As características perinatais e neonatais encontradas estão descritas na Tabela 4. Não foi observado o consumo de álcool e fumo durante a gestação para a maioria das gestantes (73,5%) estudadas. Em relação ao sexo do RN e o tipo de parto, aproximadamente metade da população pertence ao sexo feminino (51%) e a maioria dos partos foram do tipo cesariano (59,2%).

Tabela 4 - Características Perinatais e Neonatais Encontradas

	N(%)
Uso de medicação durante a gestação	
Sim	29(59,2)
Não	17 (34,7)
Fumo durante a gestação	
Sim	6 (12,2)
Não	36 (73,5)
Parou de fumar durante a gestação	4 (8,2)
Consumo de álcool durante a gestação	
Sim	7 (14,3)
Não	36(73,5)
Parou de consumir álcool durante a gestação	2 (4,1)
Gênero do RN	
Feminino	25 (51)
Masculino	24 (49)
Tipo de parto	
Cesariano	29 (59,2)
Vaginal	20 (40,8)
Pré-eclampsia durante a gestação	
Sim	4 (8,2)
Não	44 (89,8)

Em relação às características placentárias (Tabela 5), encontrou-se uma grande variação para o volume coletado (mediana igual a 42 cm³, variando de 1,4 a 155,8 cm³) e também para o peso da placenta (mediana igual a 600 gramas, variando de 335 a 1330 gramas) o que pode ser explicado pela variação entre os RN em relação ao seu tamanho (peso) e idade gestacional.

Tabela 5 – Frequência de Tendência Central das Variáveis Placentárias Perinatais

Variável	n	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Range
Peso da Placenta (em gramas)	48	600	482,50	688,75	335 - 1330
Volume coletado (em cm ³)	43	42	21,60	76,60	1,4 – 155,8
Comprimento do Cordão (em cm)	45	49	36,5	60	22 - 73

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75

Na análise estatística ajustada, o conteúdo de células CD34⁺ não apresentou correlações significativas com os parâmetros maternos, neonatais e perinatais (Tabela 6). Entretanto, o conteúdo de CNT apresentou correlação significativa positiva com idade gestacional ($r = 0,39$; $p = 0,012$), peso no nascimento ($r = 0,403$; $p = 0,011$), volume de SCUP coletado ($r = 0,388$; $p = 0,019$) e comprimento do cordão ($r = 0,384$; $p = 0,019$). Também se observou uma correlação significativa entre o Apgar no 5^o minuto e o conteúdo de algumas células tronco hematopoéticas (CD45+CD34+CD38-: $r = 0,309$ e $p = 0,044$; CD45+CD34+CD184+: $r = -0,328$; e $p = 0,034$), e não hematopoéticas (CD45-CD44+: $r = 0,383$ e $p = 0,014$; CD45-CD44+CD29+: $r = 0,315$; e $p = 0,51$; CD45-CD29+CD146+: $r = -0,430$ e $p = 0,005$; CD45-CD29+STRO-1+: $r = -0,339$ e $p = 0,037$).

Tabela 6 – Correlação entre Variáveis Independentes e o Desfecho

	CD34+ (cells/μL)		
	N	Correlação de Spearmann (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	48	- 0,07	0,612
Idade gestacional (em semanas)	52	-0,15	0,281
Peso da Placenta (em gramas)	47	-0,07	0,648
Volume coletado (em cm³)	43	-0,13	0,419
Comprimento do Cordão (em cm)	44	0,10	0,531
Idade da mãe (em anos)	48	-0,20	0,173
Nº de gestações	47	-0,26	0,076
Apgar 5 min	48	-0,09	0,563
CD45+CD34+ (%)	42	0,04	0,820
CD45+CD34+CD38- (%)	42	0,21	0,185
CNT	39	0,00	0,990

	CD34+ (%)		
	N	Correlação de Spearmann (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	43	-0,76	0,630
Idade gestacional (em semanas)	47	-0,20	0,171
Peso da Placenta (em gramas)	42	0,12	0,431
Volume coletado (em cm³)	38	-0,29	0,082
Comprimento do Cordão (em cm)	39	-0,24	0,135
Idade da mãe (em anos)	43	-0,17	0,458
Nº de gestações	42	0,07	0,642
Apgar 5 min	48	-0,09	0,563
CD45+CD34+CD38- (%)	43	-0,73	0,642
CD45+CD34+CD133+ (%)	40	0,40	0,010
CNT	33	-0,19	0,288

CNT (10³ /μL)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	39	0,40	0,011
Idade gestacional (em semanas)	42	0,39	0,012
Peso da Placenta (em gramas)	39	-0,18	0,282
Volume coletado (em cm³)	36	0,39	0,019
Comprimento do Cordão (em cm)	37	0,38	0,019
Idade da mãe (em anos)	39	0,12	0,466
N^o de gestações	39	0,00	1,000
Apgar 5 min	39	0,23	0,150
CD45+CD34+ (%)	33	-0,19	0,288
CD45+CD34+CD38- (%)	33	0,02	0,912
CD45+CD34+CD38- (%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	43	0,309	0,044
CD45+CD34+CD184+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	42	-0,310	0,046
Apgar 5 min	42	-0,328	0,034
CD45-CD44+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	0,383	0,014
CD45-CD44+CD29+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso da Placenta (em gramas)	39	0,315	0,051
CD45-CD29+CD146+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	-0,430	0,005
CD45-CD29+STRO-1+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	-0,339	0,037

Na análise estatística comparativa foram consideradas as variáveis descritas na Tabela 7. Não houve diferença significativa para quantidade de células CD34/ μ L entre os grupos em relação à idade gestacional, sexo do RN, tipo de parto, fumo, álcool, medicação e pré-eclampsia (Tabela 7). Em relação ao conteúdo de CNT, foram achadas diferenças entre os grupos para idade gestacional ($p = 0,022$) e sexo do RN ($p = 0,012$). Também houve diferença para a idade gestacional e o conteúdo de células-tronco hematopoéticas CD45⁺CD34⁺CD133⁺ ($p = 0,056$) e CD45⁺CD34⁺CD184⁺ ($p = 0,003$), e de células-tronco não hematopoéticas CD45-CD44⁺ ($p = 0,040$) e CD45⁻CD44⁺29⁺ ($p = 0,057$). Da mesma forma, foi achada diferença entre os grupos entre pré-eclampsia e CTH CD45⁺CD34⁺CD117⁺ ($p = 0,031$) e células-tronco não hematopoéticas CD45-CD44⁺ ($p = 0,051$).

Tabela 7 - Desfecho não ajustado – Mann-Whittney U

	Mediana		M-W	P
Idade gestacional				
	IG < 37 sem	IG > ou = 37 sem		
CD34+ (cells/ μ L)	63,37	55,42	242	0,348
CD45+CD34+CD133+(%)	100,00	91,92	132	0,056
CD45+CD34+CD184+(%)	35,35	5,89	102,5	0,003
CD45-CD44+ (%)	0,31	1,83	129	0,040
CNT	9,78	13,57	106	0,022
Sexo do RN				
	Masculino	Feminino		
CD34+ (cells/ μ L)	51,81	63,60	242	0,343
CNT	10,10	13,83	100	0,012
Tipo de parto				
	vaginal	cesariano		
CD34+ (cells/ μ L)	54,13	63,49	264	0,738
CD45+CD34+CD184-(%)	93,78	77,89	135	0,047
CNT	14,42	10,81	129	0,116
Fumo durante a gestação				
	Sim	Não		
CD34+ (cells/ μ L)	25,52	62,12	117	0,113
CNT	11,97	11,19	108	0,985
Álcool durante a gestação				
	Sim	Não		
CD34+ (cells/ μ L)	30,90	62,12	107	0,142
CNT	14,47	11,39	103	0,938
Medicação durante a gestação				
	Sim	Não		
CD34+ (cells/ μ L)	62,74	51,20	186	0,223
CNT	11,60	11,44	103	0,394
Pré-eclampsia durante a gestação				
	Sim	Não		
CD34+ (cells/ μ L)	65,08	56,24	43	0,317
CD45+CD34+CD117+(%)	39,37	76,54	14	0,031
CD45-CD44+ (%)	0,06	0,87	18	0,051
CNT	11,19	11,78	49	0,792

6. DISCUSSÃO

Esse estudo determinou o perfil imunofenotípico do SCUP de RN nascidos entre 24 a 40 semanas de idade gestacional, comparando o conteúdo de CT entre pré-termos e a termo, como também avaliou a influência e a associação de fatores maternos, neonatais e perinatais com o conteúdo celular do SCUP. Foi observada uma grande heterogeneidade no conteúdo e na quantidade de CT nas amostras de SCUP estudadas (Tabela 2). Não houve influência de nenhuma das características maternas, placentárias e neonatais na quantidade de células CD34+ por microlitro assim como para o percentual das mesmas. Entretanto, pode-se observar a influência do peso ao nascimento, idade gestacional, volume de SCUP coletado e comprimento do cordão na quantidade de CNT. Além disso, também foi encontrada diferença entre RN pré-termo e a termo para a quantidade de CNT e algumas subpopulações de CTH e CT não hematopoéticas. Outro achado interessante desse estudo foi a possível influência do *stress* fetal (Apgar e pré-eclampsia) em algumas subpopulações de CT.

Muitos estudos similares vêm demonstrando a influência de fatores maternos e obstétricos no conteúdo do SCUP, como a idade gestacional, peso da placenta, peso ao nascimento, sexo do RN, entre outros. (Tabela 8). Porém, os achados são diversos e nem sempre concordantes.

A diversidade de resultados encontrados entre nossos resultados e de outros autores em relação à quantificação de CTH e as possíveis correlações com parâmetros celulares e fisiológicos podem ser explicados por vários fatores. A quantificação de células CD34+ sem a utilização da marcação de viabilidade, o uso de sangue total (não separando somente a fração mononuclear) e a dificuldade em quantificar eventos raros poderiam explicar tais diferenças em relação aos outros

estudos. Além disso, fatores técnicos e metodológicos em relação à coleta e ao processamento das amostras e, até mesmo, variações fisiológicas individuais também poderiam afetar os resultados.

A grande variabilidade interindividual encontrada na análise das amostras de SCUP também já havia sido relatada por outros investigadores, principalmente, para a população de CTH (NARDI *et al.*, 1999; PRANKE *et al.*; 2001; WATT *et al.*, 2005). Da mesma forma, a diferença na quantificação das CT no SCUP pode ser explicada pela própria heterogeneidade das células do SCUP, por características relacionadas à gestação e ao parto, e pela diferença entre as técnicas de coleta de SCUP e de metodologia de quantificação do mesmo. Também podemos observar uma variabilidade entre as características maternas e neonatais (Tabela 3), assim como entre as variáveis placentárias, o que pode ser explicado pela população estudada de RN nascidos entre 24 a 40 semanas de idade gestacional. Diferentemente da maioria dos estudos descritos na literatura, a população estudada é composta por RN a termo, saudáveis, sem intercorrências durante a gestação e sem complicações no parto (Tabela 8).

Tabela 8 - Estudos Publicados nos Últimos 10 anos

Autor	Ano	N	Variáveis Estudadas	Resultados significativos
JUUTISTANAHO <i>et al.</i>	2010	167	pH da artéria umbilical (UApH) peso ao nascimento (PN) peso placenta (PP) razão entre PP e PN (PP/PN) tipo de parto sexo	Correlações significativas entre: UApH e CNT ($r = -0,29$; $p = 0,0002$); UApH e CD34+ ($r = -0,31$; $p < 0,0001$); PP e CNT ($r = 0,27$; $p = 0,0004$); PP e CD34+ ($r = 0,29$; $p = 0,0002$); PN e CNT ($r = 0,20$; $p = 0,008$); PN e CD34+ ($r = 0,18$; $p = 0,02$); Efeito do UApH em partos vaginais e quantidade de e CD34+ ($r^2 = 0,75$)
OMORI <i>et al</i>	2010	105	Idade materna Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) peso placenta (PP) comprimento do cordão tipo de parto	Correlações significativas entre: IG e CD34+ ($B = -31,24$; $p = 0,008$); comprimento do cordão e CD34+ ($B = 2,77$; $p = 0,029$)
OMORI <i>et al</i>	2008	176	Idade materna Nº de gestações fumo Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) peso placenta (PP) comprimento do cordão tipo de parto Apgar 1º min sexo	Correlações significativas entre: Nº de gestações e CD34+ ($B = -26,33$; $p = 0,02$) comprimento do cordão e CD34+ ($B = 1,83$; $p = 0,01$)
MANEGOLD <i>et al</i>	2008	79	Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) parto cesariano sexo pH da veia umbilical (UVpH)	Correlações significativas entre: CNT e UVpH ($r = -0,364$; $p = 0,002$); CD34+ e UVpH ($r = -0,503$; $p = 0,000$); Parto cesariano Parto por stress fetal > CNT, CD34+ comparada a o parto eletivo
CANABARRO <i>et al</i>	2007	70	Idade materna Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) peso placenta (PP) comprimento do cordão Volume coletado de SCUP	Correlações significativas entre: Volume de SCUP e PN ($r = 0,49$; $p < 0,01$); Volume de SCUP e PP ($r = 0,30$; $p < 0,05$); Volume de SCUP e CD34+/ μ L ($r = 0,29$; $p < 0,05$); Volume de SCUP e CD34+ ($r = 0,36$; $p < 0,01$); CD34+/ μ L e IG ($r = -0,33$; $p < 0,001$);
McGUCKIN	2007	43	Idade materna Nº de gestações peso ao nascimento (PN) Idade gestacional (IG) sexo	Sexo Feminino: maior conteúdo de CD34+ ($p < 0,001$) Nº de gestações Quanto maior o Nº de gestações, menor o conteúdo de CNT ($p < 0,0001$) PN Quanto menor PN, menor o conteúdo de CNT ($p < 0,0001$) e de CTH ($p < 0,001$) IG IG entre 38 a 40 semanas: maior o conteúdo de CNT ($p < 0,0001$)
CERVERA <i>et al.</i>	2006	83	Idade materna Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN)	Correlações significativas entre: IG e CD34+CD38- ($r = -0,57$; $p < 0,001$); IG e CD34+CD117+ ($r = 0,29$; $p = 0,009$);

			comprimento do RN (CN) tipo de parto Apgar sexo pH da artéria umbilical (UApH) presença de pré-eclampsia <i>stress</i> fetal agudo CTH	CD34+/ μ L e PN ($r = 0,37$; $p = 0,021$; $\beta = +47$; $p = 0,03$); CD34+/ μ L e <i>stress</i> fetal agudo ($r = 0,37$; $p = 0,021$; $\beta = +31,9$; $p = 0,021$); CD34+CD38- e CN ($r = 0,69$; $p < 0,00$; $\beta = -1,67$; $p < 0,001$); CD34+CD38- e pré-eclampsia ($r = 0,69$; $p < 0,00$; $\beta = -14,78$; $p < 0,008$);
NAKAGAWA <i>et al</i>	2004	572	Idade materna Nº de gestações Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) peso placenta (PP) comprimento do cordão sexo	Correlações significativas entre: Idade materna e CD34+ ($r = -0,08$; $p < 0,05$); PN e CD34+ ($r = 0,15$; $p < 0,001$); PP e CD34+ ($r = 0,08$; $p = 0,05$); IG e CNT ($p < 0,001$); IG e CD34+ ($p < 0,001$);
BONAB <i>et al</i>	2004	190	Idade materna Nº de gestações Idade gestacional (IG) peso ao nascimento (PN) tipo de parto sexo	Tipo de parto Parto vaginal: maior conteúdo de CNT ($p = 0,001$); Idade materna > 25 anos: maior conteúdo de CNT ($p = 0,02$); Nº de gestações 1 ou 2 gestações: maior conteúdo de CNT ($p = 0,035$)

No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa na concentração de CD34+ entre as amostras de SCUP de RN pré-termos e a termo ($p > 0,05$), embora algumas investigações relatem que a concentração de CD34+ no SCUP esteja correlacionada com a idade gestacional. A quantidade de células CD34+ por microlitro também não apresentou correlação significativa com fatores maternos (idade materna, número de gestações), neonatais (idade gestacional, peso ao nascimento, Apgar) ou perinatais (peso da placenta, volume de SCUP coletado, comprimento do cordão). Da mesma forma, não houve associação significativa entre a percentagem de células CD34+ e tais fatores. O conteúdo de CD34+ tem sido associado com a “pega” de transplante e sobrevida dos pacientes transplantados com SCUP, por ser um fator importante na reconstituição hematopoética pós-transplante. Existem evidências de que, embora a frequência da população de células CD34+ seja um indicador confiável do potencial progenitor de SCUP, esta é heterogênea por natureza (YAP *et al.*, 2000). Por outro lado, essa heterogeneidade pode refletir nas diferenças de sensibilidade de metodologias empregadas para a quantificação de CT por diferentes investigadores

(PRANKE *et al.*, 2005). Outra explicação para diferenças encontradas entre nossos achados e de outros estudos é a forma de coleta: se a coleta é realizada antes ou depois da retirada da placenta. Nesse estudo a coleta foi realizada após a retirada da placenta do útero (como é preconizado nos bancos públicos de SCUP) para não influenciar no parto. Porém sabe-se que a coleta realizada antes da retirada da placenta deve aumentar o volume de SCUP (conseqüentemente o número de CTH) por que a contração uterina favorece a coleta.

Devido a não diferença na concentração de células CD34+ entre os grupos de idade gestacional e ao fato do menor volume de SCUP de RN pré-termos, a utilidade de unidades de SCUP desse grupo não seria suficiente para um receptor de > 10 Kg de peso segundo as recomendações atuais (GLUCKMAN *et al.*, 2004).

Dentre as variáveis mais aceitas como critério de seleção e armazenamento de unidades em bancos de SCUP está a CNT, baseado nos dados de sucesso de transplante de SCUP e sobrevida dos pacientes (MIGLIACCIO *et al.*, 2000; AROVIITA *et al.*, 2004). Em nosso estudo, o conteúdo de CNT apresentou uma correlação positiva significativa com idade gestacional ($r = 0,39$; $p = 0,012$), peso ao nascimento ($r = 0,403$; $p = 0,011$), volume de SCUP coletado ($r = 0,388$; $p = 0,019$) e comprimento do cordão ($r = 0,384$; $p = 0,019$). Também foi demonstrado que RN a termo e do sexo feminino apresentaram maior quantidade de CNT, confirmando os achados de Ballen (2000) e Omori (2010) em relação à maior idade gestacional e de Nagawa (2004) e McGuckin (2007) para o sexo feminino.

As CTH CD34+CD133+ e CD34+CD184+ foram encontradas em maior proporção em SCUP de RN pré-termos, enquanto que para a maioria das CTH não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Em relação às CT não hematopoéticas, o SCUP de RN a termo apresentaram níveis maiores de células CD45-CD44+.

As células CD34+CD133+ correspondem a uma população de CTH mais primitiva e sua função pode estar relacionada à comunicação célula-célula e ao ancoramento das células ao endotélio da medula óssea (McGUCKIN *et al.*, 2003). Apesar de termos encontrado maior quantidade dessa subpopulação em RN pré-termos, um estudo anterior não achou diferença estatística significativa entre os grupos de idade gestacional (CERVERA *et al.*, 2006). As células CD34+CD184+ têm um papel importante na migração e *homing* das CTH (BURGER *et al.*, 2003), indicando sua capacidade regenerativa. Já foi demonstrado que o potencial de *homing* é maior em RN a termo, entretanto, a proporção encontrada para essa subpopulação foi maior em RN pré-termos. É possível que o ambiente fetal influencie a concentração encontrada das diferentes subpopulações celulares e essa diferença em relação a outros estudos poderia ser explicada pelo fato da população estudada ser bastante ampla em termos de idade gestacional (RN entre 24 a 40 semanas). Conseqüentemente, a transição da hematopoese hepática para a medula óssea durante a gestação teria grande influencia sobre esses achados.

Nesse estudo, o *stress* fetal pode ser sugerido como um possível causador do aumento de CT no SCUP, o que poderia estar relacionado ao reparo de lesão vascular. Foram encontradas correlações significativas do Apgar no 5º minuto com a percentagem de células CD34+CD38- ($r = 0,309$; $p = 0,044$), CD34+CD184+ ($r = -0,328$; $p = 0,034$), CD45-CD44+ ($r = 0,380$; $p = 0,014$), CD45-CD29+CD146+ ($r = -0,430$; $p = 0,005$) e CD45-CD29+STR0-1+ ($r = -0,339$; $p = 0,037$), indicando uma possível influência do pH da artéria umbilical no conteúdo desses marcadores. Além disso, foi demonstrado que na ausência de pré-eclampsia durante a gestação há maiores níveis de células CD45-CD44+ e CD34+CD117+. Foram encontradas algumas limitações durante a realização do estudo, tais como questão logística e de obtenção de amostras de SCUP de RN pré-termos, podendo refletir em nossos achados. Houve dificuldade de conseguir tais amostras, pois não há como prever o nascimento de tais crianças, as quais, geralmente, tratam-se de casos de urgência e com maior

mortalidade, acarretando em perdas dessa população. Além disso, o SCUP de RN pré-termos coagula com uma facilidade maior do que RN a termo, o que inviabiliza seu processamento em pouco volume coletado. A proposta inicial era coletar um número de amostras maior e comparar 3 grupos de idade gestacional. Entretanto a dificuldade de se obter RN pré-termos, principalmente menores do que 30 semanas de idade gestacional, fez com que coletássemos menos amostras do que o previsto e dividíssemos os grupos em 2. Esse fato também pode ter influenciado nossos resultados. Por outro lado, o desenho do estudo foi feito para representar a realidade dos bancos públicos de cordão na coleta e seleção de SCUP, diferente da maioria dos estudos encontrados na literatura. Usamos amostras frescas, de sangue total (sem a separação da fração de células mononucleares), a coleta foi realizada pós-retirada da placenta e a análise foi realizada com marcador de viabilidade e dentro de 24 horas pós-coleta. O objetivo desse estudo foi demonstrar o perfil imunofenotípico do SCUP de RN de diferentes idades gestacionais para justificar o armazenamento de material oriundo de RN pré-termos, que apesar do menor volume coletado, teria uma concentração maior de CT. Apesar de não ter sido comprovado a hipótese do estudo, os resultados indicam a associação negativa entre CD34+ e idade gestacional. No entanto, seria importante ressaltar que a ausência do grupo de idade gestacional com menos de 30 semanas e o pequeno tamanho amostral, provavelmente, tendem a subestimar o efeito proposto. Além disso, sabe-se que os estudos disponíveis sobre o assunto são inconclusivos e controversos e seriam necessárias mais investigações sobre o tema. Outro fato importante que o estudo mostra, é a necessidade de estabelecer uma metodologia padrão para a dosagem das CTH. Uma vez que o número de CTH é um dos critérios mais importante para a pega do enxerto e sucesso do transplante, a dosagem dessas células, através da citometria de fluxo, deve ser realizada sempre usando controles isotípicos, bem como marcador de viabilidade, tal como o 7AAD, cuidados esses nem sempre observados nos laboratórios de imunofenotipagem.

7. CONCLUSÕES

A importância do SCUP, assim como o melhor conhecimento de seu conteúdo celular, tem aumentado significativamente nos últimos anos como fonte de pesquisa clínica e científica. Estudos vêm demonstrando que tanto o conteúdo e a qualidade de unidades de SCUP podem ser influenciados por fatores fisiológicos referentes à mãe, gestação e ao neonato. Entretanto, alguns achados têm sido bastante controversos e inconclusivos. Portanto, se fazem necessários mais estudos nessa área a fim de se estabelecer critérios bem definidos para a seleção de unidades ótimas de SCUP.

Nosso estudo não encontrou associações significativas que justificassem a influência de variáveis maternas e obstétricas na quantidade de células CD34+ no SCUP e nem diferença entre as diversas idades gestacionais. Em contrapartida, para CNT foram encontradas algumas associações e a diferença entre RN pré-termos e a termo. Nossos resultados corroboram com a justificativa do não armazenamento de unidades oriundas de RN pré-termos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Westman P, Kekomäki R. Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34+ cell concentration. *Acta Paediatrica*. 2004; 93(10): 1323-9.
2. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Kekomäki R. Cord blood hematopoietic progenitor and cell concentration and infant sex. *Transfusion*. 2005;45: 613-21.
3. Ballen KK, Wilson M, Wu J, Ceredana AM, Hsieh C, Stewart FM, Popovsky MA, Quesenberry PJ. Bigger is better: maternal and neonatal predictor of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;27: 7-14.
4. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MJ, Lane TA. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2008;14: 356-63.
5. Ballen K. Challenges in umbilical cord blood stem cell banking for stem cell reviews and reports. *Stem Cell Rev and Rep*. 2010;6: 8-14.
6. Barker, J.N., Wagner, J.E. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2003;48:35-43.
7. Barker, J.N., 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*. 2003;102: 1915-9.
8. Barry F, Murphy M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36: 568-84
9. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Minisini AM, Spizzo R, et al. Increased blood volume and CD34⁺CD38⁻ progenitor cell recovery using novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells*. 2000;18: 245-51.
10. Benian A, Uzun H, Aydin S, Albayrak M, Uludag S, Madazli R. Placental stem cell markers in pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2008;100: 228-33.
11. Bieback K, Kern S, Küter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of MSC from UCB. *Stem Cells*. 2004 (22): 625-34.
12. Brocklebank A, Sparrow R. Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 2001; 46: 254-61.
13. Bonab MAM, Alimoghaddam KA, Goliaei ZA, Ghavamzadh AR. Which factors can affect cord blood variables? *Transfusion*. 2004;44: 690-3

14. Burger J, Spoo A, Dwenger A, Burger M, Behringer D. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and $\alpha 4\beta 1$ integrins mediate spontaneous migration of human CD34⁺ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *British Journal of Haematology*. 2003;122: 579–89.
15. Canabarro R, Sporleder H, Gomes T, Zanatta G, Sriebl L, Freitas F, Neumann J, Pranke P. Immunophenotypic evaluation, and physiological and laboratory correlations of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. *Biocell*. 2007; 31(3): 397-403.
16. Cervera A, Lillo R, García-Sánchez F, Madero L, Madero R, Vicario J. Flow cytometric assessment of hematopoietic cell subsets in cryopreserved preterm and term cord blood, influence of obstetrical parameters, and availability for transplantation. *American Journal of Hematology*. 2006;18: 397-410.
17. 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*. 1999;14: 520-525.
18. Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-13.
19. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Bernier M, Massy M, Ley P, De 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*. 1995;13: 281-8.
20. Denning-Kendall P, Singhs S, Bradley B, Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood CD34⁺ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells*. 2003;21: 61-70.
21. Dimitriou H, Perdikogianni C, Stiakaki E, Vorgia P, Hatzidaki E, Kalmani M. The impact of mode of delivery and gestational age on cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann Hematol*. 2006;85: 381-5.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
23. Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103(4):355-69.
24. Gasparoni A, Ciadella L, Avanzini M A, 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*. 2000;47: 825-829.

25. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17): 1174-8.
26. Gluckman E, Koegler G, Rocha V. Human Leukocyte Antigen Matching in Cord Blood Transplantation. *Semin Hematol*. 2005;42: 85-9.
27. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol*. 2004;32: 397-407.
28. Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development*. 1999;106 (4):619-33.
29. He X, Gonzalez V, Tsang A, Thompson J, Tsang TC, Harris DT. Differential gene expression profiling of CD34+ CD133+ umbilical cord blood hematopoietic stem progenitor cells. *Stem Cells*. 2005;14: 188-98.
30. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34+ CD38-. *Leukemia*. 2003;17: 960-4.
31. Jan R, Wen S, Shyr M, Chiang B. Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood. *Pediatric Transplantation*. 2008; 12: 868 – 73.
32. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418 (6893): 41-9.
33. 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*. 2000; 28: 1174-80.
34. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188: 503-9.
35. Juutistanaho S, Eskola M, Sainio S, Aranko K, Kekomäki R. Association of stress-related reinatal factors and Cord blood unit hematopoietic progenitores is dependent on delivery mode. *Transfusion*. 2010;50 : 663-71.
36. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May SW. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87: 1-13.
37. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2005;60(5): 295-6.

38. Lee YH, Lee YA, Noh KT, Kim KH, Han JY, Seo SY, Kwon HC, Kim JS, Kim HJ. Homing-associated cell adhesion molecules and cell cycle status on the nucleated cells in the bone marrow, mobilized peripheral blood and cord blood. *Journal of Korean Medical Science*. 2004;19: 523-8.
39. Leor J, Guetta E, Feinberg MS, Galski H, Bar I, Holbova R, Miller L, Zarin P, Castel D, Barbash IM, Nagler A. Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ Cells Enhance Function and Repair of the Infarcted Myocardium. *Stem Cells*. 2006;24(3):772-80.
40. Lu FZ, Fujino M, Kitazawa Y, Uyama T, Hara Y, Funeshima N, Jiang JY, Umezawa A, Li XK. Characterization and gene transfer in mesenchymal stem cells derived from human umbilical-cord blood. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2005;146: 271-8.
41. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in human Cord Blood. *Cell Stem Cell*. 2007;1: 635-45.
42. 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*. 2001;33: 1766-18.
43. Mancinelli F, Tamburini A, Spagnoli A, Malerba C, Suppo G, Lasorella R, De Fabrits P, Calugi A. Optimizing umbilical cord blood collection: impact of obstetric factors versus quality of cord blood units. *Transplantation Proceedings*. 2006;38: 1174-6.
44. Manegold G, Meyer-Monard S, Tichelli A, Pauli D, Holzgreve W, Troegger C. Cesarean section due to fetal distress increases the number of stem cells in umbilical cord blood. *Transfusion*. 2008;48: 871-6.
45. Massa M, Rosti V, Ramajoli I, Campanelli R, Pecci A, Viarengo G, Meli V, Marchetti M, Hoffman R, Barosi G. Circulating CD34⁺, CD133⁺, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of Clinical Oncological*. 2005;23: 5688-95.
46. 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. *Eur J Haematol* 2003;71:341–50.
47. McGuckin CP, Basford C, Hanger K, Habibollah, Forraz N. Cord blood revelations—The importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Human Development*. 2007;83(12):733–41.
48. McNiece I, Kubegov D, Kerzic P, Shpal, EJ, Gross S. Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture. *Experimental Hematology*. 2000; 28:1181-6.
49. McNiece I, Briddell R. *Ex vivo* expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells. *Experimental Hematology*. 2001;29: 3-11.

50. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000;96: 2717-22.
51. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88: 287-98.
52. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132: 598–611.
53. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuya H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakamaya T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. *Transfusion*. 2004;44: 262-7.
54. Nakajima M, Ueda T, Migita M, Oue Y, Shima Y, Shimada T, Fukunaga Y. Hematopoietic capacity of preterm Cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;389: 290-4.
55. Nardi N, Alfonso Z. The hematopoietic stroma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999;32: 601-9.
56. Nardi, N e Da Silva eirelles, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;174:249-82.
57. Okamoto KO, Campos AH. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einsten*. 2004;2(4): 355-8.
58. Omori A, Takahashi K, Hazawa M, Misaki N, Ohba H, Manabe M, Sato H, Kudo K, Takahashi TA, Kashiwakura I. Maternal and neonatal factors associated with the high yield of mononuclear low-density/CD34⁺ cells from placental umbilical cord blood. *Tohoku J Exp Med*. 2008;215: 23-32.
59. Omori A, Manabe M, Kudo K, Tanaka K, Takahashi K, Kashiwakura I. Influence of obstetric factors on the yield of mononuclear cells, CD34+ cell count and volume of placental/umbilical cord blood. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2010;36(1): 52-7.
60. Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibe, G, Schmidt F, Nardi NB. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematologica*. 2001;105: 71-6..
61. Pranke P, Hendriks J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nard, N, Visser JWM. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38: 1775-89.
62. Pranke P, Hendriks J, Alespeiti G, Nardi N, Rubinstein P, Visser V. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCOUNT™ -BD and ISHAGE protocols. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006;39: 901-6.

63. Raaijmakers M, Scadden D. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Hematology*. 2008;15: 301-6.
64. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Annals of New York Academy of Sciences*.. 2001;938: 231-3.
65. Romanov Y, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells*. 2003;21:105-10.
66. 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*. 1995;92: 10119-22.
67. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007;131(2):324-36.
68. Secco M, Zucconi E, Vieira N M, Fogaça LLQ, Cerqueira A, Carvalho MDF, Jazedje T, Okamoto O K, Muotri AR, ZATZ M. Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord Is Richer than Blood! *Stem Cells*. 2008;26:146–50.
69. Solves P, Perales A, Mirabet V, Roig R. Stress factors and umbilical cord blood banking. *Transfusion Medicine [letter to the editor]*. 2007;17: 205-6.
70. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(6859):98-104.
71. Surbek D, Holzgreve W, Jansen W, Heim D, Garritsen H, Nissen C, Wodnar-Filipowicz A. Quantitative immunophenotypic characterization, cryopreservation, and enrichment of second- and third-trimester human fetal cord blood hematopoietic stem cells (progenitor cells). *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179:1228-33.
72. Surbek DV, Holzgreve W, Steinmann C, Hahn S, Gratwohl A, Wodnar-Filipowicz A, Tichelli A. Preterm birth and the availability of cord blood for HPC transplantation. *Transfusion*. 2000;40: 817-20.
73. Sutherland DR, Stewart AK, Keating A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells*. 1993;11(3): 50-7.
74. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of Stem Cells from Diverse Origin. *Cytometry*. 2010;77(Pt A): 6–10.

75. 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.* 1998;22 Suppl 1: 61-2.
76. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeffe M, Lereoy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005;23(8): 1105-12.
77. Ven C, Collins D, Bradley M, Morris E, Cairo M. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nohematopoietic tissue and cell regeneration. *Experimental Hematology.* 2007;35: 1753-65.
78. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, Goldman A, Kersey J, Krivit W, MacMillan ML, Orchard PJ, Peters C, Weisdorf DJ, Ramsay NK, 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.* 2002;100: 1611-18.
79. Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS. The Stem Cell Niche. *J Pathol.* 2009;217(2):169-80.
80. Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine.* 2005;10: 209-20.
81. Wilson A, Laurenti E, Trumpp A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2009;19: 461-8.
82. Wyrsh A, Dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Experimental Hematology.* 1999;27: 1338 – 45.
83. Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells. *Archives of Medical Research.* 2003;34: 461–75.
84. Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K. Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Experimental Hematology.* 2001;29: 174-82.
85. 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.* 2000;50: 258-259.
86. Zago MA. Células-tronco: origens e propriedades. In: Zago MA, Covas DT, editors. *Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina.* Atheneu; 2006. p. 3-20.

87. Zhang, Y. Z., DA, W. M. In vitro biological characteristics of mesenchymal stem cells from patients with myelodysplastic syndrome and their support to hematopoiesis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2005;13: 839-42. Chinese.

9. ARTIGO

Perfil imunofenotípico do sangue de cordão umbilical de neonatos pré-termos e nascidos a termo

Raquel Arrieche Fernandes^{1,2}, Cristiane Scher³ Marcelo Zubaran Goldani¹, Patrícia Pranke^{3,4},

¹ Programa de Pós Graduação em Saúde da Criança e Adolescente, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre

² Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição, GHC, Porto Alegre

³ Laboratório de Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre

⁴ Instituto de Pesquisa em Células-tronco, Porto Alegre

Resumo

Objetivo: Avaliar o perfil imunofenotípico do SCUP de RN pré-termos e comparar com o SCUP de neonatos nascidos a termo. Avaliar as correlações no SCUP, analisando parâmetros fisiológicos, imunofenotípicos e hematológicos.

Métodos: Foram analisadas, por citometria de fluxo, 53 amostras de SCUP de RN pré-termos e RN a termo. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o equipamento FACSCalibur (BD Biosciences) e as análises quantitativas e qualitativas feitas através do *software* CELLQuest versão 3.1 (BD Biosciences). Para a análise do CD34⁺ absoluto e percentual utilizou-se a estratégia de *gates* Trucount-ISHAGE preconizado por Brocklebank & Sparrow. Foram utilizados controles isotípicos para evitar marcação inespecífica.

Resultados e Conclusões: Não houve influência de nenhuma característica materna, neonatal e perinatal no conteúdo de células CD34⁺ e nem diferença entre RN pré-termos e a termo. Entretanto, pode-se observar a influência do peso no nascimento, idade gestacional, volume de SCUP coletado e comprimento do cordão na quantidade de CNT. O estudo não encontrou associações significativas que justificassem o armazenamento de unidades oriundas de RN pré-termos, sendo necessários mais estudos nessa área.

Abstract

Objectives: Evaluate the immunophenotypic profile of UCB in preterm and term newborn babies. Evaluate the UCB correlations, analyzing physiological, immunophenotypic and hematological parameters.

Methods: 53 samples of preterm and term RN UCB were analyzed using flow cytometry. Data was acquired using FACSCalibur (BD Biosciences) and the quantitative and qualitative analyses were carried out using the software CELLQuest versão 3.1 (BD Biosciences). For CD34⁺ absolute and percentual analysis, gates Trucount-ISHAGE strategy was used, according to Brocklebank & Sparrow. Isotypical controls were used to avoid unspecific marking

Results and Conclusions: No influence of maternal, neonatal and perinatal characteristic occurred in the content of the CD34⁺ cells, and there was no difference between preterm and full-term NB. However, TNC quantity was influenced by birth weight, gestational age, UCB volume collected and umbilical cord length. This study did not find significant associations which can justify the storage of blood units from preterm NB, concluding that more investigations are necessary in this scientific field.

Introdução

A terapia celular busca restaurar o funcionamento de tecidos ou órgãos através da proteção da integridade celular ou reposição de células danificadas por células saudáveis. Nesse sentido, as células-tronco se tornaram ferramentas promissoras para o estudo da medicina regenerativa, pois podem ser transplantadas diretamente no sítio da lesão ou recrutadas a ele mediante estimulação da síntese de moléculas quimiotáticas. (OKAMOTO e CAMPOS, 2004; TÁRNOK *et al.*, 2010). A caracterização mais detalhada de novos tipos de células-tronco em tecidos já formados e a exploração de fontes alternativas dessas células, como o sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), trazem muitos avanços na área (OKAMOTO e CAMPOS, 2004). A utilização do sangue de cordão umbilical (SCUP) tem aumentado significativamente nos últimos anos, mostrando a sua importância como fonte de pesquisa clínica e científica (GLUCKMAN *et al.*, 1989; OMORI

et al., 2008). Isso se deve ao fato do SCUP ser rico em progenitores hematopoéticos promovendo o seu uso para o tratamento de doenças hematológicas malignas ou não malignas há mais de 20 anos (GLUCKMAN *et al.*, 1989, WYRSCH *et al.*, 1999; GASPARONI *et al.*, 2000; MALANGONE *et al.*, 2001; PRANKE *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2001) e ser uma fonte alternativa de transplante em pacientes que não apresentam doadores HLA totalmente compatíveis, uma vez que estas células parecem induzir com menor frequência a doença do enxerto contra hospedeiro alogênico (GVHD, *graft versus host disease*) (BALLEN, 2001; PRANKE *et al.*, 2005; WATT *et al.*, 2005; McGUCKIN *et al.*, 2007; OMORI *et al.*, 2008).

As células-tronco hematopoéticas (CTH) são CT adultas progenitoras das células sanguíneas e a facilidade de acesso ao tecido hematopoético (sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical) propiciou seu estudo muito precocemente (NARDI *et al.*, 1999). Uma combinação de marcadores de superfície tem sido usada para identificar a CTH humana ou, pelo menos, uma subpopulação precursora hematopoética primitiva. O fenótipo, entretanto, muda dependendo do *status* de ativação das populações celulares precursoras, assim como da fonte dessas células, e não fornece informações sobre sua capacidade funcional *in vivo* (WATT *et al.*, 2005; TÁRNOK *et al.*, 2010). A presença do antígeno CD34 é o principal marcador dessa população. Aproximadamente de 1 a 3% das células mononucleares da medula óssea expressem essa proteína (SUTHERLAND *et al.*, 1993), cuja função parece estar relacionada aos processos de localização/adesão das células-tronco e progenitoras, bem como à manutenção do fenótipo precursor (KRAUSE *et al.*, 1996).

As CTH (CD34⁺CD38⁻) são raras, correspondendo a 0,05% a 0,5% do total de células da medula óssea e do sangue de cordão umbilical, e bem menos no sangue periférico, e apresentam baixa taxa de proliferação. Sua frequência é maior no SCUP (DE BRUYN *et al.*, 1995; TIMEUS *et*

al., 1998; CHO *et al.*, 1999), o que explica o sucesso no uso de SCUP em transplantes (BELVEDERE *et al.*, 2000), visto que estas células são responsáveis pela sobrevida do enxerto a longo prazo (ISHIKAWA, *et al.*, 2003).

Vários fatores maternos e *intrapartum* influenciam a seleção da placenta para coleta de SCUP. Apesar de ser conhecido o fato de que o número de CTH é heterogêneo por natureza, sabe-se que a heterogeneidade na quantidade dessas células varia também por fatores perinatais como a idade gestacional e o tipo de parto, entre outros (YAP *et al.*, 2000; PRANKE *et al.*, 2005; CERVERA *et al.*, 2006; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010).

Vários estudos demonstraram a associação negativa do efeito da idade gestacional (SURBEK *et al.*, 2000; GASPARONI *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2000; YAP *et al.*, 2000; PRANKE *et al.*, 2005; CERVERA *et al.*, 2006) e a correlação positiva do peso ao nascer (JONES *et al.*, 2003; NAKAGAWA *et al.*, 2004; MCGUCKIN *et al.*, 2007) com o volume e a quantidade de CNT e de CTH no SCUP. Dessa forma, preditores maternos e neonatais poderiam ser usados para viabilizar e processar unidades ótimas de SCUP. A utilidade clínica desses estudos é limitada, pois, a maioria das amostras de SCUP coletadas e, posteriormente, armazenadas em bancos de SCUP é de recém-nascidos (RN) a termo, saudáveis e de partos sem complicações. Entretanto, mesmo em crianças nascidas a termo, os fatores perinatais e maternos podem predizer o conteúdo de progenitores hematopoéticos do SCUP (SURBEK *et al.*, 2000; JUUTISTANAHO *et al.*, 2010).

O melhor conhecimento das populações de células-tronco presente no SCUP é de fundamental importância para que se possa ampliar a sua obtenção, armazenamento e utilização. No entanto, os fatores que se correlacionam com o perfil imunofenotípico do SCUP de RN em diferentes idades gestacionais ainda são controversos e seu conhecimento pode ser útil uma vez que a quantidade de células-tronco em amostras de SCUP com, por exemplo, 34 semanas pode conter mais células-tronco do que amostras com 40 semanas. Esse fato poderia justificar o armazenamento

dessa amostra mesmo se for coletado um volume menor de 60-70 mL de SCUP. O objetivo do presente trabalho é avaliar os parâmetros fisiológicos, imunofenotípicos e hematológicos do SCUP de RN, considerando a influência de co-fatores biológicos.

Métodos

Foram realizadas 53 coletas de SCUP oriundos de Recém-nascidos (RN) com idade igual ou superior a 24 semanas de gestação, entre julho de 2009 e março de 2011, junto aos Centros Obstétricos do Hospital Nossa Senhora da Conceição e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e preenchimento de protocolo de coleta. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (Hospitais Nossa Senhora da Conceição) e pelo do Comitê de Ética em Pesquisa, pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Utilizando uma amostragem de conveniência, foram coletados, de forma sequencial, SCUP de 28 de recém-nascidos (RN) pré-termos, (24 a 36 semanas), e 25 amostras de SCUP de RN nascidos a termo (acima de 37 semanas).

As amostras foram obtidas por punção da veia umbilical de neonatos nascidos a termo e pré-termos e coletadas em bolsas de sangue contendo CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrose e adenina) como anticoagulante. Uma alíquota de SCUP foi coletada em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização do hemograma. Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição em um período inferior a 24 horas pós-coleta.

A análise por citometria de fluxo foi realizada no Setor de Imunologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição. A aquisição dos dados foi realizada utilizando-se o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) equipado com 2 lasers (laser de argônio

para 488 nm e laser de diodo para 635nm) e as análises quantitativas e qualitativas feitas através do *software* CELLQuest versão 3.1 (BD Biosciences).

Para a análise do CD34⁺ absoluto utilizou-se a estratégia de *gates* (janelas) Trucount-ISHAGE preconizado por Brocklebank & Sparrow. Essa técnica utiliza uma estratégia de *gates* sequenciais e a utilização de marcadores de viabilidade celular permitindo a seleção das populações de interesse e a contagem absoluta em plataforma única (BROCKLEBANK e SPARROW, 2001).

. Foram incubados 100µL de SCUP com 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD45 conjugado com FITC (clone HI30, BD Biosciences, San Jose, CA) e 5µL de anticorpo monoclonal anti-CD34 conjugado com PE (clone 581, BD Biosciences, San Jose, CA) em tubos Trucount (BD Biosciences) por 20 minutos à temperatura ambiente (23°C) e no escuro. Após incubação, 2 mL de solução de lise (Facs Lysing Solution – BD Biosciences) foram adicionados e incubados por mais 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após incubação, 2 µL de 7AAD (Invitrogen) (na concentração de 1 µg/ml) em DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo em, no máximo, 15 minutos após a adição de 7AAD, com aquisição de 200.000 eventos de CD45⁺. Todas as amostras foram processadas em duplicata. O número de células CD34⁺ por microlitro de sangue foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{número de células CD34}^+ \text{ contadas} \times \text{número de } beads \text{ do tubo TRUCOUNT)} \times \text{fator de diluição}}{(\text{número de beads contadas} \times 100 \mu\text{L})}$$

As moléculas de superfície CD29, CD34, CD38, CD44, CD117, CD133, CD184, HLA-DR (Pharmingen-BD Biosciences), CD146 e STRO-1 (SantaCruz) foram avaliadas em tubos separados, juntamente com o anticorpo anti-CD45 conjugado com APC e com o marcador de viabilidade 7AAD. A população de células mononucleares foi selecionada a partir da estratégia de *gate* FSC/SSC. Apenas células vivas foram analisadas através da exclusão de células mortas a partir da

utilização do 7AAD em todas as análises. As células vivas foram avaliadas para três marcadores de superfície celular simultaneamente, usando os anticorpos monoclonais contra os antígenos citados anteriormente. As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo abaixo:

Em cada tubo foram adicionados 50 μ L de SCUP e 5 μ L de cada anticorpo. As amostras, então, foram incubados por 25 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após a primeira incubação, foram adicionados 950 μ L de solução de lise (Facs Lysing Solution – Becton Dickinson) e incubados por mais 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Decorrido esse período, foram adicionados 5 μ L de solução de 7AAD na concentração de 1:5 em PBS. As amostras foram adquiridas em seguida, com aquisição de, no mínimo, 30.000 eventos dentro do *gate* de população de células mononucleares viáveis (7AAD-CD45+) ou 100 eventos dentro do *gate* de população de células CD34+, viáveis quando marcadas com esse anticorpo. Foram utilizados controles isotópicos (Pharmingen-BD Biosciences) para evitar marcação inespecífica.

As características contínuas foram expressas como mediana e percentis (P25 e P75) e as variáveis categóricas foram expressas em percentagem. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para verificar a distribuição de normalidade das variáveis estudadas, as quais, em sua maioria, apresentaram distribuição assimétrica. Foram testadas as associações entre as características maternas, neonatais e perinatais (variáveis independentes) e as populações celulares encontradas (variáveis dependentes). Para tal, a correlação de Spearman e o teste de Kruskal-Walis foram utilizadas. A significância das diferenças entre os grupos de diferente idade gestacional (pré-terms e a termos) foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney U. O nível de significância de 0,05 foi definido para todas as análises. Foram excluídos das análises estatísticas os RN de muito baixo peso (<1000 gramas) devido à problemas com tais amostras.

As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS versão 18.0.

Resultados

A Tabela 1 descreve o perfil imunofenotípico encontrado na população estudada, em que se pode observar a grande heterogeneidade no conteúdo de CT no SCUP.

Tabela 1 – Perfil imunofenotípico das células obtidas no SCUP (Subpopulações de células tronco no SCUP)

Variável	n	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Range
CD34+ (células/ μ L)	48	60,22	31,08	108,83	4,32 - 451,99
CNT (10^3 / μ L)	39	11,60	9,45	17,39	1,45 - 28,42
CD34+ (%)*	43	0,53	0,37	0,95	0,05 - 18,2
CD34+CD38-(%)**	43	19,61	6,60	41,11	0,00 - 100
CD34+HLADR+ (%)**	41	89,87	81,36	94,97	0,05 - 100
CD34+CD117+(%)**	42	74,65	55,32	85,77	0,00 - 100
CD34+CD133+(%)**	40	95,17	82,25	100	0,23 - 100
CD34+CD184+(%)**	42	9,92	2,51	48,30	0,00 - 100
Células-tronco não hematopoéticas					
CD44+ (%)***	41	0,55	0,16	4,40	0,01 - 28,72
CD44+CD29+(%)****	40	94,43	89,17	98,36	0,00 - 100
CD44+CD133+(%)****	23	35,77	16,68	44,17	0,00 - 100
CD44+CD184-(%)****	24	97,18	92,00	98,62	17,69 - 100
CD29+ (%)***	41	55,63	43,45	66,88	34,88 - 95,73
CD29+CD146-(%)****	41	98,08	95,03	99,25	70,78 - 99,93
CD29+STRO-1-(%)****	38	96,40	93,31	98,72	61,54 - 99,89

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75*Entre as células CD45+ viáveis

** Entre as células CD34+ viáveis***Entre as células CD45- viáveis

****Entre as células CD44+ não viáveis

*****Entre as células CD29+ não viáveis

Entre as características maternas e neonatais, a idade gestacional conforme ultrassom apresentou mediana de 37 semanas variando de 27 a 40 semanas, enquanto a mediana encontrada para o peso ao nascimento foi 2805 gramas, variando de 1385 a 4336 gramas. Outras características estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise Descritiva das Variáveis Maternas e Neonatais da Amostra Obtida.

Variável	n	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Range
Idade gestacional conforme ultrassom (em semanas)	49	37	33	39	27 - 40
Idade da mãe (em anos)	49	27	20,50	31	14 - 41
Nº de gestações	48	2,00	1	4	1 - 8
Peso ao nascimento (em gramas)	49	2805	1935	3242,5	1385 - 4336
Apgar 1o minuto	47	8	7	9	1 - 9
Apgar 5o minuto	49	9	8,5	9	6 - 10

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75

As características maternas, placentárias e neonatais estão descritas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Características Perinatais e Neonatais Encontradas

	Uso de medicação durante a gestação	N(%)
Sim		29(59,2)
Não		17 (34,7)
	Fumo durante a gestação	
Sim		6 (12,2)
Não		36 (73,5)
Parou de fumar durante a gestação		4 (8,2)
	Consumo de álcool durante a gestação	
Sim		7 (14,3)
Não		36(73,5)
Parou de consumir álcool durante a gestação		2 (4,1)
	Gênero do RN	
Feminino		25 (51)
Masculino		24 (49)
	Tipo de parto	
Cesariano		29 (59,2)
Vaginal		20 (40,8)
	Pré-eclampsia durante a gestação	
Sim		4 (8,2)
Não		44 (89,8)

Tabela 4 – Frequência de tendência central das variáveis placentárias perinatais

Variável	n	Mediana	P ₂₅	P ₇₅	Range
Peso da Placenta (em gramas)	48	600	482,50	688,75	335 - 1330
Volume coletado (em cm ³)	43	42	21,60	76,60	1,4 - 155,8
Comprimento do Cordão (em cm)	45	49	36,5	60	22 - 73

N= tamanho da amostra; P₂₅ = Percentil 25; P₇₅ = Percentil 75

Na análise estatística ajustada, o conteúdo de células CD34⁺ não apresentou correlações significativas com os parâmetros maternos, neonatais e perinatais (Tabela 5). Entretanto, o conteúdo de CNT apresentou correlação significativa positiva com idade gestacional ($r = 0,39$; $p = 0,012$), peso no nascimento ($r = 0,403$; $p = 0,011$), volume de SCUP coletado ($r = 0,388$; $p = 0,019$) e comprimento do cordão ($r = 0,384$; $p = 0,019$). Também se observou uma correlação significativa entre o Apgar no 5^o minuto e o conteúdo de algumas células tronco hematopoéticas (CD45+CD34+CD38-: $r = 0,309$ e $p = 0,044$; CD45+CD34+CD184+: $r = -0,328$; e $p = 0,034$), e não hematopoéticas (CD45-CD44+: $r = 0,383$ e $p = 0,014$; CD45-CD44+CD29+: $r = 0,315$; e $p = 0,51$; CD45-CD29+CD146+: $r = -0,430$ e $p = 0,005$; CD45-CD29+STRO-1+: $r = -0,339$ e $p = 0,037$).

Tabela 5 – Correlação entre variáveis independentes e o desfecho

	CNT (10 ³ / μ L)		
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	39	0,40	0,011
Idade gestacional (em semanas)	42	0,39	0,012
Volume coletado (em cm ³)	36	0,39	0,019
Comprimento do Cordão (em cm)	37	0,38	0,019
CD45+CD34+CD38- (%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	43	0,309	0,044
CD45+CD34+CD184+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso no nascimento (gramas)	42	-0,310	0,046
Apgar 5 min	42	-0,328	0,034
CD45-CD44+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	0,383	0,014
CD45-CD44+CD29+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Peso da Placenta (em gramas)	39	0,315	0,051
CD45-CD29+CD146+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	-0,430	0,005
CD45-CD29+STRO-1+(%)			
	N	Correlação de Spearman (r)	Valor P
Apgar 5 min	41	-0,339	0,037

Na análise estatística comparativa foram consideradas as variáveis descritas na Tabela 6. Não houve diferença significativa para quantidade de células CD34/ μ L entre os grupos em relação à idade gestacional, sexo do RN, tipo de parto, fumo, álcool, medicação e pré-eclampsia (Tabela 6). Em relação ao conteúdo de CNT, foram achadas diferenças entre os grupos para idade gestacional ($p = 0,022$) e sexo do RN ($p = 0,012$). Também houve diferença para a idade gestacional e o conteúdo de células-tronco hematopoéticas CD45⁺CD34⁺CD133⁺ ($p = 0,056$) e CD45⁺CD34⁺CD184⁺ ($p = 0,003$), e de células-tronco não hematopoéticas CD45-CD44+ ($p = 0,040$) e CD45⁻CD44⁺29⁺ ($p = 0,057$). Da mesma forma, foi achada diferença entre os grupos entre pré-eclampsia e CTH CD45⁺CD34⁺CD117⁺ ($p = 0,031$) e células-tronco não hematopoéticas CD45-CD44+ ($p = 0,051$).

Tabela 6 - Desfecho não ajustado – Mann-Whitney

	Mediana		M-W	P
Idade gestacional				
	IG < 37 sem	IG > ou = 37 sem		
CD34+ (cells/ μ L)	63,37	55,42	242	0,348
CD45+CD34+CD133+(%)	100,00	91,92	132	0,056
CD45+CD34+CD184+(%)	35,35	5,89	102,5	0,003
CD45-CD44+ (%)	0,31	1,83	129	0,040
CNT	9,78	13,57	106	0,022
Sexo do RN				
	Masculino	Feminino		
CD34+ (cells/ μ L)	51,81	63,60	242	0,343
CNT	10,10	13,83	100	0,012
Tipo de parto				
	vaginal	cesariano		
CD34+ (cells/ μ L)	54,13	63,49	264	0,738
CD45+CD34+CD184-(%)	93,78	77,89	135	0,047
CNT	14,42	10,81	129	0,116
Pré-eclampsia durante a gestação				
	Sim	Não		
CD45+CD34+CD117+(%)	39,37	76,54	14	0,031
CD45-CD44+ (%)	0,06	0,87	18	0,051

Discussão

O presente estudo determinou o perfil imunofenotípico do SCUP de RN nascidos entre 24 a 40 semanas de idade gestacional, comparando o conteúdo de CT entre pré-termos e a termo, bem como avaliou a influência e a associação de fatores maternos, neonatais e perinatais com o conteúdo celular do SCUP. Foi observada uma grande heterogeneidade no conteúdo e na quantidade de CT nas amostras de SCUP estudadas. Não houve influência de nenhuma das características maternas, placentárias e neonatais na quantidade de células CD34+ por microlitro assim como para o percentual das mesmas. Entretanto, pode-se observar a influência do peso ao nascimento, idade gestacional, volume de SCUP coletado e comprimento do cordão na quantidade de CNT. Além disso, também foi encontrada diferença entre RN pré-termo e a termo para a quantidade de CNT e algumas subpopulações de CTH e CT não hematopoéticas. Outro achado interessante do presente estudo foi a possível influência do *stress* fetal (Apgar e pré-eclampsia) em algumas subpopulações de CT.

Muitos estudos similares vêm demonstrando a influência de fatores maternos e obstétricos no conteúdo do SCUP, como idade gestacional, peso da placenta, peso ao nascimento, sexo do RN, entre outros. Porém, os achados são diversos e nem sempre concordantes.

A diversidade de resultados encontrados entre nossos resultados e de outros autores em relação à quantificação de CTH e as possíveis correlações com parâmetros celulares e fisiológicos podem ser explicados por vários fatores. A quantificação de células CD34+ sem a utilização da marcação de viabilidade realizada por outros estudos, o uso de sangue total (não separando somente a fração mononuclear) e a dificuldade em quantificar eventos raros poderiam explicar tais diferenças em relação aos outros estudos. Além disso, fatores técnicos e metodológicos em relação à coleta e ao processamento das amostras e, até mesmo, variações fisiológicas individuais também poderiam afetar os resultados.

A grande variabilidade interindividual encontrada na análise das amostras de SCUP também já havia sido relatada por outros investigadores, principalmente, para a população de CTH (NARDI *et al.*, 1999; PRANKE *et al.*; 2001; WATT *et al.*, 2005). Da mesma forma, a diferença na quantificação das CT no SCUP pode ser explicada pela própria heterogeneidade das células do SCUP, por características relacionadas à gestação e ao parto, e pela diferença entre as técnicas de coleta de SCUP e de metodologia de quantificação do mesmo. Também podemos observar uma variabilidade entre as características maternas e neonatais (Tabela 3), assim como entre as variáveis placentárias, o que pode ser explicado pela população estudada de RN nascidos entre 24 a 40 semanas de idade gestacional. Na maioria dos estudos descritos na literatura, a população estudada é composta por RN a termo, saudáveis, sem intercorrências durante a gestação e sem complicações no parto.

No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa na concentração de CD34+ entre as amostras de SCUP de RN pré-termos e a termo ($p > 0,05$), embora algumas investigações

relatem que a concentração de CD34+ no SCUP esteja correlacionada com a idade gestacional. A quantidade de células CD34+ por microlitro também não apresentou correlação significativa com fatores maternos (idade materna, número de gestações), neonatais (idade gestacional, peso ao nascimento, Apgar) ou perinatais (peso da placenta, volume de SCUP coletado, comprimento do cordão). Da mesma forma, não houve associação significativa entre a percentagem de células CD34+ e tais fatores. O conteúdo de CD34+ tem sido associado com a “pega” de transplante e sobrevida dos pacientes transplantados com SCUP, por ser um fator importante na reconstituição hematopoética pós-transplante. Existem evidências de que, embora a frequência da população de células CD34+ seja um indicador confiável do potencial progenitor de SCUP, esta é heterogênea por natureza (YAP *et al.*, 2000). Por outro lado, essa heterogeneidade pode refletir nas diferenças de sensibilidade de metodologias empregadas para a quantificação de CT por diferentes investigadores (PRANKE *et al.*, 2005). Outra explicação para diferenças encontradas entre nossos achados e de outros estudos é a forma de coleta: se a coleta é realizada antes ou depois da retirada da placenta. Nesse estudo a coleta foi realizada após a retirada da placenta do útero (como é preconizado nos bancos públicos de SCUP) para não influenciar no parto. Porém sabe-se que a coleta realizada antes da retirada da placenta deve aumentar o volume de SCUP (conseqüentemente o número de CTH) por que a contração uterina favorece a coleta.

Devido a não diferença na concentração de células CD34+ entre os grupos de idade gestacional e ao fato do menor volume de SCUP de RN pré-termos, a utilidade de unidades de SCUP desse grupo não seria suficiente para um receptor de > 10 Kg de peso segundo as recomendações atuais (GLUCKMAN *et al.*, 2004).

Dentre as variáveis mais aceitas como critério de seleção e armazenamento de unidades em bancos de SCUP está o número de CNT, baseado nos dados de sucesso de transplante de SCUP e sobrevida dos pacientes (MIGLIACCIO *et al.*, 2000; AROVIITA *et al.*, 2004). Em nosso estudo, o

conteúdo de CNT apresentou uma correlação positiva significativa com idade gestacional ($r = 0,39$; $p = 0,012$), peso ao nascimento ($r = 0,403$; $p = 0,011$), volume de SCUP coletado ($r = 0,388$; $p = 0,019$) e comprimento do cordão ($r = 0,384$; $p = 0,019$). Também foi demonstrado que RN a termo e do sexo feminino apresentaram maior quantidade de CNT, confirmando os achados de Ballen (2000) e Omori (2010) em relação à maior idade gestacional e de Nagawa (2004) e McGuckin (2007) para o sexo feminino.

As CTH CD34+CD133+ e CD34+CD184+ foram encontradas em maior proporção em SCUP de RN pré-termos, enquanto que para a maioria das CTH não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Em relação às CT não hematopoéticas, o SCUP de RN a termo apresentaram níveis maiores de células CD45-CD44+.

As células CD34+CD133+ correspondem a uma população de CTH mais primitiva e sua função pode estar relacionada à comunicação célula-célula e ao ancoramento das células ao endotélio da medula óssea (McGUCKIN *et al.*, 2003). Apesar de termos encontrado maior quantidade dessa subpopulação em RN pré-termos, um estudo anterior não achou diferença estatística significativa entre os grupos de idade gestacional (CERVERA *et al.*, 2006). As células CD34+CD184+ têm um papel importante na migração e *homing* das CTH (BURGER *et al.*, 2003), indicando sua capacidade regenerativa. Já foi demonstrado que o potencial de *homing* é maior em RN a termo, entretanto, a proporção encontrada para essa subpopulação foi maior em RN pré-termos. O ambiente fetal possivelmente pode influenciar a concentração encontrada das diferentes subpopulações celulares. A diferença encontrada em relação a outros estudos pode ser explicada pelo fato da população estudada ser bastante ampla em termos de idade gestacional (RN entre 24 a 40 semanas). Conseqüentemente, a transição da hematopoese hepática para a medula óssea durante a gestação teria grande influência sobre esses achados.

Nesse estudo, o *stress* fetal pode ser sugerido como um possível causador do aumento de CT no SCUP, o que poderia estar relacionado ao reparo de lesão vascular. Foram encontradas correlações significativas do Apgar no 5º minuto com a percentagem de células CD34+CD38- ($r = 0,309$; $p = 0,044$), CD34+CD184+ ($r = -0,328$; $p = 0,034$), CD45-CD44+ ($r = 0,380$; $p = 0,014$), CD45-CD29+CD146+ ($r = -0,430$; $p = 0,005$) e CD45-CD29+STR0-1+ ($r = -0,339$; $p = 0,037$), indicando uma possível influência do pH da artéria umbilical no conteúdo desses marcadores. Além disso, foi demonstrado que na ausência de pré-eclampsia durante a gestação há maiores níveis de células CD45-CD44+ e CD34+CD117+. Foram encontradas algumas limitações durante a realização do estudo, tais como questão logística e de obtenção de amostras de SCUP de RN pré-termos, podendo refletir em nossos achados. Houve dificuldade de conseguir tais amostras, pois não há como prever o nascimento de tais crianças, as quais, geralmente, tratam-se de casos de urgência e com maior mortalidade, acarretando em perdas dessa população. Além disso, o SCUP de RN pré-termos coagula com uma facilidade maior do que RN a termo, o que inviabiliza seu processamento em pouco volume coletado. A proposta inicial era coletar um número de amostras maior e comparar 3 grupos de idade gestacional. Entretanto a dificuldade de se obter RN pré-termos, principalmente menores do que 30 semanas de idade gestacional, fez com que coletássemos menos amostras do que o previsto e dividíssemos os grupos em 2. Esse fato também pode ter influenciado nossos resultados. Por outro lado, o desenho do estudo foi feito para representar a realidade dos bancos públicos de cordão na coleta e seleção de SCUP, diferente da maioria dos estudos encontrados na literatura. Usamos amostras frescas, de sangue total (sem a separação da fração de células mononucleares), a coleta foi realizada pós-retirada da placenta e a análise foi realizada com marcador de viabilidade e dentro de 24 horas pós-coleta. O objetivo desse estudo foi demonstrar o perfil imunofenotípico do SCUP de RN de diferentes idades gestacionais para justificar o armazenamento de material oriundo de RN pré-termos, que apesar do menor volume coletado, teria

uma concentração maior de CT. Apesar de não ter sido comprovado a hipótese do estudo, os resultados indicam a associação negativa entre CD34+ e idade gestacional. No entanto, seria importante ressaltar que a ausência do grupo de idade gestacional com menos de 30 semanas e o pequeno tamanho amostral, provavelmente, tendem a subestimar o efeito proposto. Além disso, sabe-se que os estudos disponíveis sobre o assunto são inconclusivos e controversos e seriam necessárias mais investigações sobre o tema. Outro fato importante que o estudo mostra, é a necessidade de estabelecer uma metodologia padrão para a dosagem das CTH. Uma vez que o número de CTH é um dos critérios mais importante para a pega do enxerto e sucesso do transplante, a dosagem dessas células, através da citometria de fluxo, deve ser realizada sempre usando-se controles isotípicos, bem como marcador de viabilidade, tal como o 7AAD, cuidados esses nem sempre observados nos laboratórios de imunofenotipagem.

A importância do SCUP, assim como o melhor conhecimento de seu conteúdo celular, tem aumentado significativamente nos últimos anos como fonte de pesquisa clínica e científica. Estudos vêm demonstrando que tanto o conteúdo e a qualidade de unidades de SCUP podem ser influenciados por fatores fisiológicos referentes à mãe, gestação e ao neonato. Entretanto, alguns achados têm sido bastante controversos e inconclusivos. Portanto, se fazem necessários mais estudos nessa área a fim de se estabelecer critérios bem definidos para a seleção de unidades ótimas de SCUP. Nosso estudo não encontrou associações significativas que justificassem a influência de variáveis maternas e obstétricas na quantidade de células CD34+ no SCUP e nem diferença entre as diferentes idades gestacionais. Em contrapartida, para CNT foram encontradas algumas associações e a diferença entre RN pré-termos e a termo. Nossos resultados corroboram com a justificativa do não armazenamento de unidades oriundas de RN pré-termos.

Referências

1. Aroviita P, Teramo K, Hiilesmaa V, Westman P, Kekomäki R. Birthweight of full-term infants is associated with cord blood CD34⁺ cell concentration. *Acta Paediatrica*. 2004; 93(10): 1323-9.
2. Ballen KK, Wilson M, Wu J, Ceredana AM, Hsieh C, Stewart FM, Popovsky MA, Quesenberry PJ. Bigger is better: maternal and neonatal predictor of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplantation*. 2001;27: 7-14.
3. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Minisini AM, Spizzo R, et al. Increased blood volume and CD34⁺CD38⁻ progenitor cell recovery using novel umbilical cord blood collection system. *Stem Cells*. 2000;18: 245-51.
4. Brocklebank A, Sparrow R. Enumeration of CD34⁺ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 2001; 46: 254-61.
5. Burger J, Spoo A, Dwenger A, Burger M, Behringer D. CXCR4 chemokine receptors (CD184) and α4β1 integrins mediate spontaneous migration of human CD34⁺ progenitors and acute myeloid leukaemia cells beneath marrow stromal cells (pseudoemperipolesis). *British Journal of Haematology*. 2003;122: 579-89.
6. Canabarro R, Sporleder H, Gomes T, Zanatta G, Scriebel L, Freitas F, Neumann J, Pranke P. Immunophenotypic evaluation, and physiological and laboratory correlations of hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. *Biocell*. 2007; 31(3): 397-403.
7. Cervera A, Lillo R, García-Sánchez F, Madero L, Madero R, Vicario J. Flow cytometric assessment of hematopoietic cell subsets in cryopreserved preterm and term cord blood, influence of obstetrical parameters, and availability for transplantation. *American Journal of Hematology*. 2006;18: 397-410.
8. 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*. 1999;14: 520-525.
9. De Bruyn C, Delforge A, Bron D, Bernier M, Massy M, Ley P, De 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*. 1995;13: 281-8.
10. Gasparoni A, Ciadella L, Avanzini M A, 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*. 2000;47: 825-829.
11. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17): 1174-8.

12. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol*. 2004;32: 397–407.
13. Ishikawa F, Livingston AG, Minamiguchi H, Wingard JR, Ogawa M. Human cord blood long-term engrafting cells are CD34⁺ CD38⁻. *Leukemia*. 2003;17: 960-4.
14. 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*. 2000; 28: 1174-80.
15. Jones J, Stevens CE, Rubinstein P, Robertazzi RR, Kerr A, Cabbad MF. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188: 503-9.
16. Juutistanaho S, Eskola M, Sainio S, Aranko K, Kekomäki R. Association of stress-related reinatal factors and Cord blood unit hematopoietic progenitores is dependent on delivery mode. *Transfusion*. 2010;50 : 663-71.
17. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May SW. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87: 1-13.
18. 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*. 2001;33: 1766-18.
19. 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. *Eur J Haematol* 2003;71:341–50.
20. McGuckin CP, Basford C, Hanger K, Habibollah, Forraz N. Cord blood revelations—The importance of being a first born girl, big, on time and to a young mother! *Early Human Development*. 2007;83(12):733–41.
21. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000;96: 2717-22.
22. Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuya H, Kaneko M, Watanabe H, Okamoto Y, Kuroda Y, Nakamaya T. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34⁺ cell yield for cord blood banking. *Transfusion*. 2004;44: 262-7.
23. Nakajima M, Ueda T, Migita M, Oue Y, Shima Y, Shimada T, Fukunaga Y. Hematopoietic capacity of preterm Cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochemical and biophysical Research Communications*. 2009;389: 290-4.

24. Nardi N, Alfonso Z. The hematopoietic stroma. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999;32: 601-9.
25. Okamoto KO, Campos AH. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. *Einstein*. 2004;2(4): 355-8.
26. Omori A, Takahashi K, Hazawa M, Misaki N, Ohba H, Manabe M, Sato H, Kudo K, Takahashi TA, Kashiwakura I. Maternal and neonatal factors associated with the high yield of mononuclear low-density/CD34⁺ cells from placental umbilical cord blood. *Tohoku J Exp Med*. 2008;215: 23-32.
27. Pranke P, Failace RR, Allebrandt WF, Steibe, G, Schmidt F, Nardi NB. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. *Acta Haematologica*. 2001;105: 71-6..
28. Pranke P, Hendrikx J, Debnath G, Alespeiti G, Rubinstein P, Nard, N, Visser JWM. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2005;38: 1775-89.
29. Surbek D, Holzgreve W, Jansen W, Heim D, Garritsen H, Nissen C, Wodnar-Filipowicz A. Quantitative immunophenotypic characterization, cryopreservation, and enrichment of second- and third-trimester human fetal cord blood hematopoietic stem cells (progenitor cells). *Am J Obstet Gynecol*. 1998;179:1228-33.
30. Surbek DV, Holzgreve W, Steinmann C, Hahn S, Gratwohl A, Wodnar-Filipowicz A, Tichelli A. Preterm birth and the availability of cord blood for HPC transplantation. *Transfusion*. 2000;40: 817-20.
31. Sutherland DR, Stewart AK, Keating A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications. *Stem Cells*. 1993;11(3): 50-7.
32. Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of Stem Cells from Diverse Origin. *Cytometry*. 2010;77(Pt A): 6–10.
33. 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*. 1998;22 Suppl 1: 61-2.
34. Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: umbilical cord blood and its stem cell potential. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2005;10: 209-20.
35. Wyrsh A, Dalle Carbonare V, Jansen W, Chklovskaja E, Nissen C, Surbek D, Holzgreve W, Tichelli A, Wodnar-Filipowicz A. Umbilical cord blood from preterm human fetuses is rich in committed and primitive hematopoietic progenitors with high proliferative and self-renewal capacity. *Experimental Hematology*. 1999;27: 1338 – 45.

36. Yamaguchi M, Hirayama F, Kanai M, Sato N, Fukazawa K, Yamashita K, Sawada K, Koike T, Kuwabara M, Ikeda H, Ikebuchi K. Serum-free coculture for ex-vivo expansion of human cord blood primitive progenitors and SCID mouse-reconstituting cells using human bone marrow primary stromal cells. *Experimental Hematology*. 2001;29: 174-82.
37. 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*. 2000;50: 258-259.

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**CONSENTIMENTO PARA DOAÇÃO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL PARA REALIZAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA:**

“Perfil imunofenotípico comparativo do sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo”.

A - PROPOSTA DO PROGRAMA:

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa **“Perfil imunofenotípico comparativo do sangue de cordão umbilical de neonatos pré-termos e nascidos a termo”.**

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 está preste a dar a luz a um bebê e o sangue da placenta será guardado, ao invés de desprezado. A coleta ocorrerá após o nascimento do seu bebê e não 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-tronco do sangue de cordão umbilical para pacientes que necessitam de um transplante de células-tronco. O maior conhecimento em relação ao 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, 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 comparativo do sangue de cordão umbilical de neonatos prematuros e nascidos a termo**” 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 oferecida 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.

Nome do Pesquisador Responsável: Marcelo Zubaran Goldani
Telefones de contato: 3359 8515 e 99825070
E-mail: mgoldani@hcpa.ufrgs.br

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

Número:

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

Anexo 2- Protocolo de Coleta de Sangue de Cordão Umbilical

PROTOCOLO PARA A COLETA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL**I- Identificação da ficha**

I.1- Número de ordem	I1Ordem
I.2- Nome da mãe:	
I.3- Número do prontuário	I3Nupron
I.4- Idade cronológica:	I4Idcrono
I.5- Idade corrigida:	I5Idcorrigi
I.6- Hora dos nascimento:	
I.7- Data da Coleta:	
I.8-Local de Coleta:	
I.9- Endereço:	
I.10- Telefone:	I.11- Celular:

II- História obstétrica

II.1- Número de gestações	II1Ngest
II.2- Número de abortos (88)nsa (99)Ign	II2Nabort
II.3- Número de recém-nascidos vivos considerando a gestação atual (88) nsa (99)Ign	II3Nfilh

III- Dados relativos à gestação

III.1- Duração da gestação conforme DUM (em semanas) (88) nsa (99)Ign	III1Dgestdum
III 2- Duração da gestação conforme Ultrassom (em semanas) (88) nsa (99)Ign	III2Dgestus
III.3- Fez pré-natal (0) não (1) sim (9) Ign	III3Prna
III.4- Idade gestacional da primeira consulta de pré-natal (em semanas) (88) não sabe (99) Ign	III4Prco
III.5- Número de consultas (88) não sabe (99) Ign	III5Ncon
III. 6- Fez uso de medicação durante a gestação (0) não (1) sim (8) não sabe (9) Ign Se afirmativo: Tipo de medicação Dose Como tomou Por quanto tempo usou a medicação	III6Medg

III.7- Apresenta(ou) diabetes (0) não apresentou (1) gestacional (2) não gestacional (8) não sabe (9) Ign	III7Diab
III.8- Foi diagnosticado pré-eclâmpsia durante a gestação (0) não (1) sim (8) não sabe (9) Ign	III8Prec
III.9- Apresenta(ou) HAS (0) não apresentou (1) sim (8) não sabe (9) Ign	III9HAS ↑
III.10- Apresentou infecção urinária durante a gestação (0) não apresentou (1) sim (8) não sabe (9) Ign	III10ITU ↑
III.11- Apresentou infecção ovular (0) não apresentou (1) sim (8) não sabe (9) Ign	III11Inf ↑
III.12- Infecções durante a gestação (0) não apresentou (1) citomegalovírus (2) rubéola (3) sífilis (4) toxoplasmose (5) HIV (6) herpes simples (7)outra. Qual?..... (8) não sabe (9) Ign	III12CRS ↑ Obs: Qual ⇒ III11CRQ

IV- Dados relativos ao parto

IV.1- Idade da mãe (anos) (99) Ign	IV2Idmãe ïï
IV.2-Tipo de parto (1) vaginal (2) cesariano (3) fórceps (9) Ign	IV3Tipar ↑
IV.3- Tempo de bolsa rota (em horas) (00) não rompeu (99) Ign	IV4Tbrot ïï

V- Dados relativos ao recém-nascido

V.2- Sexo (1) masculino (2) feminino	V2Gênero
V.3- Peso no nascimento (em gramas)	V3Peso
V.4- Comprimento (em cm)	V4Comp
V.5- Perímetro cefálico	V5PC
V.6- Apgar 1º minuto (99) se não tem Apgar de 1º minuto	V6Apg1
V.7- Apgar 5º minuto (99) se não tem Apgar de 5º minuto	V7Apg5
V.8- Apgar 10º minuto (99) se não tem Apgar de 10º minuto	V8Apg10
V.9- Ballard (99)-(99) se não tem Ballard	V9Ballar
V.10- Capurro (99,9) semanas dias/7	V10Capur
V.11-Idade gestacional conforme Ultrassom até 24 semanas	

VI- Dados do Cordão

VI.1- Peso da Placenta (em gramas)	VII1Peso
VI.2- Comprimento do Cordão (em cm)	VII2Comp
VI.3- Peso da Bolsa antes da coleta (em gramas)	VII3Pesoant
VI.4- Peso da Bolsa após coleta (em gramas)	VII4Pesopos
VI.5- Volume coletado calculado (em cm ³)	VII5Volcalc
VI.6- Volume real coletado (em cm ³)	VII6Volreal

VII- Dados da história familiar

VII.1- Presença de irmãos com baixo peso ao nascimento (0) não (1) sim (8) não sabe (9) Ign	VII1IBPN
VII.2- Alguma criança da família com atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (0) não (1) sim (8) não sabe (9) Ign	VII2DNPM
VII.3- Alguém da família com malformação congênita (0) não (1) sim (8) não sabe (9) Ign	VII3Macg

VIII- Dados relativos à mãe

VIII.1- Situação conjugal (1) com companheiro no lar (2) com companheiro fora do lar (3) sem companheiro (9) Ign	VIII1Sco
VIII.2- Escolaridade materna (1) não escolarizada (2) 1º grau incompleto (3) 1º grau completo (4) 2º grau incompleto (5) 2º grau completo (6) superior incompleto (7) superior completo (9) Ign	VIII2Emã
VIII.3- Fumou toda a gestação (1) sim (2) não (3) parou de fumar durante (9) Ign	VIII3Fum

VIII.4- Se parou de fumar durante, em que período parou (0) não fumou (1) 1º trimestre (2) 2º trimestre (3) 3º trimestre (4) não parou (8) não sabe (9) Ign	VIII4Fup
VIII.5- Número de cigarros diários durante a gestação (0) não fumou (1) até 10 (2) 11-20 (3) >20 (8) não sabe (9) Ign	VIII5Nci
VIII.6- Consumo de álcool durante a gestação (1) sim (2) não (3) parou de consumir álcool durante (9) Ign	VIII6Alco

IX- Dados relativos à renda

IX.1- Número de pessoas na casa	IX1Npess
IX.2- Renda familiar (em reais)	IX2Renda
IX.3- Renda em salários mínimos	IX3Rsm
IX.4- Renda per capita (em salários mínimos)	IX4Rpcap

PROTOCOLO DE CITOMETRIA

Sangue de cordão Umbilical e Placentário (SCUP)

AVALIAÇÃO QUALITATIVA

Materiais e Reagentes

- SCUP (1,5 mL)
- PBS
- Anticorpos
- 7AAD
- Estante
- Tubos para citometria
- Falcon de 15mL
- Pipetas
- Micropipetas
- Descarte

Soluções

a) 7AAD

Solução Mãe	Solução de Uso [10x]	Solução Final
1000 μ g/1000 μ L	200 μ g/1000 μ L	1 μ g/1000 μ L

SOLUÇÃO DE USO		
TUBOS	Solução Mãe	PBS
20 (1 amostra)	20 μ L	80 μ L
40 (2 amostras)	40 μ L	160 μ L
60 (3 amostras)	60 μ L	240 μ L

Solução de Células	Solução de Uso do 7AAD
1000 μ L	5 μ L

b) Células e Anticorpos

1. Pipetar 50 μL de SCUP
2. Acrescentar os anticorpos, sendo 5 μL de cada por tubo
3. Incubar por 20-30' à 25°C no escuro (ou pode ser dentro da geladeira)
4. Acrescentar 950 μL de solução de lise - Quick Lysis
5. Incubar por 15' na temperatura ambiente no escuro
6. Acrescentar, 15 minutos antes da leitura, 5 μL da Solução de Uso 7AAD
7. Não lavar
8. Sempre passar o tubo no vórtex antes da leitura no Citômetro

COMBINAÇÕES ANTICORPOS CITOMETRIA

TUBOS	Amostra	FITC	PE	APC	7AAD
01	Células				
02	Células	HLA-DR			
03	Células		CD38		
04	Células			CD45	
05	Células				7AAD
06	Células	Controle	Controle		7AAD
07	Células			Controle	7AAD
08	Células	CD38	CD34	CD45	7AAD
09	Células	HLA-DR	CD34	CD45	7AAD
10	Células	CD44	CD34	CD45	7AAD
12	Células	CD34	CD29	CD45	7AAD
13	Células	CD34	CD117	CD45	7AAD
14	Células	CD34	CD133	CD45	7AAD
15	Células	CD34	CD184	CD45	7AAD
16	Células	CD44	CD29	CD45	7AAD
17	Células	CD44	CD133	CD45	7AAD
18	Células	CD44	CD184	CD45	7AAD
20	Células	Mel CAM	CD29	CD45	7AAD
21	Células	Stro1	CD29	CD45	7AAD

AVALIAÇÃO QUANTITATIVA

PROTOCOLO ISHAGE

Materiais e Reagentes

- SCUP (0,3 mL)
- PBS
- Anticorpos
- 7AAD
- 2 Tubos TRUCOUNT
- Estante
- Micropipetas
- Descarte

*** volume de SCUP por tubo: 100 μ L

*** número de células para adquirir: 200.000 eventos de CD45+
(ou conforme estabelecido no protocolo)

Soluções

a) **7AAD** - da solução mãe - pipetar 2 μ L direto no tubo

b) **Células e Anticorpos**

1. Usar 2 tubos Trucount, para fazer em duplicatada:
2. Pipetar 100 μ L de SCUP em cada tubo
3. Acrescentar os anticorpos, sendo 5 μ L de cada por tubo
(CD45 FITC + CD34 PE)
4. Incubar por 20-30' na temperatura ambiente no escuro
5. Acrescentar 2 mL de solução de lise - Quick Lysis
6. Incubar por 15' na temperatura ambiente no escuro
7. Acrescentar, 15 minutos antes da leitura, 2 μ L da Solução Mãe de 7AAD
8. Não lavar
9. Sempre passar o tubo no vórtex antes da leitura no Citômetro

Anexo 4 – Análises por citometria

Figura 1 – Análise Quantitativa de Células CD34+ - ISHAGE

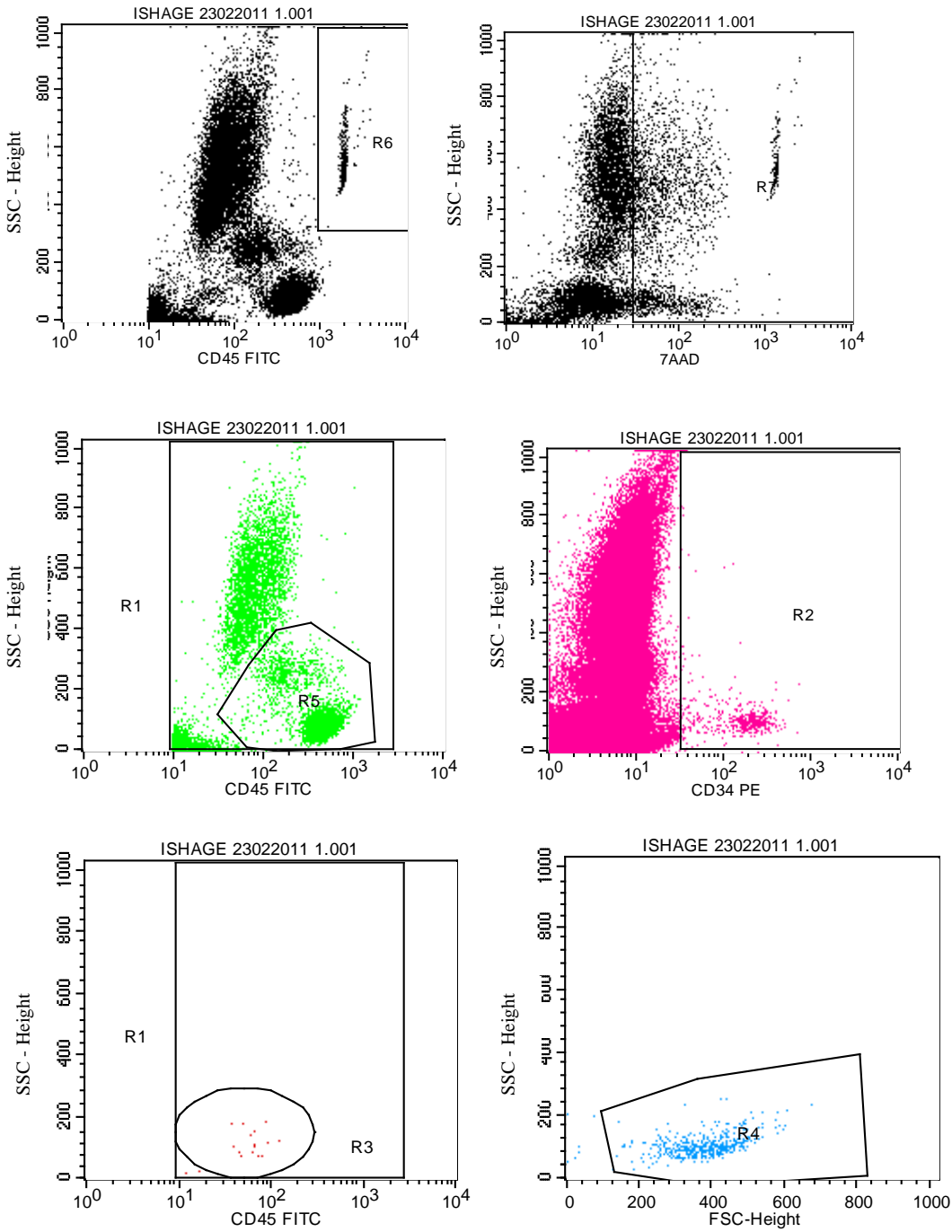
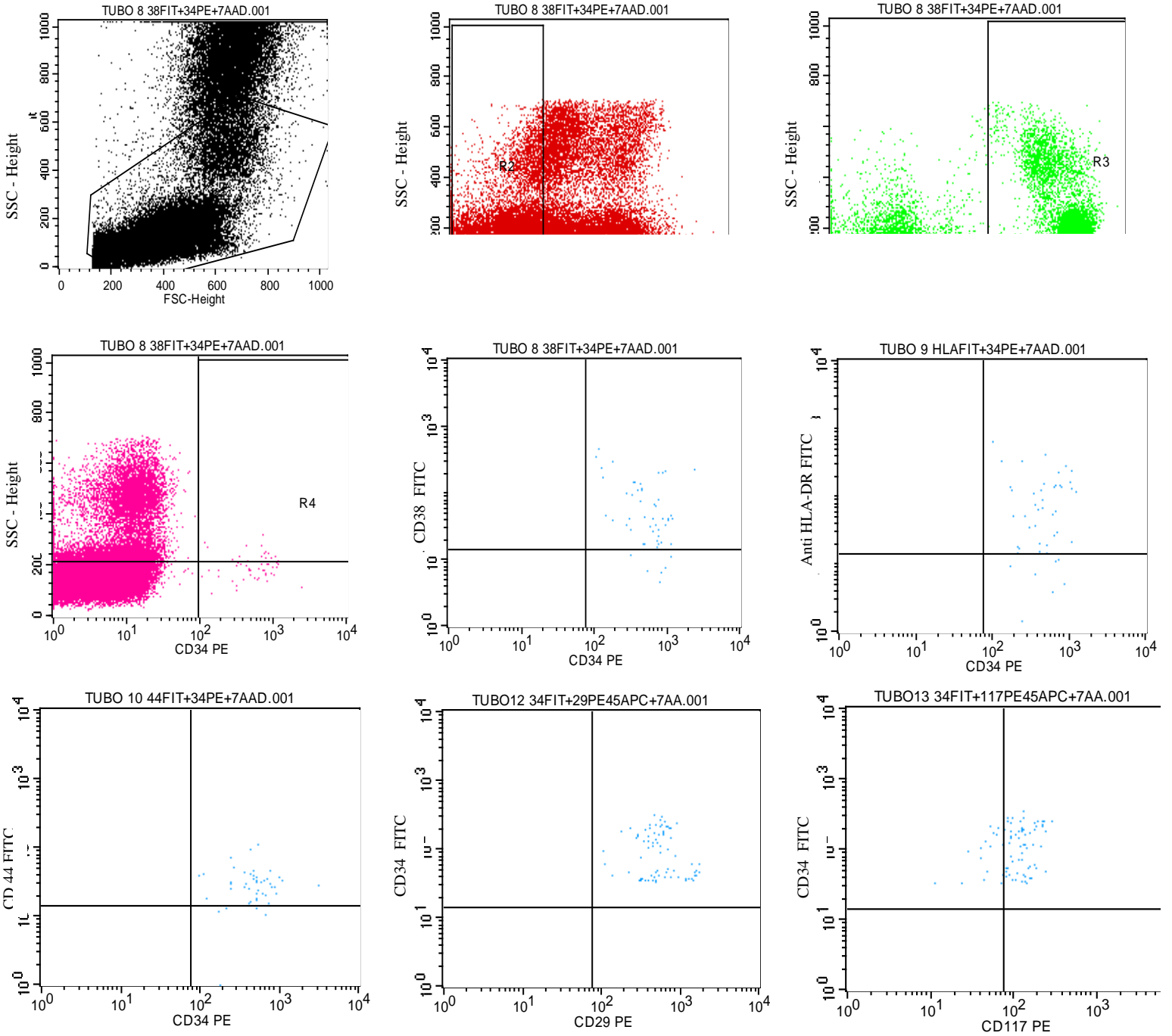


Figura 2 – Análise Imunofenotípica das células 7AAD⁻CD45⁺CD34⁺



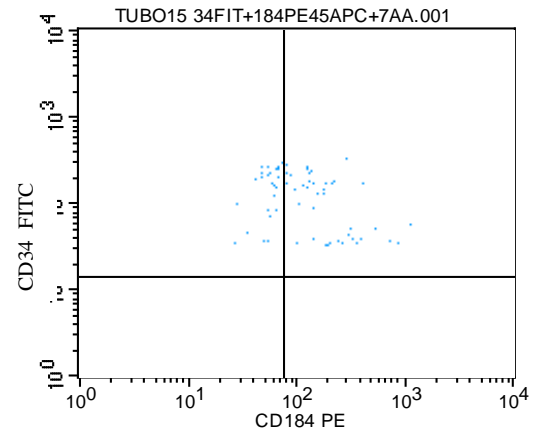
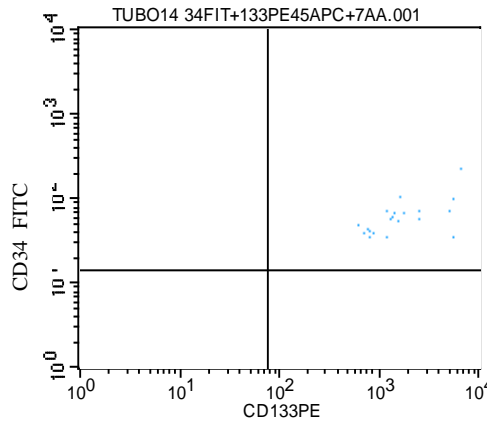
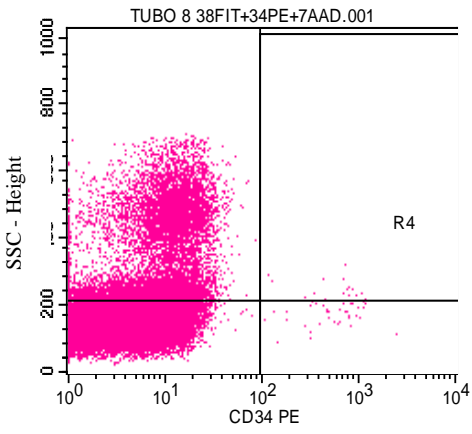
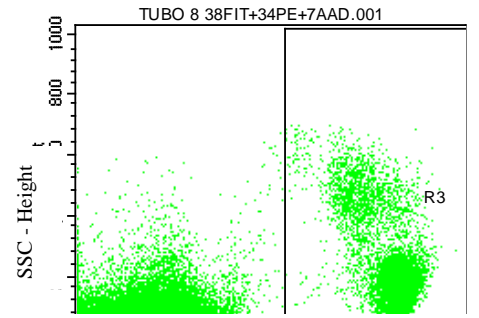
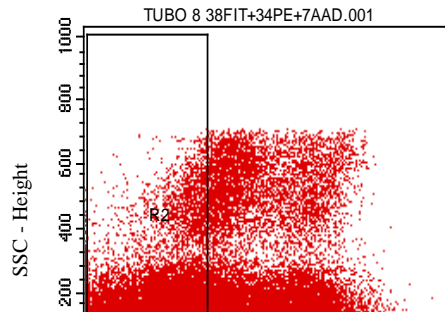
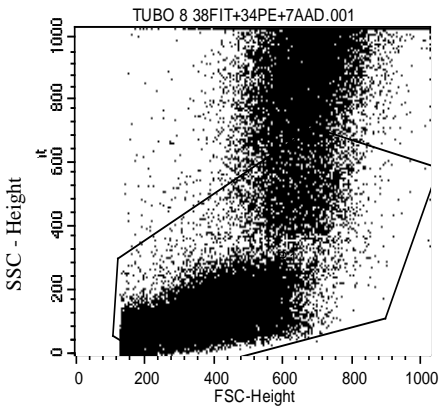


Figura 3 – Análise Imunofenotípica das Células 7AAD⁻CD45⁻CD44⁺

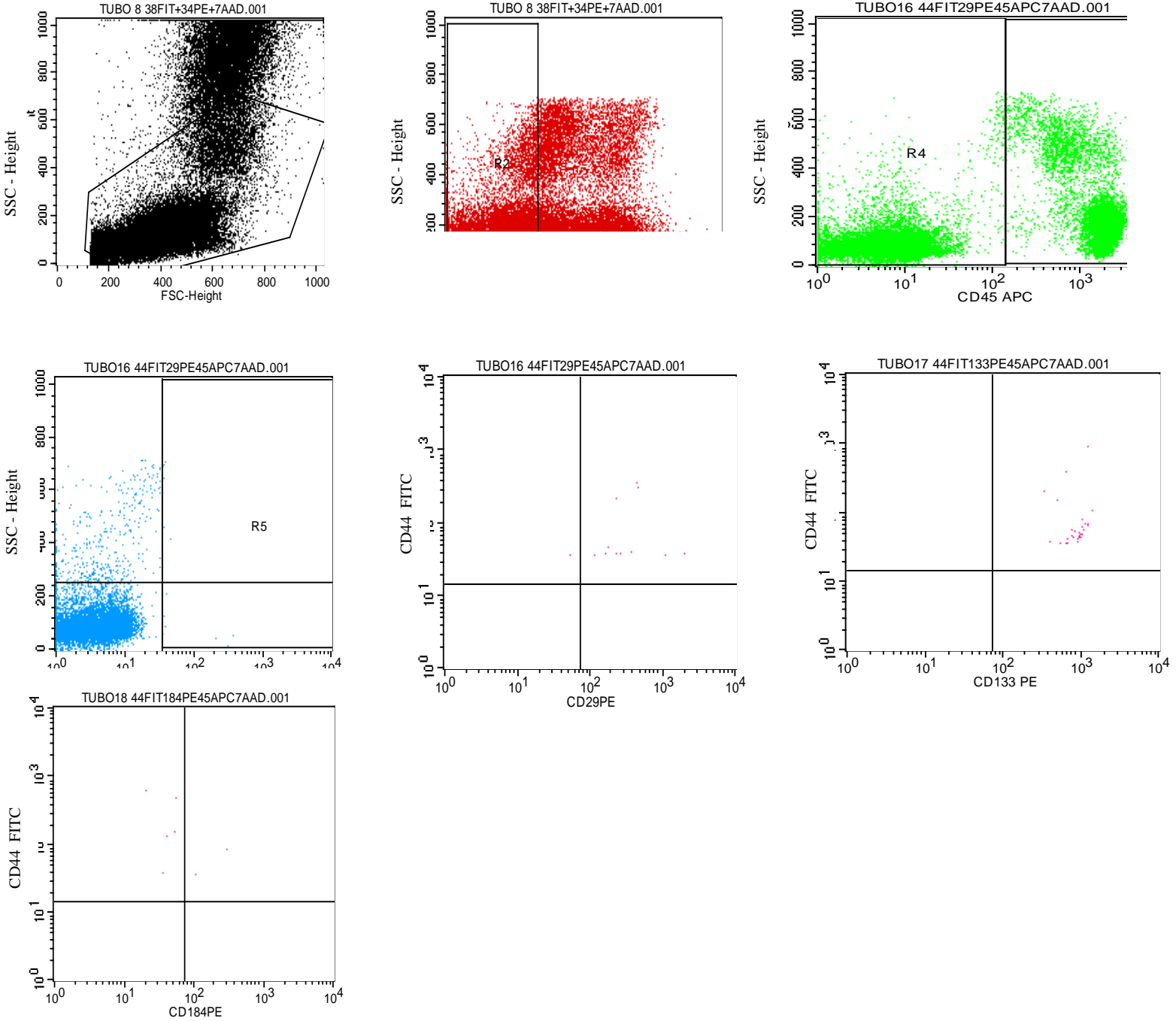


Figura 4 – Análise Imunofenotípica das Células 7AAD⁻CD45⁻CD29⁺

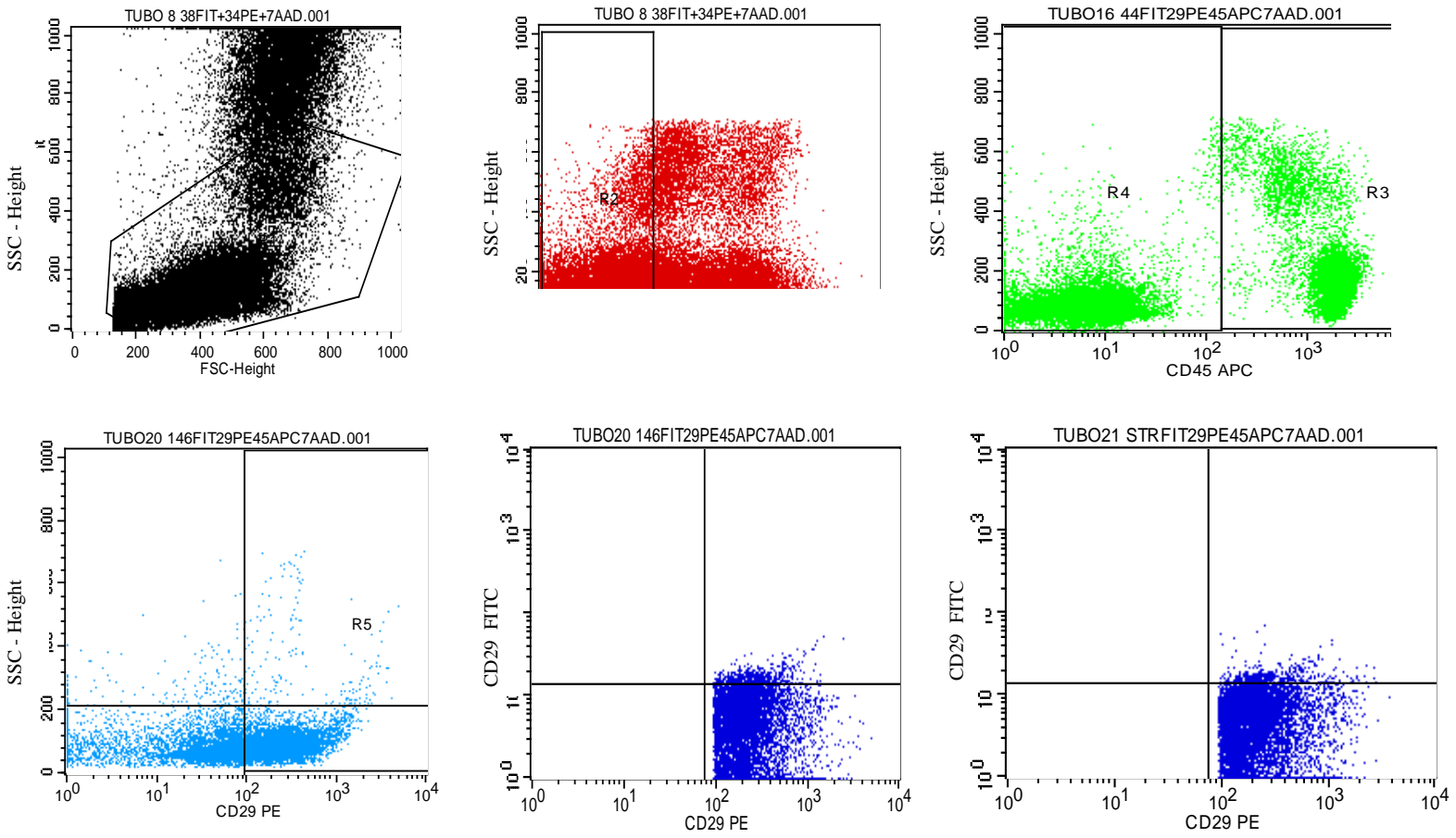


Figura 5 – Ajustes e Controles

