

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL
EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

JANETE LOURDES CATTANI BALDISSERA

**Avaliação das diferentes metodologias de realização do ensaio clonogênico
e validação do método de criopreservação e ressuspensão do sangue
de cordão umbilical e placentário criopreservado**

Ribeirão Preto - 2015

JANETE LOURDES CATTANI BALDISSERA

Avaliação das diferentes metodologias de realização do ensaio clonogênico e validação do método de criopreservação e ressuspensão do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientador: Prof. Dra. Karen de Lima Prata

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”.

Ribeirão Preto - 2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Baldissera, Janete Lourdes Cattani.

Avaliação das diferentes metodologias de realização do ensaio clonogênico e validação do método de criopreservação e ressuspensão do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado / Janete Lourdes Cattani Baldissera; Orientadora: Prof. Dra. Karen de Lima Prata. Ribeirão Preto, 2015.

78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

1. Validação.
2. Sangue de cordão umbilical e placentário.
3. Aldeído desidrogenase.
4. Células-tronco hematopoéticas.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: BALDISSERA, Janete Lourdes Cattani

Título: Avaliação das diferentes metodologias de realização do ensaio clonogênico e validação do método de criopreservação e ressuspensão do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu esposo e aos meus filhos pela paciência, carinho e apoio a mim dedicados a fim de que eu pudesse concluir mais este projeto. Também aos meus pais por serem eles a base da minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me dar forças para nunca desistir.

À amiga Prof. Dra. Karen de Lima Prata pela orientação valiosa e todo apoio e conhecimento transmitido.

Às colegas e amigas do laboratório de Criobiologia, Rute, Sirley, Sara e Susana pela paciência e companheirismo demonstrado nas contribuições ao estudo.

Aos colegas do laboratório de Marcadores celulares, Dra. Silvia, Dra. Maria Daniela Renata, Liziane, Anália, Robson, Adriana e Nicoli, pela análise da citometria de fluxo dos experimentos e pela compreensão e amizade nos momentos difíceis.

À Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados por ter criado oportunidade para que eu pudesse aprofundar os meus conhecimentos.

À direção do HEMOSC pelo incentivo.

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto por nos acolher e pelos ensinamentos teóricos e práticos recebidos de toda aquela equipe.

À Raquel Botelho por nos ouvir.

À minha amiga Jane por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas do Centro de Estudos do HEMOSC pelo apoio.

Aos colegas Dilney e Silvio pelo cuidado com os equipamentos do laboratório de Criobiologia.

Aos meus pais que me ensinaram a ter coragem e acreditar nos meus sonhos.

Ao meu esposo Antonio Paulo e aos meus filhos Paulo Victor e Fernanda pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos em que precisei ausentar-me para concluir este trabalho.

“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao tamanho
original”.

Albert Einstein

RESUMO

BALDISSERA, J.L.C. **Avaliação das diferentes metodologias de realização do ensaio clonogênico e validação do método de criopreservação e ressuspensão do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado.** 2015, 78 f. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) tem sido utilizado como fonte de células-tronco hematopoéticas (CTHs) para transplante. A qualidade desse produto pode ser afetada durante as várias etapas do seu processamento. Neste estudo, foi avaliada a melhor metodologia de preparo da amostra para a realização do ensaio clonogênico (pura, diluída ou lavada) e validado o método de criopreservação e de ressuspensão das bolsas de SCUP. Foi avaliada também a funcionalidade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) como método para determinar a função das CTHs do SCUP, em 15 unidades criopreservadas pelo Laboratório de Criobiologia e Terapia Celular do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC). As unidades foram descongeladas em quatro etapas. O conteúdo dos segmentos e da bolsa foi coletado e ressuspenso com solução de albumina 5%, ACD 5% e solução fisiológica. A suspensão celular obtida foi utilizada para realização do ensaio clonogênico, avaliação da viabilidade celular, quantificação das células nucleadas (CN), CD34⁺ e das ALDH^{br}. Os parâmetros tempo, custo e o resultado do ensaio clonogênico, utilizados para avaliar a metodologia, indicaram que a suspensão celular diluída é o melhor método a ser utilizado para a realização do ensaio clonogênico. A quantificação das CN e das células CD34⁺ totais pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento foi $8,3 (\pm 1,9) \times 10^8$ e $8,2 (\pm 2,0) \times 10^8$ ($p = 0,3388$) e $3,3 (\pm 2,7) \times 10^6$ e $3,2 (\pm 2,1) \times 10^6$ ($p = 0,4455$), respectivamente. A quantificação das CN e das células CD34⁺ viáveis pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento foi $8,1 (\pm 1,9)$ e $6,3 (\pm 1,7) \times 10^8$ ($p < 0,0001$) e $3,27 (\pm 2,0) \times 10^6$ e $2,8 (\pm 1,8) \times 10^6$ ($p = 0,0063$), respectivamente. A porcentagem de células nucleadas e CD34⁺ viáveis no segmento proximal e na bolsa de 20 mL foi, respectivamente, 66,3 ($\pm 11,8$) e 75 (35-93); 76,5 ($\pm 11,6$) e 89 (75-100). No ensaio clonogênico foi observado crescimento médio de 31,8 ($\pm 7,6$) unidades formadoras de colônias granulócito-macrófago (CFU-GM) $\times 10^5$ CN plaqueadas obtidas da bolsa pós-criopreservação/descongelamento. Não foi encontrada correlação entre as células ALDH^{br}/CD45⁺ viáveis e a quantificação das CFU-GM ou das células CD34⁺ viáveis da bolsa pós-criopreservação/descongelamento. O coeficiente de correlação entre as células nucleadas e as células ALDEFLUOR *bright* da bolsa e do segmento pós-criopreservação/descongelamento foi (r) = 0,9399 com $p < 0,0001$ e (r) = 0,5478 com $p = 0,0426$, respectivamente. Foi encontrada correlação entre quantificação das células CD34⁺ e das CFU-GM da bolsa e do segmento pós-criopreservação/descongelamento. Esses dados indicam que o método utilizado para a realização da criopreservação e o descongelamento das unidades de SCUP encontra-se validado, e que o segmento pode ser utilizado como uma ferramenta de controle de qualidade para a seleção da unidade de SCUP para transplante.

Palavras-chave: Validação. Sangue de cordão umbilical e placentário. Aldefluor. Células-tronco hematopoéticas.

ABSTRACT

BALDISSERA, J.L.C. **Evaluation of different methods of performing clonogenic assay and validation of the method of cryopreservation and resuspension of cryopreserved umbilical cord and placental blood.** 2015. 78 f. Master Dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Umbilical cord and placental blood (UCPB) has been used as a source of hematopoietic stem cells (HSCs) for transplant. The quality of this product may be affected during the various stages of processing it. In this study, the author reviewed the best preparation methodology for performing the clonogenic assay (pure, diluted or washed) and validated the method of cryopreservation and resuspension of UCPB bags. The author also evaluated the functionality of the aldehyde dehydrogenase enzyme (ALDH) as a method to determine the function of umbilical cord and placental blood HSCs, in 15 cryopreserved units by the Laboratory of Cryobiology and Cell Therapy of the Center for Hematology and Hemotherapy of Santa Catarina (HEMOSC). The units were thawed in four steps. The content of the segments and the bag was collected and resuspended in a 5% albumin solution, 5% acid citrate dextrose and saline solution. The cell suspension obtained was used to conduct the clonogenic assay, the assessment of cell viability, the quantification of nucleated cells (NC), CD34 + and ALDH^{br}. The parameters of time, cost and the result of the clonogenic assay, used to evaluate the methodology, indicated that the diluted cell suspension is the best method to be used when performing a clonogenic assay. The quantification of the nucleated cells (NC) and the total CD34+ cells pre-cryopreservation and post-cryopreservation/thawing was $8,3 (\pm 1,9) \times 10^8$ and $8,2 (\pm 2,0) \times 10^8$ ($p = 0,3388$) and $3,3 (\pm 2,7) \times 10^6$ and $3,2 (\pm 2,1) \times 10^6$ ($p = 0,4455$), respectively. The quantification of the NC and CD34+ viable cells pre-cryopreservation and post-cryopreservation/thawing was $8,1 (\pm 1,9)$ and $6,3 (\pm 1,7) \times 10^8$ ($p < 0,0001$) and $3,27 (\pm 2,0) \times 10^6$ and $2,8 (\pm 1,8) \times 10^6$ ($p = 0,0063$), respectively. The percentage of viable nucleated cells and CD34+ viable cells in the proximal segment and in the 20mL bag was 66,3 ($\pm 11,8$) and 75 (35-93); 76,5 ($\pm 11,6$) and 89 (75-100), respectively. In the clonogenic assay an average growth of $31,8 (\pm 7,6)$ colony-forming granulocyte-macrophage units (CFU-GM) $\times 10^5$ NC plated, obtained from the post-cryopreservation/thawing bag was observed. No correlation between the ALDH^{br}/CD45⁺ viable cells and the quantification of CFU-GM or CD34+ viable cells obtained from the bag post cryopreservation was found. The coefficient of correlation between nucleated cells and ALDEFLUOR *bright* cells from the bag and segment after cryopreservation were (r) = 0, 9399 with $p < 0, 0001$ and (r) = 0, 5478 with $p = 0,0426$, respectively. A correlation between quantification of CD34+ cells and CFU-GM bag and segment cells after cryopreservation/thawing was found. This data indicates that the method used to perform the cryopreservation and thawing of the UCPB unit has been validated, and that the segment can be used as a tool for quality control when making the selection of UCPB for transplant.

Keywords: Validation. Umbilical cord and placental blood. Aldefluor. Hematopoietic stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Foto ilustrativa de uma unidade de SCUP com os seus segmentos, imediatamente antes da criopreservação	21
Figura 2: Figura ilustrativa mostrando a população de $SSC^{lo}ALDH^{br}$ (círculo) quantificada por citometria de fluxo na unidade de SCUP	32
Figura 3: Figura ilustrativa mostrando a população de $SSC^{lo}ALDH^{br}$ (círculo) quando tratada com DEAB e quantificada por citometria de fluxo na unidade de SCUP.....	33
Figura 4: Quantificação das células nucleadas das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento.....	38
Figura 5: Recuperação das células nucleadas totais e viáveis pós-descongelamento.....	39
Figura 6: Quantificação das células $CD34^{+}$ e $CD34^{+}$ viáveis.....	39
Figura 7: Recuperação do número absoluto de células nucleadas e das células $CD34^{+}$ viáveis.....	40
Figura 8: Quantificação das unidades formadoras de colônia granulócito-macrófago.....	40
Figura 9: Correlação entre células $CD34^{+}$ viáveis e as células $ALDH^{br}/CD45^{+}$ viáveis.....	41
Figura 10: Correlação entre o número absoluto de células $ALDH^{br} CD45^{+}$ viáveis e a quantificação de CFU-GM.....	42
Figura 11: Correlação entre o número absoluto de células $CD34^{+}$ viáveis e a quantificação do CFU-GM.....	42
Figura 12: Quantificação das células nucleadas.....	43
Figura 13: Avaliação da recuperação das células nucleadas dos segmentos e bolsa pós-criopreservação/descongelamento.....	44
Figura 14: Avaliação da viabilidade das células nucleadas dos segmentos e das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento.....	45
Figura 15: Quantificação das células $CD34^{+}$ no segmento proximal e nas bolsas pré e pós-criopreservação.....	45
Figura 16: Mediana de células $CD34^{+}$ viáveis no segmento proximal, e bolsa pré e pós-criopreservação/descongelamento.....	46
Figura 17: Quantificação das CFU-GM nos segmentos e bolsa pós-criopreservação/descongelamento.....	46

Figura 18: Quantificação das células ALDH ^{br} /CD45+ viáveis no segmento e na bolsa pós-criopreservação/descongelamento.....	47
Figura 19: Correlação entre células ALDH ^{br} /CD45+ da bolsa e do segmento proximal.....	47
Figura 20: Correlação entre as células nucleadas da bolsa e segmento proximal.....	48
Figura 21: Correlação entre o número total de CFU-GM da bolsa e segmento medial.....	48
Figura 22: Correlação entre células CD34+ da bolsa e segmento proximal.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tempo utilizado por técnica	36
Tabela 2: Quantificação de CFU-GM x 10 ⁵ CN plaqueadas	37
Tabela suplementar A - Custo por técnica	61
Tabela suplementar B - CFU-GM x 10 ⁵ CN plaqueadas considerando hemacitômetro	62
Tabela suplementar C1- Quantificação das células nucleadas totais x 10 ⁸	63
Tabela suplementar C2 - Quantificação das células nucleadas viáveis x 10 ⁸	64
Tabela suplementar C3 - Recuperação das células nucleadas totais e viáveis (%)	65
Tabela suplementar C4 - Quantificação das células nucleadas da bolsa pré e pós-criopreservação/descongelamento e segmentos distal, medial e proximal	66
Tabela suplementar C5 - Recuperação das de células nucleadas totais (%) da bolsa pós-criopreservação/descongelamento e dos segmentos	67
Tabela suplementar C6 - Viabilidade das células nucleadas (%) da bolsa pré e pós-criopreservação (20 e 5 mL) e segmento proximal	68
Tabela suplementar D1 - Quantificação das células CD34 ⁺ e CD34 ⁺ viáveis (x 10 ⁶) das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento	69
Tabela suplementar D2 - Porcentagem das células CD34 viáveis das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento	70
Tabela suplementar D3 - - Quantificação das células CD34 x 10 ⁶ das bolsas pré e pós criopreservação e segmento proximal	71
Tabela suplementar D4 - Mediana viabilidade das células CD34 (%) na bolsa pré-criopreservação, segmento proximal e bolsa pós-criopreservação (20 e 5 mL)	72
Tabela suplementar E1- CFU-GM x 10 ⁵ CN plaqueadas da bolsa e segmentos ..	73
Tabela suplementar F1 - Total células ALDH ^{br} /CD45+ segmento e bolsa	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ACD	Solução anticoagulante à base de ácido cítrico, citrato e dextrose
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase
ALDH ^{br}	Aldefluor <i>bright</i> (brilhante ou positivo)
APC	Alofocianina
BSCUP	Banco de sangue de cordão umbilical e placentário
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CFU	Unidade formadora de colônias
CFU-GM	Unidade formadora de colônias granulócitos e macrófagos
CMV	Citomegalovirus
CN	Células nucleadas
CPH	Célula-progenitora hematopoética
CT	Células-tronco
CTHs	Células tronco hematopoéticas
DEAB	Dimetilaminobenzaldeído
DECH	Doença do enxerto-contr-o-hospedeiro
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócito
HBC	Antígeno do nucleocapsídeo (core) Hepatite B
HBs	Antígeno de superfície Hepatite B
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HEMOSIS	Sistema de Gerenciamento do Hemocentro
HES	Hidroxetilamido
HLA-	Antígeno leucocitário humano
ISHAGE	<i>Internacional Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>
INCA	Instituto nacional do câncer
LN ₂	Nitrogênio líquido
MO	Medula óssea

PC- 5	Ficoeritina-cianina
PE	Ficoeritrina
RN	Recém-nascido
RENACORD	Registro nacional de sangue de cordão umbilical
SCUP	Sangue do cordão umbilical e placentário
SSC	<i>Side scatter</i>
SSCI	<i>Low side scatter</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCN	Total de células nucleadas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O PROCESSAMENTO DO SCUP PARA USO CLÍNICO	19
1.2 A EXPERIÊNCIA DO BSCUP DO HEMOSC	19
1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO SCUP	21
2 HIPÓTESES	24
3 OBJETIVO GERAL	25
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 METODOLOGIA.....	26
4.1 SELEÇÃO DAS UNIDADES.....	26
4.2 ASPECTOS ÉTICOS	26
4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO CELULAR DO SEGMENTO DISTAL PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO CLONOGÊNICO PÓS-DESCONGELAMENTO.....	26
4.3.1 Contagem das células nucleadas	28
4.3.2 Quantificação das unidades formadoras de colônias hematopoéticas.....	29
4.3.3 Determinação da melhor metodologia de preparo da suspensão celular para a realização do ensaio clonogênico	29
4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E RESSUSPENSÃO DO SCUP	30
4.4.1 Avaliação da viabilidade celular e quantificação das células CD34+ por citometria de fluxo	31
4.4.2 Quantificação e avaliação das células SSC^{lo}ALDH^{br}	32
4.5 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO.....	34
4.5.1 Preparo do segmento medial e proximal	34
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 AVALIAÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR.....	36
5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DO SCUP	38

5.3 AVALIAÇÃO DO ALDEFLUOR COMO UM MÉTODO EFICAZ PARA AVALIAR A FUNÇÃO DAS CTHS DO SCUP.....	41
5.4 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO.....	43
6 DISCUSSÃO	50
6.1 AVALIAÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR.....	50
6.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DO SCUP	51
6.3 AVALIAÇÃO DO ALDEFLUOR COMO UM MÉTODO EFICAZ PARA AVALIAR A FUNÇÃO DAS CTH DO SCUP.....	52
6.4 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A - CUSTO POR TÉCNICA	61
APÊNDICE B - ENSAIO CLONOGÊNICO CONSIDERANDO HEMACITÔMETRO	62
APÊNDICE C - CÉLULAS NUCLEADAS TOTAIS E VIÁVEIS.....	63
APÊNDICE D - CÉLULAS CD34+ TOTAIS E VIÁVEIS.....	69
APÊNDICE E - ENSAIO CLONOGÊNICO	73
APÊNDICE F - TOTAL CÉLULAS ALDHBR/CD45+	74
APÊNDICE G - JUSTIFICATIVA PARA A NÃO UTILIZAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
APÊNDICE H- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	77

1 INTRODUÇÃO

O Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP) é rico em células-tronco hematopoéticas (CTHs) e pode ser usado como fonte para a reconstituição hematopoética após a realização de quimioterapia em altas doses (RUBINSTEIN, P. *et al.*, 1998), tratamento esse popularmente conhecido como transplante de medula óssea (TMO). Vários estudos têm demonstrado esse potencial (GLUCKMAN, E. 2009; QUEROL, S. *et al.*, 2010; BALLEEN, K.; GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E., 2013). Essas células têm sido usadas, tanto no tratamento de crianças quanto de adultos portadores, principalmente, de doenças hematológicas malignas ou benignas e que não possuem doadores na família com o sistema de antígenos leucocitários humano (HLA) compatível (GLUCKMAN, E. *et al.*, 1989; OKAMOTO e CAMPOS, 2004; RODRIGUES, C. *et al.*, 2010).

A utilização das CTHs provenientes do SCUP apresenta algumas vantagens em relação ao sangue periférico e à medula óssea (MO). A obtenção do sangue de cordão umbilical e placentário é indolor e segura, pois ele é coletado por punção da veia umbilical no momento do parto, após o nascimento do bebê e a secção do cordão umbilical. Já a coleta da medula óssea é realizada por punção aspirativa da crista ilíaca do doador em centro cirúrgico e, por isso, depende de internação hospitalar do doador. Para se obter CTHs do sangue periférico, o doador é submetido a um procedimento de leucoaférese após a mobilização prévia das CTHs com a utilização de agentes mobilizadores como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (CASTRO, J.; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001).

Outra vantagem do SCUP é que essas células podem ser utilizadas com certo grau de incompatibilidade HLA, sem maior risco para a doença do enxerto-contra-o-hospedeiro (DECH) desde que combinado com o número adequado de células nucleadas totais (TCN) na unidade, o que aumenta a possibilidade de se encontrar um doador compatível. Outros benefícios referem-se a menor possibilidade de transmissão de doenças infecciosas virais como, por exemplo, o citomegalovirus (CMV), bem como a diminuição do tempo necessário para localizar o doador e disponibilização do produto para a realização do transplante, uma vez que as unidades de SCUP somente são liberadas e cadastradas para uso após a sua qualificação. Isso significa que o número de células, a triagem clínica e sorológica, a genotipagem HLA e os demais testes foram realizados previamente ao cadastro da unidade no registro, ou seja, quando esse é feito, as unidades já estão prontas para uso (PEDRASSA, P.; HAMERSCHLAK, N., 2008; RODRIGUES, C. *et al.*, 2010).

Entretanto, existem algumas desvantagens da utilização do SCUP como, por exemplo, a impossibilidade de uma nova coleta e a baixa quantidade de células-tronco em algumas unidades, o que acarreta um prolongamento do tempo de enxertia do transplante em relação às células de outras fontes (MO e sangue periférico mobilizado). Algumas estratégias estão sendo estudadas para minimizar os efeitos negativos da utilização dessa fonte como, o emprego do duplo cordão e a expansão celular *in vitro* que, entre outras técnicas, visam a diminuir o tempo de enxertia das CTHs (SILVA JÚNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L., 2009).

O resultado dos transplantes com o SCUP depende principalmente da doença de base, da urgência do transplante que, por sua vez, depende do estado clínico do paciente, bem como da quantidade de células que será infundida e do grau de disparidade HLA. Atualmente, a dose mínima recomendada para a reconstituição hematopoética é de $3,0 \times 10^7$ células nucleadas (CN) ou $2,0 \times 10^5$ células CD34+ por kg de peso corporal do paciente para as unidades que apresentam até duas diferenças na compatibilidade do HLA. Em doenças malignas, recomenda-se utilizar uma dose de $3,5 \times 10^5$, ou maior, devido ao risco de falha no enxerto, principalmente se esta unidade apresentar duas ou mais incompatibilidades HLA (GLUCKMAN, E., 2009). Há autores, contudo, que recomendam a dose mínima de $2,5 - 3,0 \times 10^7$ CN por kg de peso corporal do paciente independentemente da compatibilidade HLA (SCARADAVOU, A. *et al.*, 2013).

Estudos mostram que a combinação entre a quantidade de células nucleadas e a compatibilidade HLA têm se mostrado favorável à sobrevida pós-transplante (BARKER, J. N., 2011; LEE, H. R. *et al.*, 2014). A correlação entre o TCN e o número de células CD34+ também tem sido utilizada para selecionar a unidade quando há possibilidade de escolha entre, pelo menos, duas bolsas com características semelhantes quanto à celularidade e à disparidade HLA. Nesse caso, deve-se dar preferência para a unidade com maior número de células CD34+ (RODRIGUES, C. *et al.*, 2010).

Outro parâmetro importante na seleção de uma unidade para o transplante é o crescimento das unidades formadoras de colônia granulócito-macrófago (CFU-GM) por ser considerado o fator preditor mais potente pré e pós-criopreservação para a enxertia do transplante alogênico não aparentado (PAGE, K. M. *et al.*, 2011).

Sabe-se que as células do SCUP podem ficar armazenadas por anos antes da sua utilização. Yamamoto (2011) e colaboradores concluíram, em seus estudos, que o SCUP pode ser utilizado para transplante após longo tempo de armazenamento, mas os BSCUP têm que se preparar armazenando segmentos acoplados à bolsa para fazer os testes de controle de qualidade do produto

como: a quantificação do TCN, das CD34+ e CFU-GM, além da avaliação da viabilidade celular antes de liberar a bolsa para uso clínico (YAMAMOTO, S. *et al.*, 2011).

1.1 O PROCESSAMENTO DO SCUP PARA USO CLÍNICO

Em 1993, o Dr. Plablo Rubinstein montou o primeiro banco público de sangue de cordão umbilical e placentário em Nova York visando ao armazenamento dessas células para uso clínico (RUBINSTEIN, P. *et al.*, 1993). Isso ocorreu após a realização do primeiro transplante com SCUP bem sucedido em 1988, pela Dra. Eliana Gluckman (GLUCKMAN, E. *et al.*, 1989). A partir de então, vários centros passaram a congelar e estocar sistematicamente SCUP para transplante. Atualmente, existem mais de 600.000 unidades de SCUP armazenadas no mundo e já foram realizados mais de 30.000 transplantes com essa fonte (BALLEN, K.; GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E., 2013; Bone Marrow Donors Worldwide, 2014).

Os bancos de sangue de cordão umbilical placentário podem ser públicos (doação alogênica não aparentada ou aparentada) e privados (doação autóloga) (ANVISA, 2010).

No Brasil, o primeiro BSCUP público foi criado em 2001, no Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro. Em 2004, foi criada a rede pública de bancos de sangue de cordão umbilical e placentário pela Portaria Ministerial n. 2.381/GM com quatro bancos, sendo três localizados no estado de São Paulo e um na cidade do Rio de Janeiro. Atualmente, a rede BrasilCord conta com treze bancos distribuídos em todas as regiões do Brasil, com previsão de expansão para mais quatro, para permitir o armazenamento de unidades representativas da população brasileira. Após o processamento e a liberação para uso, as unidades processadas por esses bancos são cadastradas na rede e os seus dados disponibilizados para busca nacional e internacional.

1.2 A EXPERIÊNCIA DO BSCUP DO HEMOSC

O banco de sangue de cordão umbilical e placentário é responsável por todo o processo desde o recrutamento, coleta, triagem clínica e laboratorial da mãe e do SCUP até o processamento, criopreservação, transporte e preparo da unidade para o transplante. A qualidade do produto deve ser assegurada durante todas as etapas (ANVISA, 2010).

O sangue de cordão é coletado logo após o nascimento do bebê e a mãe precisa dar consentimento formal para a coleta, criopreservação, realização de testes laboratoriais necessários e uso clínico em qualquer paciente que dele venha a necessitar (PEDRASSA, P.; HAMERSCHLAK, N., 2008; ANVISA, 2010).

Em nosso centro, o SCUP é coletado de recém-nascidos a termo, procedentes da maternidade do Hospital Regional de São José Dr. Homero de Miranda Gomes, localizada na Grande Florianópolis. A coleta é realizada por enfermeira capacitada e devidamente treinada após autorização das mães. As gestantes são abordadas após a internação e triadas obedecendo aos critérios estabelecidos na RDC 56 (ANVISA, 2010).

Após a coleta, as unidades são registradas por meio da leitura do código de barras que as identifica no sistema informatizado do HEMOSC (HEMOSIS) e, em seguida, encaminhadas ao laboratório de Criobiologia/BSCUP do HEMOSC, onde são processadas e criopreservadas.

O processamento e a criopreservação são realizados de acordo com o protocolo utilizado pelo laboratório de Criobiologia e Terapia Celular do HEMOSC. Primeiramente, a temperatura de transporte do SCUP, que deve estar entre 2 e 24°C, é verificada e registrada. Em seguida, afere-se o volume da bolsa por meio da pesagem. Na cabine de segurança biológica, colhem-se 2 mL de amostra do SCUP, sendo 1 mL destinado para realizar os testes de quantificação de CN, avaliação de hemoglobinas anormais (0,5 mL) e determinação do genótipo HLA (0,5 mL) o restante é distribuído igualmente em dois criotubos que são criopreservados para testes futuros, caso necessário.

Somente são processadas as bolsas de SCUP que apresentam o TCN igual ou superior a $8,0 \times 10^8$. O agente sedimentante hidroxietilamido 450/0, 6% (HalexIstar, Goiânia, GO, BR) é adicionado nas bolsas aprovadas, em volume correspondente a 20% do volume total de SCUP; a seguir, a unidade é incubada à temperatura ambiente sob agitação, por 15 minutos. Ao término desse período, o SCUP é processado no sistema automatizado SEPAX[®] (Biosafe, Eysins, Suíça), cuja bolsa de criopreservação possui dois compartimentos, sendo um com capacidade aproximada de 5 mL e o outro de 20 mL.

Após a redução do volume para 23 mL, são coletados 2,5 mL de amostra do concentrado celular para quantificação das células CD34⁺ pela técnica do ISHAGE, avaliação da viabilidade celular pela técnica 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (0,5 mL), para quantificação CFU-GM (1 mL) e quantificação do TCN (0,5 mL). Nesse momento, é adicionada, lentamente, à bolsa contendo o concentrado celular, com homogeneização constante da mesma, 5 mL de solução crioprotetora que é constituída por dimetilsulfóxido (DMSO) e dextrana 40 (50%/50%) (Farmoterápica, Porto

Alegre, RS, BR) objetivando a concentração final do DMSO de 10%. A seguir, procede-se à selagem das bolsas de 20 e 5 mL, dos segmentos acoplados à bolsa que são selados em três partes (proximal, medial e distal) e identificados. O conjunto é envolvido por um envelope plástico protetor (Overwrap® Bags - Thermogenesis Corp - Rancho Cordova, CA, EUA) e acomodado em estojo metálico (**Figura 1**). O concentrado celular é, então, criopreservado no equipamento BioArchive® (Thermogenesis®), de acordo com a curva padrão de congelamento, definida pelo fabricante.

No próximo passo, são coletadas amostras do excedente de plasma e de hemácias. Do plasma são retirados em torno de 4 mL para ser congelado, em duas alíquotas, para testes futuros conforme a legislação. E do excedente de hemácias são retirados cerca de 10 mL para realizar a cultura microbiológica (8 mL) e a tipagem sanguínea (2 mL). Todos os passos são registrados no HEMOSIS para garantir a rastreabilidade do processo. Após a disponibilização e a avaliação de todos os testes, as bolsas são disponibilizadas para o registro nacional de sangue de cordão umbilical (RENACORD).



Figura 1 - Foto ilustrativa de uma unidade de SCUP, imediatamente antes da criopreservação.

1.3 CONTROLE DE QUALIDADE DO SCUP

A maioria dos parâmetros de qualidade do SCUP como TNC, CD34⁺, CFU-GM e a avaliação da viabilidade celular são definidos antes da criopreservação. Entretanto, a qualidade das células do SCUP pode ser afetada durante o processamento, armazenamento, transporte da unidade para o

centro transplantador assim como, no decorrer da reconstituição e descongelamento da bolsa, para o transplante (RODRIGUEZ, L. *et al.*, 2005).

Órgãos internacionais de acreditação como a Fundação para Acreditação em Terapia Celular (*Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy – FACT*) e o Programa de Acreditação de Terapia Celular da AABB (*Advancing Transfusion and Cellular Therapies Worldwide*), bem como a RDC 56 (ANVISA, 2010), exigem em seus padrões a avaliação do produto final após a criopreservação. De acordo com essa resolução, em seu artigo 119, quando uma unidade de SCUP é selecionada para o transplante o BSCUP, deve-se encaminhar ao centro transplantador um relatório com todos os dados da bolsa e providenciar a realização da tipificação do HLA em amostra contida em um segmento contíguo a bolsa de criopreservação, por laboratório credenciado para esse fim. Em outro segmento, deve-se realizar nova contagem e determinação da viabilidade celular e avaliar a função da CPH por meio da quantificação do número de CFU-GM ou da realização de teste funcional equivalente.

Alguns centros têm utilizado os dados encontrados na avaliação do segmento como critério para a liberação ou não da unidade para uso clínico. Entretanto, as técnicas utilizadas nessa avaliação variam entre os diferentes centros. Idealmente, estas deveriam ser padronizadas, pois a falta dessa padronização gera dificuldade na seleção do melhor produto a ser utilizado no tratamento do paciente, pelo centro transplantador (SOLVES, P., 2004).

Estudos têm mostrado que as unidades de SCUP sem crescimento de colônias não devem ser aceitas para o transplante porque o potencial de enxerto pode estar gravemente comprometido (QUEROL, S. *et al.*, 2010; BARKER, J. N.; BYAM, C.; SCARADAVOU, A., 2011). Por isso, atualmente, a quantificação da CFU-GM tem sido utilizada como método padrão para inferir a potência e a qualidade do produto. Porém, esse método é trabalhoso, de difícil padronização e nem sempre esta disponível no momento da liberação da bolsa para o transplante, pois requer um período de 12 a 14 dias para a sua realização.

É conhecido que as CTHs verdadeiras contêm elevados níveis da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). Essas enzimas estão envolvidas em importantes processos celulares, fisiológicos e fisiopatológicos, tal como os de sinalização celular e os de degradação de substâncias tóxicas (JACKSON, B. *et al.*, 2011). Além disso, é altamente expressa em CTH verdadeiras do sangue de cordão umbilical e placentário, da medula óssea ou do sangue periférico mobilizado (LIOZNOV, M. V. *et al.*, 2005; CHEUNG, A. M. S. *et al.*, 2007; LEE, H. R. *et al.*, 2014). Acredita-se que, clinicamente, o número de células ALDH^{br} nos concentrados de CTHs se correlaciona diretamente com a velocidade de enxertia após transplante. Por isso, tem sido proposto que a

quantificação dessas células pode servir como ensaio funcional, que avalia indiretamente a potência da unidade, ou seja, a possibilidade das CTHs presentes no produto a ser transplantado de enxertarem; mesmo objetivo para o qual a contagem das CFU-GM tem sido atualmente utilizada. A vantagem da utilização do Aldefluor é o tempo de liberação da bolsa para o transplante. O teste é realizado por citometria de fluxo e o resultado é conhecido em poucas horas após a sua realização (SHOULARS, K. *et al.*, 2010). Nesse sentido, no futuro, a quantificação das células que contêm essa enzima poderá ser utilizada como marcador de qualidade do produto e se tornar rotina nos laboratórios (SPELLMAN, S. *et al.*, 2011; LEE, H. R. *et al.*, 2014).

Neste trabalho avaliamos a melhor técnica de preparo da amostra contida no segmento ligado à unidade visando à quantificação das CFU-GM e testamos a técnica de dosagem da ALDH por citometria de fluxo como parâmetro para verificar a potência das CTHs-SCUP. Além disso, validamos o método de criopreservação e de ressuspensão das bolsas de SCUP processadas pelo Laboratório de Criobiologia e Terapia Celular do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

2 HIPÓTESES

O método utilizado para criopreservação e ressuspensão do SCUP é eficaz para manter a viabilidade das células.

O segmento acoplado à unidade de SCUP é representativo do conteúdo interno da bolsa criopreservada no pós-descongelamento.

O ALDEFLUOR pode ser utilizado como método alternativo para determinar a potência das CTHs.

3 OBJETIVO GERAL

Validar o método de criopreservação e de ressuspensão das bolsas de SCUP e analisar as diferentes metodologias de preparo da amostra para a realização do ensaio clonogênico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar qual é a melhor metodologia de preparo da suspensão celular do segmento para realizar o ensaio clonogênico pós-descongelamento.
- b) Validar a metodologia de criopreservação e ressuspensão do SCUP.
 - b.1) Avaliar a recuperação de células nucleadas totais e viáveis pós-criopreservação e descongelamento, em relação às células pré-criopreservação.
 - b.2) Avaliar o crescimento de unidades formadoras de colônia pós-criopreservação.
- c) Avaliar o ALDEFLUOR como método eficaz para avaliar a função das CTHs do SCUP.
- d) Avaliar a correlação entre o produto contido na bolsa e no segmento em relação à:
 - d.1) quantificação das células nucleadas;
 - d.2) viabilidade das células nucleadas e das CD34+;
 - d.3) quantificação das unidades formadoras de colônias granulócitos-macrófagos;
 - d.4) quantificação de células Aldefluor *bright*.

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DAS UNIDADES

Foram incluídas no estudo 15 unidades de SCUP criopreservadas entre 2011 e 2013, previamente destinadas para uso em controle de qualidade, pois não tinham atingido os critérios para liberação ao RENACORD. A seleção dessas unidades foi feita por meio de avaliação do “relatório de pós-processamento” do laboratório de Criobiologia e Terapia Celular/Banco de Sangue de Cordão Umbilical do HEMOSC.

Para a realização dos testes foram utilizados os segmentos distal, medial, proximal e as bolsas de 20 e 5 mL.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HEMOSC e encontra-se registrado sobre o processo n. CAAE 20268513.6.0000.0110.

Os testes realizados nas bolsas foram usados para verificar a qualidade do produto, validar a metodologia de criopreservação, descongelamento e ressuspensão da unidade de SCUP.

Considerando que no momento da doação das bolsas, a mãe do recém-nascido (RN) foi esclarecida e assinou o TCLE no qual constava a possibilidade de destino das amostras para controle de qualidade e, tendo em vista a inviabilidade de se localizar os doadores e que os dados gerados não identificam o sujeito da pesquisa, foi solicitado ao comitê de ética em pesquisa a dispensa do TCLE específico para este estudo, o qual foi aceito.

4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO CELULAR DO SEGMENTO DISTAL PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO CLONOGÊNICO PÓS-DESCONGELAMENTO

O preparo da suspensão celular do segmento para o ensaio clonogênico pós-descongelamento foi realizado com a amostra contida no segmento distal da unidade de SCUP. Este procedimento

teve como objetivo comparar o método de realização do ensaio clonogênico utilizando suspensão celular pura, diluída e lavada.

A bolsa de SCUP foi retirada do Bioarquivo[®] (Thermogenesis), o segmento distal foi separado e colocado em um tubo cônico plástico, que flutuava sobre o LN₂. A unidade e os demais segmentos foram recolocados no estojo de metal e armazenados novamente, porém em freezer mecânico a 150° C negativos, visto que várias unidades apresentavam sorologia alterada.

O segmento distal foi encaminhado para a cabine de segurança biológica onde foi descongelado pela fricção em um lenço umedecido com álcool a 70%. Neste momento, foi registrado o horário de início do preparo do segmento. Em seguida, as laterais do segmento foram furadas com uma agulha de 21G e o conteúdo do segmento foi coletado com uma seringa de insulina, aferido nessa seringa e dispensado em um microtubo estéril previamente identificado.

Para o plaqueamento das células para quantificação da CFU da amostra pura foram dispensados 12 µL dessa suspensão diretamente em 3 mL de meio semissólido (Methocult™ H4035 Optimun, without EPO - Cat: #04045 – StemCell Technologies inc Vancouver, BC, Canadá). Concomitantemente, iniciou-se o procedimento para o plaqueamento das células da amostra diluída em solução de ressuspensão contendo albumina humana a 5%, (LFB Biomedicaments, Courtaboeuf Cedex, França) solução anticoagulante a base de ácido cítrico, citrato e dextrose (ACD) a 5% (JP Indústria Farmacêutica S.A, Ribeirão Preto, SP, Brasil) em solução fisiológica a 0,9% (B Braun, São Gonçalo, RJ, Brasil). Para isso, na alíquota restante adicionou-se o equivalente ao volume da amostra dispensada no microtubo, anotando o horário. Foi aguardado um minuto e dispensado volume da solução de ressuspensão equivalente ao volume atual da suspensão. Aguardou-se, aproximadamente, um minuto e dispensou-se o volume de mais ou menos 10x o volume inicial do segmento após a retirada da amostra pura. Na sequência, aferiu-se o volume final da solução, que foi registrado. Após a homogeneização dessa solução, foi coletada uma amostra para a quantificação das células totais em hemacitômetro e em contador automático de células, conforme metodologia descrita em item específico. Em seguida, separou-se uma alíquota dessa solução contendo 3×10^5 CN, com base nos dados da contagem com o hemacitômetro, o qual foi completado para volume final 300 µL com RPMI (meio *Roswell Park Memorial Institute*, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e plaqueado na metilcelulose.

Para o plaqueamento das células para a quantificação do CFU da amostra lavada acrescentou-se ao restante das células aproximadamente 13 mL de solução de suspensão ou a quantidade suficiente para 15 mL. Essa solução foi homogeneizada e centrifugada a 600 x g por 10 minutos com frenagem média. Desprezou-se o sobrenadante e, após a homogeneização da amostra,

acrescentou-se 200 µL da solução de ressuspensão. O volume da amostra foi aferido e anotado. Em seguida, procedeu-se à quantificação das CN em hemacitômetro e no contador automático de células, conforme descrito no item específico, em uma alíquota dessa amostra. Logo após, separou-se uma alíquota dessa solução contendo 3×10^5 CN, com base nos dados da contagem com o hemacitômetro, cujo volume foi completado para volume final 300 µL com RPMI e dispensado em 3 mL de metilcelulose. O cultivo e a quantificação das CFU foram realizados conforme descrito em item específico. Foi registrado o horário do início do plaqueamento e do momento da incubação de cada uma dos experimentos.

A inferência da celularidade final da bolsa com base nos dados obtidos no segmento foi calculada pela fórmula:

$$\text{Volume inicial da bolsa} \times \text{TCN do segmento} / \text{volume inicial do segmento}$$

Em seguida, foi calculada a taxa de recuperação celular entre a bolsa e o segmento com o auxílio da fórmula abaixo:

$$\text{TCN inferido do segmento} / \text{TCN da bolsa inicial} \times 100$$

Ao avaliarmos os resultados obtidos, verificamos que teria sido melhor a utilização dos valores das CN obtidos pelo contador automático, visto que seria essa a metodologia a ser utilizada nos próximos passos deste trabalho. Por esse motivo, recalculamos e corrigimos os valores obtidos na quantificação das CFU, por meio de regra de três simples. Além disso, optamos por utilizar o dobro do número de células a serem plaqueadas nos experimentos futuros.

4.3.1 Contagem das células nucleadas

A contagem das CN da bolsa e do segmento foi realizada pelo método automatizado Sysmex KX2 1N (Sysmex corporation Cobe, Japan) no laboratório de Hematologia do HEMOSC e pelo método manual pelo hemacitômetro no laboratório de criobiologia e terapia celular do HEMOSC.

A quantificação das CN pelo hemacitômetro foi realizada após a diluição da amostra. A leitura foi realizada nos quatro quadrantes do hemacitômetro e a estimativa do número de células foi dada pelo cálculo:

Número de células por mL = média n. de células/quadrante x fator de diluição x 10^4

Total do n. de células = número de células /mL x volume original da suspensão

4.3.2 Quantificação das unidades formadoras de colônias hematopoéticas

O ensaio clonogênico foi realizado com o objetivo de padronizar a melhor técnica para este teste e comparar o crescimento entre as células do segmento e da bolsa. Para tal, a suspensão celular foi dispensada em 3 mL de meio semissólido (Methocult™ H4035- Stem Cell Technologies inc. Optimun, without EPO - Cat: #04045, Vancouver, BC, Canadá), homogeneizada com o auxílio do vórtex e, após aguardar alguns minutos até que as bolhas se desfizessem, 1,1 mL desse meio foi plaqueado em cada uma das duas placas de 35 mm com o auxílio de seringa com capacidade de 3 mL e agulha para CFU ponta romba 16G (StemCell Technologies inc.).

As placas foram inclinadas várias vezes com movimentos circulares para uniformizar a distribuição do meio. Posteriormente, essas placas foram transferidas para uma placa de Petry de 100 mm de diâmetro contendo uma placa de 35 mm com aproximadamente 2,5 mL de água estéril para formar a câmara extra úmida. O conjunto foi incubado a 37°C em incubadora úmida com 5% de CO₂ por 12 a 14 dias.

Após o término do período de incubação das CFU, fez-se a leitura integral das colônias com mais de 40 células em microscópio invertido com auxílio de uma placa quadriculada (StemCell Technologies inc). As unidades formadoras de colônias foram quantificadas por dois examinadores e os resultados expressos como número das CFU - GM x 10^5 /CN plaqueadas.

4.3.3 Determinação da melhor metodologia de preparo da suspensão celular para a realização do ensaio clonogênico

Os parâmetros utilizados para definir o melhor método de preparo da suspensão celular do segmento foram: custo; tempo necessário para desenvolver a técnica; dificuldade técnica e o resultado obtido (crescimento das colônias).

Para analisar o custo das metodologias de preparo da suspensão celular pura, diluída e lavada do segmento foi calculado o custo do material e dos reagentes utilizados em cada técnica, a exceção

da albumina humana, que foi doada. Não foi avaliado os custos indiretos para a realização das técnicas.

O tempo necessário para a execução de cada uma das técnicas foi calculado considerando o horário do início do descongelamento do segmento até a incubação do experimento.

Quanto ao resultado obtido em cada técnica foi analisado o crescimento de colônias de cada placa, por dois examinadores e o resultado foi calculado considerando a média da quadruplicata de CFU-GM x 10^5 /CN plaqueadas.

Na análise da dificuldade técnica foi considerado a complexidade da técnica, ou seja, qual a técnica que demanda mais treinamento técnico e equipamentos para a sua realização.

4.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E RESSUSPENSÃO DO SCUP

Para validar a metodologia de criopreservação e ressuspensão, foi utilizada a suspensão celular contida na bolsa principal (20 mL) e na satélite (5 mL). As bolsas de SCUP foram descongeladas em banho-maria a 37°C protegidas em embalagem plástica, com movimentos suaves. As bolsas foram removidas do banho-maria, ainda com algum gelo no seu interior. Após a retirada da embalagem protetora, a bolsa foi limpa com álcool a 70% e levada à cabine de segurança biológica. Em seguida, foi cortado o plástico protetor das portas de entrada da bolsa com dispositivo próprio tipo “*cort plast*” estéril e inserido o coletor de amostras em cada uma das portas. Os coletores de amostra foram limpos com lenço umedecido com álcool a 70%. Com auxílio de seringa de 20 mL, o conteúdo da bolsa de 20 mL foi coletado. A seguir, 10 mL de suspensão celular foram dispensados em cada um dos dois tubos cônicos de polipropileno com capacidade para 50 mL (tubos A e B), contendo 10 mL de solução de ressuspensão e lavagem no seu interior. O procedimento foi repetido com a bolsa de 5 mL. A seguir, a bolsa de 20 mL foi lavada com 20 mL da solução de ressuspensão. Esse volume foi coletado e dispensado igualmente em cada um dos dois tubos de polipropileno que já continham a suspensão celular. O procedimento foi repetido com a bolsa de 5 mL que foi lavada com 5 mL de solução. Na sequência, foram acrescentados 10 mL da solução de ressuspensão nos tubos A e B e mais 5 mL no tubo da bolsa de 5 mL. O volume de cada

tubo foi aferido. Foi coletada uma alíquota da suspensão celular para quantificação das CN com o contador automatizado de células Sysmex KX2 1N (Sysmex corporation). Outra alíquota dessas amostras foi encaminhada para a citometria de fluxo para quantificação das células CD34⁺ e avaliação da viabilidade das CN e das CD34⁺, conforme descrito no item específico. Uma alíquota contendo 6×10^5 CN/ mL da bolsa de 20 mL foi utilizada para a quantificação das CFU-GM e uma alíquota da bolsa de 5 mL foi designada para quantificação das células ALDH^{br}, conforme descrito nos itens específicos.

4.4.1 Avaliação da viabilidade celular e quantificação das células CD34⁺ por citometria de fluxo

A quantificação das células CD34⁺ e a análise da viabilidade celular das CN e das células CD34⁺ foram realizadas por citometria de fluxo.

Para quantificação absoluta e relativa das células CD34⁺ nas bolsas de 20 mL e de 5 mL, foi utilizado o protocolo da *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE), plataforma dupla, utilizando os seguintes anticorpos monoclonais: CD34 conjugado ao fluorocromo ficoetrina (PE) (clone 8G12, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, Califórnia), marcador de célula progenitora e CD45 conjugado a alofocianina (APC) (clone 2D1, Becton Dickinson Immunocytometry Systems), marcador expresso em todos os leucócitos humanos, conforme padronização do laboratório de Marcadores Celulares do HEMOSC. Para tanto, 50 µL da amostra foi ajustada em uma concentração celular de 1×10^6 /mL, homogeneizada em vórtex e incubada com 10 µL dos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos, por 20 minutos em temperatura ambiente e em ausência de luz. Após a incubação, as hemácias presentes nas amostras foram lisadas pela adição da solução de lise (FASCs Lysing solution) por 15 minutos. Utilizando a metodologia de células não lavadas, *lyse no wash* (LNW), as amostras foram incubadas com 7-AAD (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), um marcador de células não viáveis.

Em todas as amostras foi utilizado um controle negativo, contendo controles isotípicos dos antígenos pesquisados com fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-cianina (PC-5) e alofocianina (APC).

As células foram avaliadas e quantificadas com o auxílio do citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizado o programa *Cellquest* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems,). Os dados foram analisados pelo programa Infinity versão 1.5.0.

4.4.2 Quantificação e avaliação das células $SSC^{lo}ALDH^{br}$

Para quantificação das células $SSC^{lo}ALDH^{br}$, foi utilizado o *kit* comercial ALDEFLUOR® (STEMCELL Technologies).

Esse método não imunológico é utilizado para identificar e enumerar as células que expressam altos níveis de ALDH. As células com alta atividade tornam-se fluorescentes quando expostas ao substrato de ALDH e podem ser avaliadas pelo detector de fluorocromo verde (520 – 540 nm) de um citômetro de fluxo. Esse substrato entra passivamente na célula e é convertido pela enzima ALDH endógena e fica retido no interior das células viáveis, tornando-as fluorescentes **(Figura 2)**. O efluxo desse substrato é bloqueado pelo dimetilaminobenzaldeído (DEAB) que é um inibidor da atividade do ALDH e, por isso, utilizado como controle negativo **(Figura 3)**.

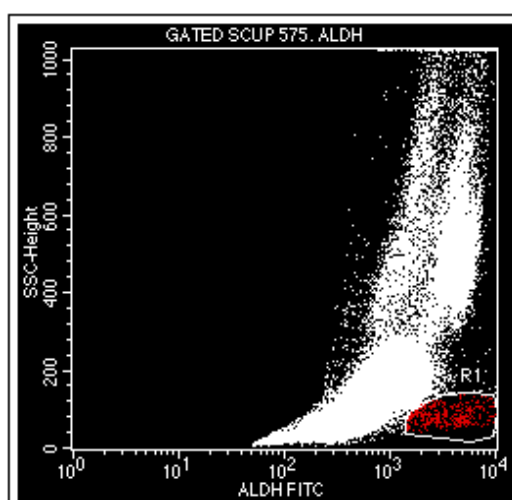


Figura 2 - Figura ilustrativa mostrando a população de $SSC^{lo}ALDH^{br}$ (círculo) quantificada por citometria de fluxo na unidade de SCUP.

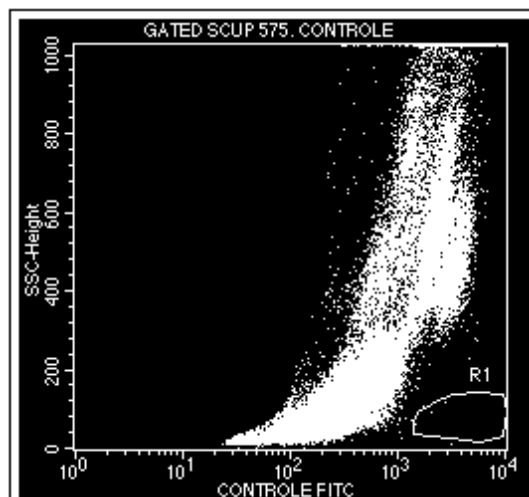


Figura 3 - Figura ilustrativa mostrando a população de $SSC^{lo}ALDH^{br}$ (círculo) tratada com DEAB e quantificada por citometria de fluxo na unidade de SCUP.

Para realizar a quantificação do ALDH, os glóbulos vermelhos da amostra foram lisados utilizando-se cloreto de amônia tamponada. A suspensão celular foi ajustada para uma concentração celular de 1×10^6 /mL utilizando o tampão conforme orientação da bula do *kit* comercial ALDEFLUOR® (STEMCELL Technologies). Para esse procedimento, foram separados dois tubos de ensaio próprios para citometria de fluxo e identificados um como teste e outro como controle. No tubo teste foi dispensado 1000 μ L de amostra na concentração de 1×10^6 /mL. Os tubos foram envolvidos com papel alumínio, as luzes do laboratório foram diminuídas. Ao tubo controle foi adicionado 5 μ L de DEAB. Em seguida, foi adicionado no tubo teste 5 μ L ALDH, a solução foi homogeneizada e, rapidamente, coletado 500 μ L dessa solução e dispensado no tubo controle. Os tubos foram incubados de 30 a 60 minutos a 37°C.

Após a incubação, procedeu-se a centrifugação, 710 x **g** por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e os tubos foram encaminhados para a citometria de fluxo para análise.

Na citometria, as células $SSC^{lo}ALDH^{br}$ foram quantificadas com o auxílio de citômetro de fluxo (FACSCalibur BD) utilizando-se o *software* Cellquest (BD). As subpopulações de células $SSC^{lo}ALDH^{br}CD34^{+}$ e $SSC^{lo}ALDH^{br}CD45^{+}$ viáveis foram quantificadas após marcação celular com os anticorpos CD34 e CD45. A viabilidade celular foi avaliada por meio do 7-AAD, conforme descrito em item específico.

4.5 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO

No segmento medial foi avaliada a viabilidade das células nucleadas, das células CD34⁺ e realizada a quantificação das CFU-GM. No segmento proximal foram avaliados os parâmetros: viabilidade das células nucleadas, viabilidade das células CD34⁺ e quantificação das células ALDH^{br}. Em ambos os casos, utilizou-se a diluição como método de preparo da suspensão celular. Em conjunto, os testes realizados no segmento distal, proximal e bolsa pós-criopreservação/descongelamento foram utilizados para a avaliação da correlação do produto contido nos segmentos em relação à bolsa.

Em ambos os seguimentos, ao término do experimento, o TCN da bolsa foi inferido e a porcentagem de recuperação celular foi calculada com base nas fórmulas descritas no item referente ao preparo do segmento distal.

4.5.1 Preparo do segmento medial e proximal

O segmento medial foi separado da bolsa que estava armazenada no freezer mecânico a 150° C negativos, colocado em um tubo cônico plástico, que flutuava no LN₂ e levado a cabine de segurança biológica onde foi descongelado. A amostra desse segmento foi coletada conforme realizado no segmento distal. O volume do produto foi retirado do segmento, aferido por meio da seringa de insulina e dispensado em um microtubo, previamente identificado. Em seguida, iniciou-se a diluição da amostra dispensando volume da solução de ressuspensão equivalente ao da amostra coletada do segmento. Aguardou-se, aproximadamente, um minuto; dispensou-se o volume de suspensão de ressuspensão equivalente ao volume atual da suspensão celular, aguardou-se, aproximadamente, um minuto e acrescentou-se volume de suspensão celular para aproximadamente 10 vezes o volume inicial do segmento. Aferiu-se, novamente, o volume da suspensão celular. Em seguida, uma amostra foi retirada dessa solução e as CN foram quantificadas em contador automatizado de células, conforme previamente descrito. Uma alíquota da solução do segmento medial contendo 6x10⁵ CN/ mL foi separada para plaqueamento da CFU conforme descrito no item específico. O restante das células foi enviado para a citometria de fluxo para avaliar a viabilidade

das células CN e das células CD34+, conforme descrito no item específico. Procedeu-se com o cálculo para determinar a inferência da celularidade da bolsa e recuperação celular.

Na amostra do segmento proximal, foi realizada a quantificação ALDH conforme descrito no item específico.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados empregando-se os *softwares* GraphPad InStat versão 3.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de p obtidos foram menores que 0,05.

Os resultados foram apresentados como média ($\pm$ SD, desvio padrão da média) para os resultados com distribuição normal ou mediana (amplitude) para as amostras que não apresentaram esta distribuição ou cujo número de amostras avaliadas foi menor que 12.

Para os experimentos com duas amostras e com distribuição normal, foi utilizado o teste T pareado ou o teste T não pareado para as amostras pareadas ou não, respectivamente. Quando pelo menos uma das amostras não apresentava distribuição normal, foi utilizado o teste de Friedman para amostras pareadas e de Kruskal-Wallis para comparar as amostras não pareadas ambas com pós-teste de Dunn. Já para os experimentos com três ou mais amostras com distribuição normal, foi aplicado o teste medidas repetidas ANOVA para comparar amostras pareadas com pós-teste de Tukey-Kramer. Para avaliar a correlação entre o produto contido na bolsa e no segmento, foram utilizados os testes de correlação e regressão linear.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

O custo total por técnica variou entre R\$ 157,36 e 161,42 sendo o meio de cultura o insumo com maior custo (R\$ 143,33). O detalhamento do custo individual para a realização das três metodologias está descrito na **Tabela complementar A** - Custo por Técnica (Apêndice A).

A **Tabela 1**, a seguir, demonstra que o tempo médio utilizado na preparação da suspensão celular, para realizar o ensaio clonogênico pós-descongelamento foi de 20,9 minutos ($SD \pm 5,45$) na técnica pura; 37,6 minutos ($SD \pm 7,60$) na diluída; e de 63,33 minutos ($SD \pm 19,75$) na lavada ($p < 0,0001$), medidas repetidas ANOVA. O pós-teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas identificou que houve diferença entre o tempo gasto na execução das três técnicas.

Tabela 1 – Tempo utilizado por técnica

SCUP	Pura	Diluída	Lavada
338	0:28:00	0:29:00	0:54:00
339	0:33:00	0:38:00	0:53:00
503	0:10:00	0:38:00	1:12:00
507	0:23:00	0:40:00	1:17:00
540	0:14:00	0:33:00	0:56:00
548	0:24:00	0:44:00	0:69:00
561	0:22:00	0:33:00	0:60:00
575	0:22:00	0:26:00	1:21:00
582	0:21:00	0:47:00	2:12:00
584	0:19:00	0:46:00	1:11:00
604	0:22:00	0:45:00	1:04:00
657	0:22:00	0:51:00	1:08:00
663	0:19:00	0:29:00	0:54:00
665	0:16:00	0:34:00	0:55:00
672	0:19:00	0:32:00	0:59:00

SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

As unidades formadoras de colônia foram indiretamente quantificadas por meio do ensaio clonogênico. O número de células plaqueadas foi calculado inicialmente utilizando o hemacitômetro

e, retrospectivamente, com o contador automático. O detalhamento do crescimento do CFU no hemacitômetro está na **Tabela suplementar B (Apêndice B)**. No SCUP 338, não foi realizada a contagem de CN com o contador automático de células, pois não tivemos amostra suficiente para tal.

O crescimento das CFU, quando utilizado o contador automático de células, apresentou na técnica pura 0,89 (0,00 e 17,52) colônias; na técnica diluída 2,02 (0,00 e 35,09) colônias e na técnica lavada 2,89 (0,00 e 59,40 colônias) ($p < 0,0061$). O pós-teste de comparações múltiplas de Dunn não identificou diferença no crescimento de CFU entre as três metodologias testadas. Esse resultado não considerou o SCUP 338 devido a não realização da contagem de células com o contador automatizado. Não houve crescimento das CFU-GM nos SCUPs 339, 548, 657 e 672, conforme demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 - CFU-GM x 10^5 CN plaqueadas considerado contador automático de células

SCUP	PURA	DILUÍDA	LAVADA
338	48,27	NR	NR
339	0,00	0,00	0,00
503	17,52	19,58	29,08
507	1,63	0,47	4,00
540	10,10	35,09	59,40
548	0,00	0,00	0,00
561	0,00	1,78	0,00
575	0,67	2,27	2,08
582	7,32	21,30	35,84
584	12,84	19,83	35,90
604	0,49	3,03	3,57
657	0,00	0,00	0,00
663	1,12	3,29	2,22
665	4,92	1,78	12,00
672	0,00	0,00	0,00

SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

5.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DO SCUP

A quantificação das CN totais pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento foi, respectivamente, $8,31(\pm 1,9) \times 10^8$ e $8,23 (\pm 2,0) \times 10^8$ ($p = 0,3388$) - **Figura 4A e Tabela suplementar C1 (Apêndice C)**. Já a quantificação das CN viáveis pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento foi, respectivamente, $8,1 (\pm 1,9)$ e $6,3 (\pm 1,7) \times 10^8$ ($p < 0,0001$) - **Figura 4B e Tabela suplementar C2 (Apêndice C)**.

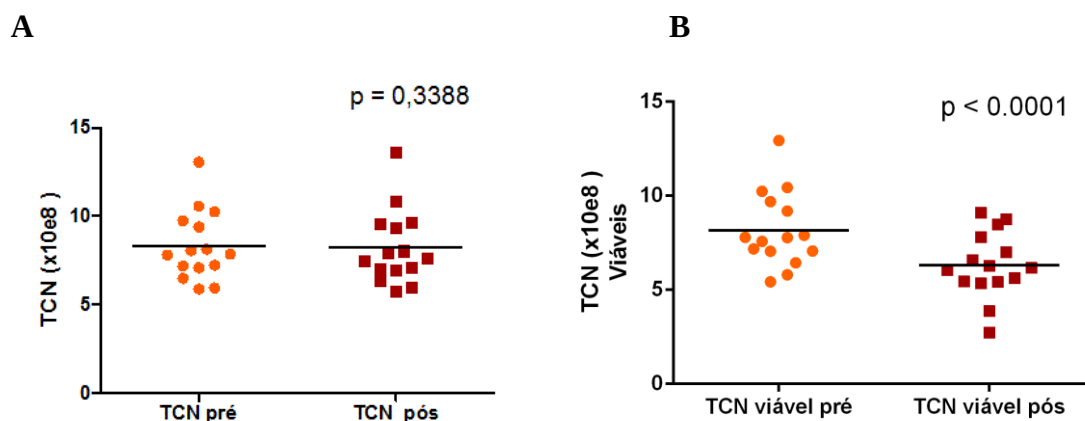


Figura 4 - Quantificação das células nucleadas das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento. A viabilidade celular das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento foi avaliada por citometria de fluxo (7AAD). A: Número absoluto de células nucleadas e B: Células nucleadas viáveis. TCN = total de células nucleadas. Teste t pareado; _____ média.

A recuperação das CN totais e das CN viáveis das bolsas pós-descongelamento foi, respectivamente, de $98 (\pm 3,1) \%$ e $76 (\pm 11,6) \%$ ($p < 0,0001$) - **Figura 5 e Tabela suplementar C3 (Apêndice C)**.

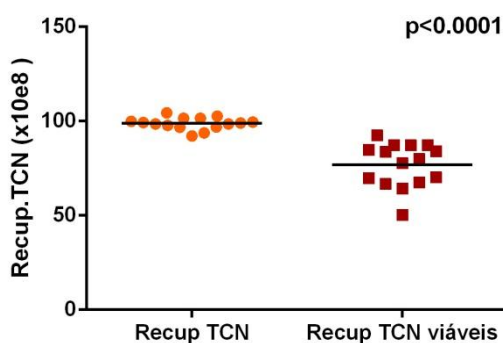


Figura 5: Recuperação das células nucleadas totais e viáveis pós-descongelamento. A recuperação das células nucleadas totais e das células nucleadas viáveis foi calculada considerando o total das células nucleadas totais e viáveis da bolsa pós-criopreservação/descongelamento. TCN = total de células nucleadas. Recup. = recuperação. Teste t Pareado; _____ média.

A quantificação absoluta das células CD34+ pré-criopreservação e pós-descongelamento foi, respectivamente, $3,3 (\pm 2,7) \times 10^6$ e $3,2 (\pm 2,12) \times 10^6$ ($p = 0,4455$). A quantificação das células CD34+ viáveis pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento foi, respectivamente, $3,2 (\pm 2,0) \times 10^6$ e $2,8 (\pm 1,8) \times 10^6$ ($p = 0,0063$). **Figuras 6A e 6B e Tabela suplementar D1 (Apêndice D).**

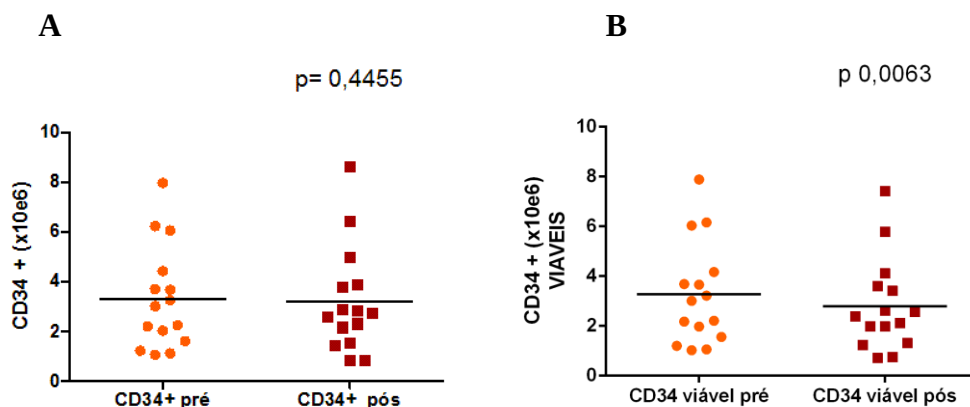


Figura 6: Quantificação das células CD34+ e CD34+ viáveis. A quantificação e a análise da viabilidade (7AAD) das células CD34+ nas bolsas de SCUP pré e pós-criopreservação e descongelamento foram realizadas por citometria de fluxo. **A:** Número absoluto das células CD34+; **B:** Células CD34+ viáveis. Teste t pareado. _____ média.

A recuperação do número absoluto de CN e das células CD34+ viáveis foi, respectivamente, $76,8 (\pm 11,6)$ e $85,6 (\pm 13,7) \%$ ($p = 0,0704$). **Figura 7 e Tabela suplementar C3 (Apêndice C) e Tabela suplementar D2 (Apêndice D).**

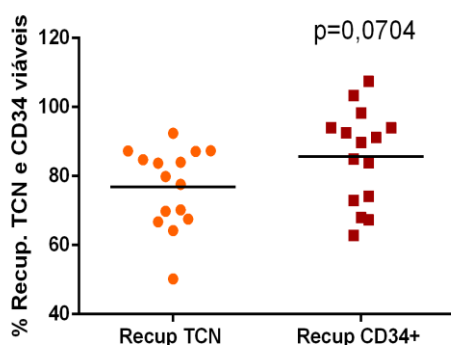


Figura 7: Recuperação do número absoluto de células nucleadas e das células CD34+viáveis. A recuperação do número absoluto de células nucleadas e das células CD34 viáveis foi calculada considerando o total das células nucleadas e das CD34+viáveis da bolsa pré-criopreservação e pós-criopreservação/descongelamento. **TCN** = total de células nucleadas. **Recup.** = Recuperação. **%** = porcentagem. **Teste t não Pareado.** _____ média.

O crescimento das unidades formadoras de colônia foi avaliado pelo cultivo de uma alíquota contendo 2×10^5 células/mL da suspensão celular em metilcelulose obtida pós-descongelamento e ressuspensão do concentrado celular em solução de albumina humana, ACD a 10% em solução fisiológica. A média ($\pm$ SD) de crescimento das CFU pós-criopreservação foi $31,8 (\pm 7,6) \times 10^5$ CN plaqueadas. **Figura 8 e Tabela suplementar E1 (Apêndice E).**

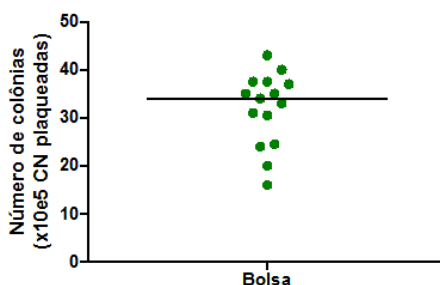


Figura 8: Quantificação das unidades formadoras de colônia granulócito–macrófago. Para a quantificação das CFU-GM, a suspensão celular foi plaqueada em metilcelulose e incubada. Após 12 a 14 dias, foi realizada a leitura e contadas às colônias com mais de 40 células. _____ média.

5.3 AVALIAÇÃO DO ALDEFLUOR COMO UM MÉTODO EFICAZ PARA AVALIAR A FUNÇÃO DAS CTHS DO SCUP

Para analisar o aldefluor como método adequado para avaliação da potência das CTHs do SCUP, foi realizada a quantificação das células $ALDH^{br}$ totais, a análise das células $ALDH^{br}CD45^{+}$ e $CD34^{+}$ viáveis, em amostras do segmento proximal e da bolsa de 5 mL após criopreservação/descongelamento.

O coeficiente de correlação entre as células $CD34^{+}$ viáveis e as células $ALDH^{br}/CD45^{+}$ viáveis da bolsa pós-criopreservação/descongelamento foi $(r) = 0,2765$ com $p = 0,3185$. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 9, Tabela suplementar D1 (Apêndice D) e Tabela suplementar F1 (Apêndice F)**.

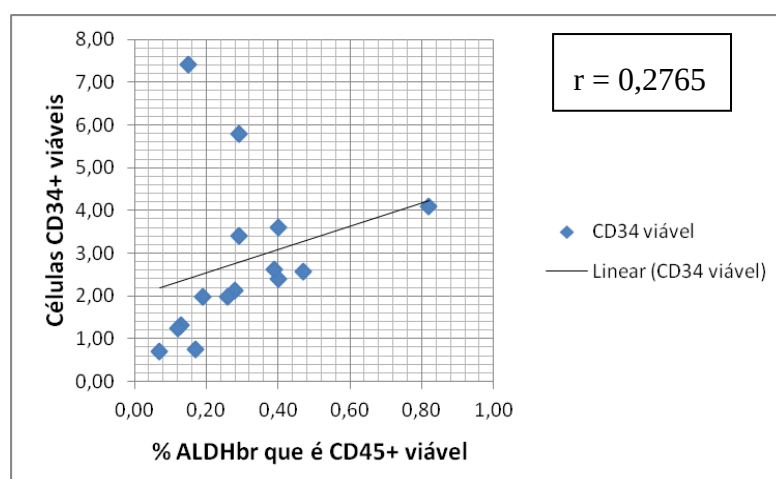


Figura 9: Correlação entre células $CD34^{+}$ viáveis e as células $ALDH^{br}/CD45^{+}$ viáveis. A avaliação da viabilidade das células $CD34^{+}$ e a quantificação das células $ALDH^{br}/CD45^{+}$ foi realizada por citometria de fluxo. Correlação linear com coeficiente de Pearson. % = porcentagem.

O coeficiente de correlação entre a porcentagem das células $ALDH^{br}/CD45^{+}$ viáveis e a quantificação das CFU da bolsa pós criopreservação/descongelamento foi $(r) = 0,3106$ com $p = 0,2598$. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 10, Tabela suplementar E1 (Apêndice E) e Tabela suplementar F1 (Apêndice F)**.

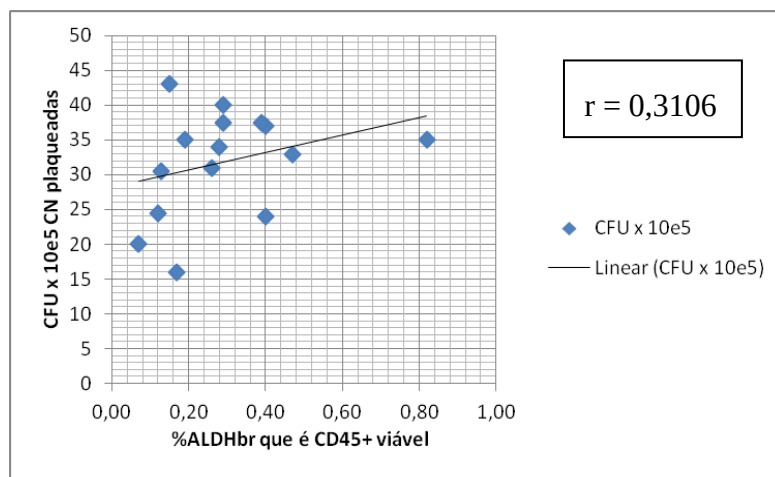


Figura 10: Correlação entre o número absoluto de células ALDH^{br} CD45+ viáveis e a quantificação de CFU-GM. A quantificação ALDH^{br}CD45+ viáveis foi realizada por citometria de fluxo. Para a quantificação das CFU-GM, a suspensão celular foi plaqueada em metilcelulose e incubada. Após 12 a 14 dias, foi realizada a leitura e contadas às colônias com mais de 40 células. CFU= Unidade formadora de colônia. % = porcentagem. Correlação linear com coeficiente de Pearson.

O coeficiente de correlação entre as células CD34+ viáveis e o CFU da bolsa pós-criopreservação/descongelamento foi $(r) = 0,7182$ com $p = 0,0026$. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 11, Tabela suplementar D1 (Apêndice D) e Tabela suplementar F (Apêndice F)**.

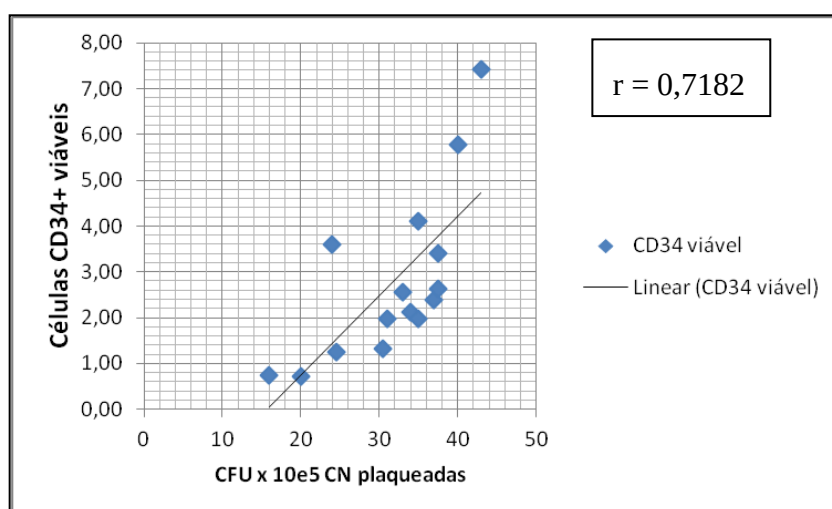


Figura 11: Correlação entre o número absoluto de células CD34+ viáveis e a quantificação do CFU-GM da bolsa. A quantificação das células CD34+ viáveis foi realizada por citometria de fluxo. Para a quantificação das CFU-GM, a suspensão celular foi plaqueada em metilcelulose e incubada. Após 12 a 14 dias, foi realizada a leitura e contadas as colônias com mais de 40 células. CFU = Unidade formadora de colônia. % = porcentagem. Correlação linear com coeficiente de Pearson.

5.4 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO

A quantificação das CN foi realizada na bolsa pré-criopreservação, pós-criopreservação, segmento distal, medial e proximal. Os resultados encontrados foram, respectivamente, $8,3 (\pm 1,9) \times 10^8$; $8,2 (\pm 2,0) \times 10^8$; $7,9 (\pm 2,0) \times 10^8$; $8,1 (\pm 2,0) \times 10^8$; $9,1 (\pm 2,4) \times 10^8$ ($p=0,0003$). O pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni identificou que não houve diferença estatística entre a bolsa pré e os segmentos distal, medial e a bolsa pós. Identificou também que não houve diferença estatística entre a bolsa pós e os segmentos medial e proximal (**Figura 12 e Tabela suplementar C4[Apêndice C]**).

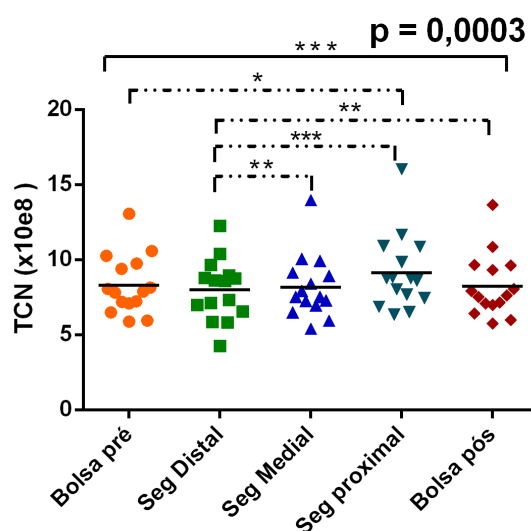


Figura 12: Quantificação das células nucleadas. A quantificação das células nucleadas na bolsa pré-criopreservação, segmento distal, segmento proximal, bolsa 20 e 5 mL foi realizada por contador de célula automatizado; TCN= total de células nucleadas. Medidas repetidas ANOVA; _____ média; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$.

A recuperação das CN (%) foi de $96,4 (\pm 14,5)$ no segmento distal; $98,3 (\pm 5,8)$ no medial; $109,8 (\pm 10,9)$ no proximal e de $98,8 (\pm 3,1)$ na bolsa pós-criopreservação ($p = 0,0010$). O pós-teste de múltiplas comparações de Turkey-Kramer identificou que não houve diferença estatística entre o segmento distal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento e entre o segmento proximal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento. (**Figura 13 e Tabela suplementar C5 [Apêndice C]**).

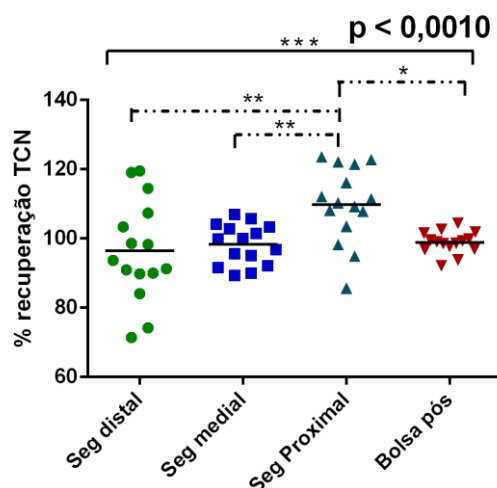


Figura 13: Avaliação da recuperação das células nucleadas dos segmentos e bolsa pós-criopreservação/descongelamento. A recuperação das células nucleadas foi calculada considerando o número absoluto das células nucleadas inferido pela contagem de células do segmento distal, medial, proximal e da bolsa pós-descongelamento. Medidas repetidas ANOVA com pós-teste de Tukey-Kramer de Comparações Múltiplas. _____ média; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$; * = $P < 0,05$; % = porcentagem; TCN = total de células nucleadas.

A viabilidade das CN foi verificada por citometria de fluxo (7-AAD) no segmento proximal e nas bolsas. A viabilidade na bolsa pré foi de $98 (\pm 2,2) \%$; no segmento proximal de $66,3 (\pm 11,8) \%$; na bolsa 20 mL de $76,5 (\pm 11,6) \%$ e de $75,9 (\pm 13,6) \%$ na bolsa 5 mL ($p < 0,0001$). O pós-teste de múltiplas comparações de Turkey-Kramer identificou que não houve diferença estatística entre o segmento proximal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento e entre o segmento proximal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento. (**Figura 14 e Tabela suplementar C6 [Apêndice C]**).

A quantificação das células CD34⁺ realizada na bolsa pré-criopreservação, segmento proximal e na bolsa pós-criopreservação foi, respectivamente, $3,3 (\pm 2,0) \times 10^6$; $1,6 (\pm 2,6) \times 10^6$ e $2,7 (\pm 1,5) \times 10^6$ ($p=0,0305$). O pós-teste de múltiplas comparações de Turkey-kramer identificou que não houve diferença entre o segmento distal e a bolsa pós-criopreservação/ descongelamento e entre o segmento proximal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento. (**Figura 15 e Tabela suplementar D3 [Apêndice D]**).

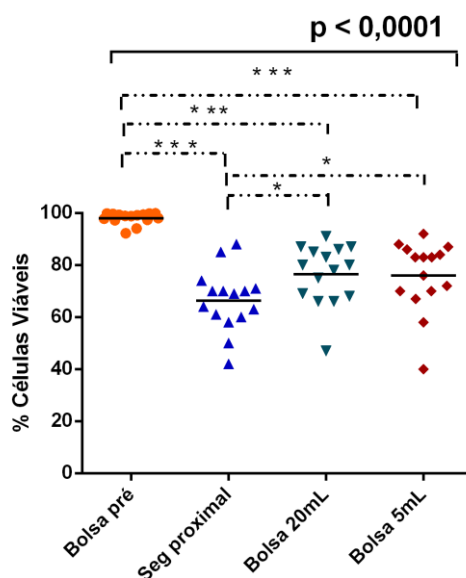


Figura 14: Avaliação da viabilidade das células nucleadas dos segmentos e das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento. A viabilidade das células nucleadas da bolsa pré, segmento proximal, bolsa 20 e 5 mL foi avaliada por citometria de fluxo (7AAD); Medidas repetidas ANOVA com pós teste Teste Tukey-Kramer de Comparações Múltiplas; _____ média; *** = $p < 0,001$; * = $P < 0,05$; % = porcentagem; Seg. = segmento.

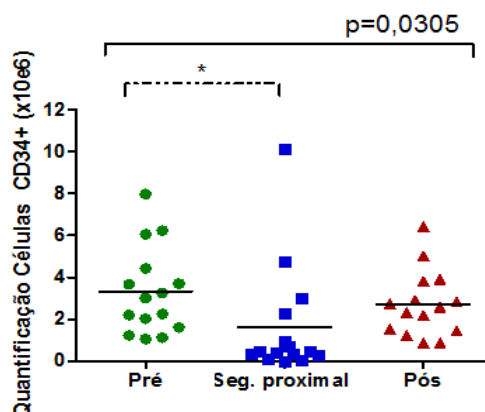


Figura 15: Quantificação das células CD34+ no segmento proximal e nas bolsas pré e pós-criopreservação. A quantificação das células CD34+ na bolsa pré, segmento proximal, bolsa pós-criopreservação/descongelamento foi avaliada por citometria de fluxo; Medidas repetidas ANOVA com pós-teste Tukey-Kramer de Comparações Múltiplas; _____ média; * = $P < 0,05$.

A mediana de células CD34+ viáveis, considerando amostra da bolsa pré-criopreservação, segmento proximal, bolsas de 20 e 5 mL pós-criopreservação/descongelamento foi, respectivamente, 99,5 (94-100); 75 (35-93); 89 (75-100); 80 (66-99); ($p < 0,0001$). O pós-teste de múltiplas comparações de Dunn identificou que não houve diferença estatística entre a bolsa pré-criopreservação e a bolsa de 20 mL, entre o segmento proximal e as bolsas de 20 mL e 5 mL. **(Figura 16 e Tabela suplementar D4 [Apêndice D]).**

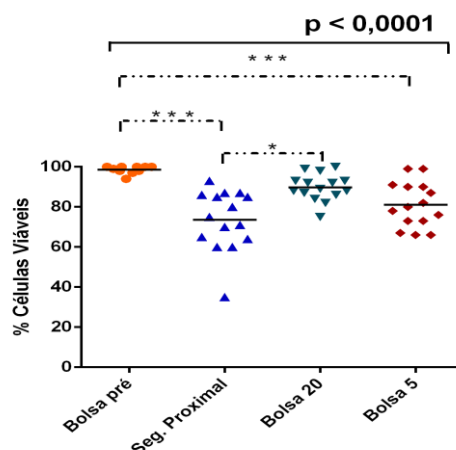


Figura 16: Mediana de células CD34+ viáveis no segmento proximal e bolsa pré e pós-criopreservação/descongelamento. A viabilidade da bolsa pré (N=10), segmento proximal (N=15), bolsa 20 e 5 mL pós-descongelamento (N=15) foi analisada por citometria de fluxo (7AAD). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn de Comparações Múltiplas; _____ mediana; *** = $p < 0,001$; * = $P < 0,05$; % = porcentagem; Seg.=segmento.

A quantificação das unidades formadoras de colônia dos segmentos distal, medial e na bolsa pós-criopreservação/descongelamento foi respectivamente de 2,0 (0-35); 3,0 (0-30) e 33,5 (16-43) ($p < 0,0001$). O pós-teste de Dunn identificou que não houve diferença estatística entre o segmento distal e medial. **Figura 17 e Tabela suplementar E1 (Apêndice E).**

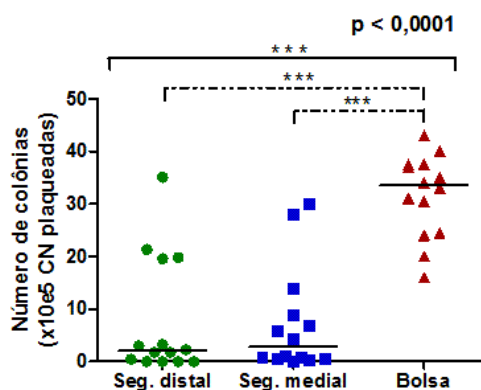


Figura 17: Quantificação das CFU-GM nos segmentos e bolsa pós-criopreservação/descongelamento. Para a quantificação das CFU-GM, a suspensão celular foi plaqueada em metilcelulose e incubada. Após 12 a 14 dias, foi realizada a leitura e as colônias com mais de 40 células foram contadas; Teste de Friedman com pós-teste de Dunn; _____ mediana; *** = $p < 0,001$; Seg. = segmento.

A quantificação de células ALDEFLUOR *bright* no segmento proximal e na bolsa de 5 mL pós-criopreservação/descongelamento foi, respectivamente, 0,33 ($\pm 0,17$) e 0,30 ($\pm 0,18$) ($p = 0,2592$). **(Figura 18 e Tabela suplementar F [Apêndice F]).**

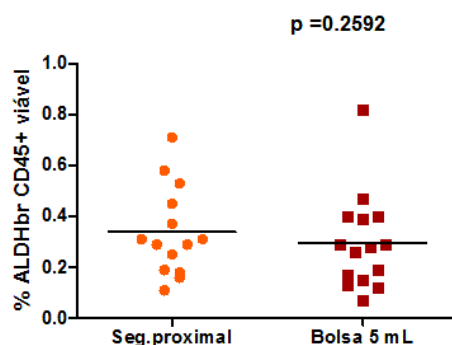


Figura 18: Quantificação das células ALDH^{br}/CD45⁺ viáveis no segmento e na bolsa pós-criopreservação/descongelamento. A quantificação das células ALDH^{br}/CD45⁺ viáveis do segmento proximal e da bolsa 5 mL pós-descongelamento foi realizada por citometria de fluxo. Teste t Pareado; _____ média % = porcentagem; Seg. = Segmento.

O coeficiente de correlação entre as células ALDEFLUOR *bright* no segmento proximal e na bolsa de 5 mL pós-criopreservação/descongelamento foi (r) = 0,5478 com p = 0,0426 (**Figura 19 Tabela suplementar F1 [Apêndice F]**)

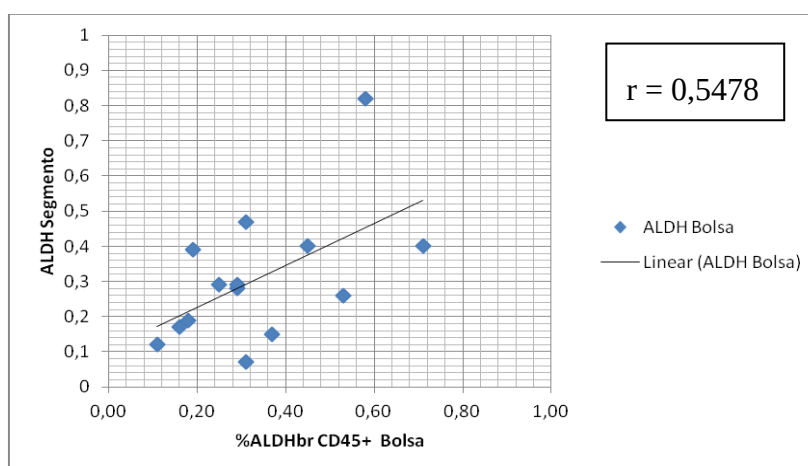


Figura 19: Correlação entre células ALDH^{br}/CD45⁺ da bolsa e do segmento proximal. A quantificação das células ALDH^{br}/CD45⁺ viáveis foi realizada por citometria de fluxo. Correlação linear com coeficiente de Pearson; % = porcentagem.

O coeficiente de correlação entre as células nucleadas da bolsa e do segmento proximal pós-criopreservação/descongelamento foi (r) = 0,9399 com p < 0,0001 (**Figura 20 e Tabela suplementar C4 [Apêndice C] e Tabela suplementar F1 [Apêndice F]**).

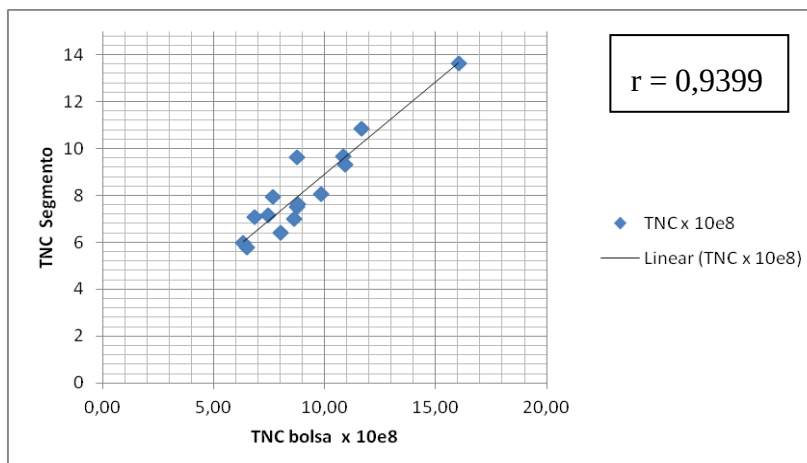


Figura 20: Correlação entre as células nucleadas da bolsa e segmento proximal. A quantificação das células nucleadas foi realizada por contador automático de células. TCN: Total de células nucleadas. Correlação linear com coeficiente de Pearson.

O coeficiente de correlação entre as CFU-GM da bolsa e do segmento medial pós-criopreservação/descongelamento foi $(r) = 0,2984$ com $p = 0,2800$. (**Figura 21 e Tabela suplementar E1 [Apêndice E]**).

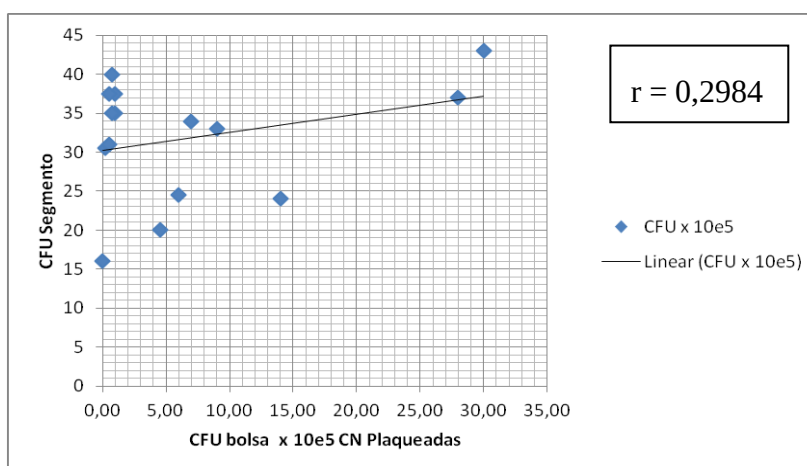


Figura 21: Correlação entre o número total de CFU-GM da bolsa e segmento medial. A suspensão celular foi plaqueada em metilcelulose e incubada. Após 12 a 14 dias, foi realizada a leitura e contadas às colônias com mais de 40 células. CFU= Unidade formadora de colônia. Correlação linear com coeficiente de Pearson.

O coeficiente de correlação entre quantificação das células CD34+ da bolsa e do segmento pós-criopreservação/descongelamento foi $(r) = 0,3383$ com valor de $p = 0,9047$. (**Figura 22 e Tabela suplementar D3 [Apêndice D]**).

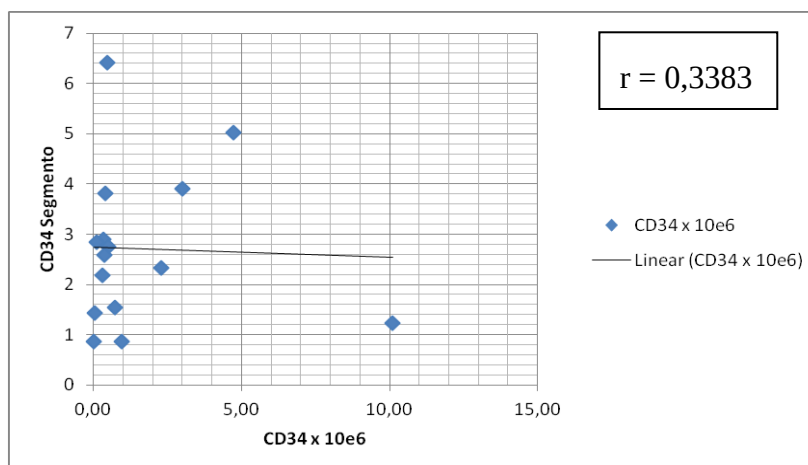


Figura 22: Correlação entre células CD34+ da bolsa e segmento proximal. A quantificação das células CD34+ foi realizada por citometria de fluxo. Correlação linear com coeficiente de Pearson.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o melhor método de preparo da suspensão celular do segmento, comparando o custo, o tempo e a dificuldade para desenvolver a técnica, e validamos a criopreservação/descongelamento do SCUP por meio da comparação dos resultados da quantificação do TCN, das células CD34+ e das CFU-GM, além da avaliação da viabilidade das células nucleadas totais e das CD34+ das bolsas pré e pós-congelamento, bem como da correlação entre o conteúdo do segmento e da bolsa. Processo este exigido pela legislação brasileira RDC 56 (ANVISA, 2010) e órgãos internacionais de acreditação como o FACT e a AABB.

6.1 AVALIAÇÃO DA MELHOR METODOLOGIA PARA A PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR

Para definir o melhor método de preparo da suspensão celular do segmento foram avaliados os parâmetros: custo; tempo necessário para desenvolver a técnica; dificuldade técnica e o resultado obtido (crescimento das colônias).

Na análise do parâmetro custo encontramos pequena diferença entre a suspensão celular pura, diluída e lavada. Essa pequena diferença é justificada pelos custos não quantificados, como os indiretos (equipamentos, recursos humanos, energia, etc.) e os relativos à utilização de albumina humana que foi doada, o que subestimou o custo principalmente da técnica lavada por utilizar maior volume da solução de ressuspensão que a técnica diluída.

No parâmetro tempo utilizado na realização da técnica foi verificado que houve diferença no tempo de execução das três técnicas ($p < 0,0001$), sendo a técnica lavada, a mais demorada (**Tabela 1**). Esse resultado era o que esperávamos, já que nesta técnica a amostra é submetida à centrifugação por 10 min. Além disso, há o tempo gasto para a centrífuga parar e o de ressuspensão da amostra. O estudo foi desenvolvido durante a rotina, para refletir a realidade do laboratório.

Quanto ao parâmetro dificuldade técnica a lavada é mais complexa devido à utilização de equipamentos, além disso, são utilizados mais passos para a execução da técnica necessitando maior treinamento da equipe.

Quanto ao crescimento de colônias foi constatado maior crescimento com a amostra lavada seguido da diluída e menor crescimento de colônias com a amostra pura (mediana 0,89) ($p <$

0,0061). Este resultado era esperado devido à remoção das células mortas no momento da lavagem da suspensão celular. Foi observado também a ausência de crescimento de colônias no ensaio clonogênico nas três metodologias utilizadas (pura, diluída e lavada) nos SCUPs 339, 548, 657 e 672 (**Tabela 2**). Esse resultado pode ser explicado pelo número de células plaqueadas (3×10^5 CN/mL), que na nossa experiência foi muito baixo para ensaios com células descongeladas.

Regan e colaboradores analisaram a viabilidade celular e a recuperação das CFU-GM, CD34+, CN amostras de SCUP, pura, diluída e lavada imediatamente após o descongelamento e em intervalos de 2, 8, 24, 32 e 48h. Os autores relataram que a recuperação das CFU foi melhor preservada ao longo do tempo nas técnicas diluída e lavada em relação à amostra pura (REGAN, D. M. *et al.*, 2010).

Assim, após análise entre as três técnicas, concluímos que a melhor técnica para o preparo da suspensão celular do segmento para realizar o ensaio clonogênico pós-criopreservação/descongelamento é a diluída.

6.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAMENTO DO SCUP

Para validar a metodologia de criopreservação e descongelamento do SCUP avaliamos a quantificação e a recuperação de células nucleadas e das células CD34+ totais e viáveis pós-criopreservação e descongelamento, em relação às células pré-criopreservação e se houve crescimento de unidades formadoras de colônia em alíquota obtida do produto pós-criopreservação e descongelamento.

A quantificação do número das CN analisadas na bolsa pré e pós não apresentou diferença $p = 0,3388$ (**Figura 4A**), o que evidencia que não houve perda celular nesse processo. Entretanto, quando avaliamos quantificação das CN viáveis verificamos diferença entre estes dois grupos ($p < 0,0001$) (**Figura 5**). Esses dados demonstram, como esperado, que uma parcela das células nucleadas morre em decorrência do processo de criopreservação e descongelamento. Estudos anteriores encontraram valores semelhantes quando avaliaram o SCUP pós-descongelamento (SOLVES, P. *et al.*, 2004; LEE, H. R. *et al.*, 2014; ANAGNOSTAKIS, I. *et al.*, 2014).

Não houve diferença na quantificação absoluta das células CD34+ totais das bolsas pré [$3,32 (\pm 2,7) \times 10^6$] e pós-criopreservação/descongelamento [$3,2 (\pm 2,12) \times 10^6$] ($p = 0,4455$) (**Figura 6A**), o que corrobora com a hipótese de que esse método é efetivo no quesito recuperação celular, visto

que não há perda no número absoluto de células. Porém, quando analisamos a quantificação das células CD34+ viáveis encontramos diferença ($p = 0,0063$) (**Figura 6B**), e recuperação das CD34+ viáveis pós-criopreservação e descongelamento de 85,6 ($\pm 13,7$) % o que demonstra que uma parcela dessas células também morre durante esse processo, mas em menor proporção do que as nucleadas em geral, cuja recuperação de células viáveis foi 76 ($\pm 11,6$) % (**Figura 7**). Anagnostakis e colaboradores encontraram porcentagem de recuperação das CN e das células CD34+ de 79 e 91%, respectivamente (ANAGNOSTAKIS, I. *et al.*, 2014). A recuperação das células CD34+ mais elevada em relação às CN pode ser explicada devido à solução crioprotetora (DMSO) que não é adequada para a criopreservação de monócitos e granulócitos que, por sua vez, não resistem ao congelamento e descongelamento e morrem (WADA, R. K. *et al.*, 2004).

Quanto ao parâmetro CFU-GM, houve crescimento em todas as bolsas de SCUP analisadas (**Figura 8**). Barker e colaboradores consideram que para ter sucesso no transplante a unidade de SCUP deve apresentar recuperação CD34+ viáveis igual ou acima de 75% e que o crescimento das CFU-GM esteja presente (BARKER, J. N.; BYAM, C.; SCARADAVOU, A., 2011), parâmetros que foram alcançados em todas as amostras avaliadas nesse trabalho.

Com base no exposto concluímos que o processo de criopreservação e descongelamento das unidades de SCUP encontra-se validado.

6.3 AVALIAÇÃO DO ALDEFLUOR COMO UM MÉTODO EFICAZ PARA AVALIAR A FUNÇÃO DAS CTH DO SCUP

O critério utilizado para a avaliação do ALDH^{br} em nosso estudo foi embasado nos dados de Kurtzberg (2012). Naquela ocasião, a quantificação das células ALDH^{br} foi colocada como um teste relevante para a liberação da unidade de SCUP para o transplante pelo BSCUP por ela coordenado. A pesquisadora relatou que os critérios utilizados naquela ocasião para a liberação da unidade SCUP para transplante no BSCUP da Universidade de Duke eram: viabilidade das CN do segmento > 40%, porcentagem de ALDH^{br}/CD45+ viável > 0,1% e apresentar crescimento das CFU-GM. Ela também apresentou dados nos quais correlacionou a quantificação das células ALDH^{br} com a taxa de enxerto, encontrados por meio da análise retrospectiva dos dados do seu serviço: para uma porcentagem de células ALDH^{br}/CD45+ entre 0,0 e 0,01 a taxa de enxertia é de 33.33%; para uma

porcentagem entre 0,1 - 0,2 a taxa de enxertia é de 88%; para uma porcentagem entre 0,2 - 0,3 a taxa de enxertia é de 93% e para uma porcentagem acima de 0,3 de 100% (informação verbal)¹. Por sua vez, Lee e colaboradores (2014) descrevem como resultado do seu estudo que a avaliação do ALDH^{br} fornece evidência rápida e razoável de qualidade, juntamente com a quantificação das células CD34+ e do TCN (LEE, H. R. *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, encontramos porcentagem acima de 0,1% de ALDH^{br}/CD45+ em 14 (93%) das 15 bolsas analisadas. Contrariamente ao que esperávamos, não encontramos correlação entre a quantificação das ALDH^{br}/CD45+ viáveis e a quantificação das células CD34+ ou das CFU-GM (**Figuras 8 e 9**), mas esta foi observada entre a quantificação das células CD34+ e o crescimento CFU-GM na bolsa pós-criopreservação (**Figura 10**), Yamamoto e colaboradores (2011) descreveram resultados similares aos nossos quando avaliaram a correlação entre as células de CD34+ e o CFU-GM pós-descongelamento no grupo teste ($r = 0,430$; $p = 0,068$ e grupo controle ($r = 0,706$; $p = 0,001$).

Acreditamos que a ausência de correlação entre as células ALDH^{br}/CD45+ viáveis e a quantificação das células CD34+ ou das CFU-GM encontradas no nosso trabalho decorreu das dificuldades técnicas que tivemos na realização do teste. Realizamos o procedimento técnico do ALDEFLUOR, tanto no setor de criobiologia como no setor de citometria de fluxo, somente seguindo a orientação do fabricante (bula) sem treinamento prévio. Além disso, neste período houve troca de um funcionário no setor de citometria. Como a realização desta técnica é relativamente nova na prática clínica no exterior e, no Brasil, não se tem conhecimento de outros BSCUP que estejam utilizando-a, optamos por desenvolver essa metodologia em nosso banco por acreditar, juntamente com pesquisadores internacionais (Dra. Joanne Kurtzberg, Dra. Hye Ryun Lee, Dr. Kevin Shoulars e seus colaboradores (2014), que a atividade enzima aldeído desidrogenase reflete no potencial hematopoético e que, no futuro, ela poderá se tornar um marcador de qualidade para a liberação de unidades de SCUP para transplante, gerando maior agilidade.

¹ Informação fornecida por Dra. Joanne Kurtzberg no congresso da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT do inglês International Society of Cellular Therapy), em 2012.

6.4 AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O PRODUTO CONTIDO NA BOLSA E NO SEGMENTO

Para avaliar se o produto contido no segmento corresponde ao da bolsa, utilizamos parâmetros como: a quantificação e a avaliação da viabilidade das células nucleadas e das CD34⁺, a quantificação das CFU-GM e a avaliação do ALDH^{br} no segmento e na bolsa.

A quantificação das CN realizada na bolsa pré-criopreservação, pós-criopreservação, segmento distal, medial e proximal foi diferente $p=0,0003$ (**Figura 12**). Neste parâmetro foi observado que a recuperação média das CN do segmento proximal foi acima de 100% ($109,8 \pm 10,9$). Isso pode ser explicado pelo posicionamento desse segmento no momento da selagem, o qual favorece uma maior concentração celular em relação dos outros dois segmentos, por conta da força gravitacional. Outro fator que pode ter contribuído foi à lavagem desse segmento com solução de ressuspensão após a retirada das células, etapa que não foi realizada nos demais segmentos, cujo conteúdo foi somente aspirado. Entretanto, observamos que houve forte correlação entre as CN do segmento proximal e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento (**Figura 20**).

A quantificação do CD34⁺ totais e viáveis no segmento proximal e nas bolsas de 5 mL e 20 mL (**Figuras 15 e 16**) foi diferente. Foi observado que o número absoluto e a avaliação das células CD34⁺ viáveis são maiores na bolsa que no segmento. A causa da discordância desses resultados pode estar relacionada à velocidade do congelamento e ao preparo/ descongelamento do segmento. (DE VOS, J. *et al.*, 2014).

Na quantificação das unidades formadoras de colônia nos segmentos e bolsa verificamos um crescimento menor nas alíquotas obtidas dos segmentos que nas obtidas da bolsa (**Figura 17**). No segmento distal o crescimento foi menor que no medial, que pode ser justificada pela falta de habilidade para a obtenção da amostra ou pelo menor número de células plaqueadas (3×10^5 CN/mL no segmento medial versus 6×10^5 CN/mL na bolsa).

Encontramos semelhante situação quando avaliamos a porcentagem das CN viáveis da bolsa e dos segmentos (**Figura 14**). A menor porcentagem de CN viáveis no segmento pode ser explicada devido ao seu menor volume. Consequentemente, o segmento é submetido a uma variação mais abrupta da temperatura tanto no momento da criopreservação quanto no do descongelamento, o que pode ter provocado a morte celular. Outro fator a ser considerado é a difícil homogeneização da suspensão celular contida no segmento no momento da criopreservação/descongelamento e da retirada das amostras para as análises (DE VOS, J. *et al.*, 2014). Além disso, devemos lembrar que

o agente criopreservante DMSO é considerado tóxico para as células em temperatura acima de 4°C (RUBINSTEIN, P., 1995). Em estudo anterior foi encontrada recuperação das células CD34+ viáveis na bolsa e no segmento com valores próximo ao encontrado nesse estudo, 80 (± 14) %, 74 (± 16) %, respectivamente (RODRIGUEZ, L. *et al.*, 2005).

Na avaliação da porcentagem de células ALDH^{br}/CD45+ viáveis no segmento e bolsa encontramos uma correlação fraca (r) = 0,5478 com p = 0,0426 (**Figura 19**). Shoulars e colaboradores (2014) encontraram boa correlação entre o número de células ALDH^{br}/CD45+ viáveis e a quantificação das CFU [r] = 0,81] e também entre as células CD34+ viáveis em relação a essa quantificação [r] = 0,73] mas não encontraram correlação entre as células CD34+ viáveis e as CFU [r] = 0,30], testes esses realizados comparando as células contidas no segmento com as células das unidades de SCUP (SHOULARS, K. *et al.*, 2014).

No presente estudo, dentre os parâmetros avaliados, foi encontrada correlação entre a quantificação das células CD34+ e das CFU-GM da bolsa e do segmento pós-criopreservação/descongelamento (**Figura 11**), entre a quantificação das células ALDH^{br}/CD45+ (**Figura 19**), e entre quantificação do TCN o qual apresentou a melhor correlação entre o segmento e a bolsa pós-criopreservação/descongelamento (**Figura 20**).

Após análise dos resultados deste estudo, e principalmente pela boa recuperação das células nucleadas e das CD34+ viáveis e o crescimento da CFU-GM em todas as bolsas pós-criopreservação/descongelamento, conforme exigido pelas normas técnicas vigentes, concluímos que o método utilizado para a realização da criopreservação e o descongelamento das unidades de SCUP encontra-se validado, e que o segmento pode ser utilizado como uma ferramenta de controle de qualidade para a seleção da unidade de SCUP para transplante no parâmetro contagem de células nucleadas.

7 CONCLUSÕES

- A melhor metodologia para o preparo da suspensão celular do segmento para realizar o ensaio clonogênico pós-criopreservação/descongelamento é a técnica diluída.
- Os resultados obtidos como a recuperação do TCN, CD34+ e o crescimento da CFU-GM em todas as bolsas pós-criopreservação/descongelamento indicam que o processo de criopreservação e armazenamento do SCUP do HEMOSC está validado.
- A quantificação das células CD34 +viáveis esta diretamente relacionada com a quantificação das CFU-GM, por isso, este teste pode ser usado como indicador de função das CTHs.
- A técnica enzima aldeído desidrogenase é factível, porém precisamos de mais habilidade com técnica tanto na preparação da amostra como na quantificação na citometria de fluxo.
- A quantificação do TCN entre segmento e a unidade de SCUP estão fortemente correlacionadas e esse teste pode ser utilizado como parâmetro de qualidade para selecionar a bolsa de SCUP para o transplante.
- Os parâmetros, CD34+, ALDH^{br} e CFU-GM foram consistentemente maiores nas bolsas do que nos segmentos. Sendo assim, os nossos dados corroboram a máxima que “um bom segmento significa uma bolsa boa, mas, um mau segmento não significa uma bolsa ruim,” e sugerem que esses parâmetros podem ser utilizados para o controle de qualidade da unidade de SCUP antes do transplante, desde que cuidadosamente avaliados.

REFERÊNCIAS

ANAGNOSTAKIS, I. *et al.* Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. **Transfusion**, v. 54, p. 211-223, 2014.

AZEVEDO, M. R. A. **Hematologia Básica**: fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. 5. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2013. 269 p.

BALLEN, K.; GLUCKMAN, E.; BROXMEYER, H. E. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. **Blood**, p. 491-498, jul. 2013.

BALLEN, K. Challenges in Umbilical Cord Blood Stem Cell Banking for Stem Cell Reviews and Reports. **Stem Cell Rev and Rep**, v. 6, p. 8-14, 2010.

BARKER, J. N.; BYAM, C.; SCARADAVOU, A. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. **Blood**, v. 117, n. 8, p. 2332-2339, 2011.

Bone Marrow Donors Worldwide. Disponível em: <http://www.bmdw.org/index.php?id=statistics_cordblood>. Acesso em: 26 ago. 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC n. 56, de 16 de Dezembro de 2010**. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoiético (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 dez. 2010. Seção 1, p. 113.

CASTRO JR., C. G.; GREGIANIN, L. J.; BRUNETTO, A. L. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. **J. Pediatr.**, v. 77, n. 5, 345-60, 2001.

CHEUNG, A. M. S. *et al.* Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. **Leukemia**, v. 21, p. 1423-1430, 2007.

DE VOS, J. *et al.* Quality controls on cord blood unit contiguous segments: Recommendation of the SFGM-TC. **Pathol. Biol.**, v. 62, n. 4, p.218-220, ago. 2014.

GLUCKMAN, E. History of cord blood transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, v. 44, p. 621-626, 2009.

GLUGKMAN, E. *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.**, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, 1989.

JACKSON, B. *et al.* Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. **Hum. Genomics**, v. 5, n. 4, p.283-303, maio, 2011.

LEE, H. R. *et al.* Attached segment has higher CD34+ cells and CFU-GM than the main bag after thawing. **Cell Transplant.** 2014. No prelo.

KURTZBERG, J. Enhacing Outcomes of Cord Blood Transplantation. In **International Society of Cellular Therapy - ISCT**, 2012.

LEE, H. R. *et al.* Aldehyde dehydrogenase–bright cells correlated with the colony-forming unit–granulocyte-macrophage assay of thawed cord blood units. **Transfusion**, p. 1871-1875, jul. 2014.

LIOZNOV, M. V. *et al.* Aldehyde dehydrogenase activity as a marker for the quality of hematopoietic stem cell transplants. **Marrow Transplant.**, v. 35, p. 909-914, 2005.

OKAMOTO, O. K.; CAMPOS, A. H. Perspectivas em terapia celular: células-tronco. **Einstein**, v. 2, n. 4, p. 355-358, 2004.

PAGE, K. M. *et al.* Total colony forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. **Bio. Blood Marrow Transplant.**, v. 17, n. 9, p. 1362-1374, set. 2011.

PEDRASSA, P.; HAMERSCHLAK, N. Transplante de células tronco de sangue de cordão umbilical. **Prática Hospitalar**, v. 55, p. 98-102, 2008.

QUEROL, S. *et al.* Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. **Bone Marrow Transplant.**, v. 45, p. 970-978, 2010.

REDE BRASILCORD. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2627>. Acesso em: 24 fev. 2014.

REGAN, D. M. *et al.* Comparison of cord blood thawing methods on cell recovery, potency, and infusion. **Transfusion**, v. 50, p. 2670-2675, 2010.

RODRIGUES, C. *et al.* Transplante de sangue de cordão umbilical – SCUP. **Rev. Bras. de Hematol. Hemoterap.**, v. 32, n. 1, p. 8-12, 2010.

RODRIGUEZ, L. *et al.* Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v.11, n. 4, p. 247-251, abril 2005.

RUBINSTEIN, P. *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 1565-1577, 1998.

RUBINSTEIN, P. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 10119-10122, 1995.

RUBINSTEIN, P. *et al.* Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Blood**, v. 81, p. 1679-1690, 1993.

SCARADAVOU, A. *et al.* Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. **Blood**, p. 752-758, jan. 2013.

SHOULARS, k. *et al.* Creation of a segment-based aldehyde dehydrogenase assay as a biomarker for umbilical cord blood potency. **Biol. Blood Marrow Transplant**, v. 16, n. 263, p.S255, 2010

SHOULARS, K. *et al.* Experience in a public cord blood bank using a segment- based aldehyde dehydrogenase assay as a biomarker for umbilical cord blood potency. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, v. 20, n. 277, p.184-210, 2014.

SILVA JÚNIOR, F. C.; ODONGO, F. C. A.; DULLEY, F. L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Rev. Bras. de Hematol. Hemoterap.**, São José do Rio Preto, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2009.

SOLVES, P. *et al.* Utility of bag segment and cryovial samples for quality control and confirmatory HLA typing in umbilical cord blood banking. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 26, p. 413-418, 2004.

SPELLMAN, S. *et al.* Guidelines for the development and validation of new potency assays for the evaluation de umbilical cord blood. **Cytotherapy**, v. 13, p. 848-855, 2011.

STORMS, R .W. *et al.* Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. **Proc. Natl. Acad.**, v. 96, p. 9118-9123, 1999.

WADA, R. K. *et al.* Cord blood units collected at a remote site: a collaborative endeavor to collect umbilical cord blood through the Hawaii Cord Blood Bank and store the units at the Puget Sound Blood Center. **Transfusion**, p. 111-118, 2004.

YAMAMOTO, S. *et al.* Quality of long-term cryopreserved umbilical cord blood units for hematopoietic cell transplantation. **Int. J. Hematol.**, p. 99-105, jan. 2011.

YOO, K. H. *et al.* The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. **Bone Marrow Transplant.**, v. 39, p. 515-521, 2007.

APÊNDICE A - CUSTO POR TÉCNICA

Tabela suplementar A - Custo por técnica

Material	Custo unitário (R\$)	Pura		Diluída		Lavada	
		Q ^{de}	Custo (R\$)	Q ^{de}	Custo (R\$)	Q ^{de}	Custo (R\$)
Agulha 21 g	0,49	1,00	0,49	1,00	0,49	1,00	0,49
Agulha de insulina	0,49	1,00	0,49	1,00	0,49	1,00	0,49
Agulha Metil 16 g	7,96	1,00	7,96	1,00	7,96	1,00	7,96
Lenços umedecidos álcool 70%	0,19	2,00	0,38	2,00	0,38	2,00	0,38
Meio de cultura Metil celulose	143,33	1,00	143,33	1,00	143,33	1,00	143,33
Placa de Petri 100x20 mm	1,53	1,00	1,53	1,00	1,53	1,00	1,53
Placa de Petri 35x10 mm	0,82	3,00	2,46	3,00	2,46	3,00	2,46
Ponteira 0,20 mL – pacote com 200 und.	0,37	-	-	1,00	0,37	1,00	0,37
Ponteira 0,500 mL – pacote com 200 und.	1,18	-	-	1,00	1,18	1,00	1,18
RPMI 0,300 ml	0,27	-	-	1,00	0,27	1,00	0,27
Seringa 5 mL	0,14	1,00	0,14	1,00	0,14	1,00	0,14
Seringa de insulina	18,00	1,00	0,18	1,00	0,18	1,00	0,18
Solução de ressuspensão 200 mL	24,87	-	-	0,80	0,10	12,20	1,52
Tubo cônico	0,40	1,00	0,40	1,00	0,40	1,00	0,40
Tubo de polipropileno 15 mL	0,36	-	-	1,00	0,36	2,00	0,72
Custo total por técnica			157,36		159,28		161,42

Und.: unidade; **Q^{de}:** quantidade.

APÊNDICE B - ENSAIO CLONOGÊNICO CONSIDERANDO HEMACITÔMETRO

Tabela suplementar B - CFU-GM x 10⁵ CN plaqueadas considerando hemacitômetro

SCUP	PURA	DILUÍDA	LAVADA
338	48,27	142,50	125,80
339	0,00	0,00	0,00
503	17,52	78,30	47,50
507	1,63	0,83	5,00
540	10,10	127,50	89,17
548	0,00	0,00	0,00
561	0,00	1,67	0,00
575	0,67	3,33	1,67
582	7,32	81,67	99,17
584	12,84	19,17	46,67
604	0,49	3,33	3,33
657	0,00	0,00	0,00
663	1,12	4,17	3,33
665	4,92	1,67	20,00
672	0,00	0,00	0,00

SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

APÊNDICE C - CÉLULAS NUCLEADAS TOTAIS E VIÁVEIS

Tabela suplementar C1- Quantificação das células nucleadas Totais x 10⁸

SCUP	Bolsa Pré	Bolsa Pós
338	10,25	9,62
339	7,81	7,93
503	8,14	7,50
507	5,87	5,98
540	13,06	13,64
548	5,95	5,76
561	9,39	9,33
575	9,74	9,65
582	10,57	10,85
584	7,19	7,16
604	6,49	6,40
657	8,06	8,05
663	7,23	7,07
665	7,87	7,63
672	7,09	6,99

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário.

Tabela suplementar C2 - Quantificação das células nucleadas viáveis x 10⁸

SCUP	Bolsa Pré	Bolsa Pós
338	10,24	6,58
339	7,79	5,44
503	7,91	5,35
507	5,43	2,73
540	12,94	9,09
548	5,80	3,87
561	9,20	7,80
575	9,70	8,48
582	10,44	8,75
584	7,18	6,27
604	6,44	5,42
657	7,58	7,00
663	7,07	6,17
665	7,78	6,04
672	7,05	5,63

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário.

Tabela suplementar C3 - Recuperação das células nucleadas totais e viáveis (%)

SCUP	CN TOTAIS	CN VIÁVEIS
338	99,9	68,0
339	99,8	69,0
503	97,2	75,0
507	92,2	47,0
540	99,1	66,0
548	97,4	66,0
561	98,0	83,0
575	99,6	91,0
582	98,8	80,0
584	99,8	86,0
604	99,3	85,0
657	94,0	87,0
663	97,8	87,0
665	98,9	78,0
672	99,4	80,0

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; **CN** = células nucleadas.

Tabela suplementar C4 - Quantificação das células nucleadas da bolsa pré e pós-criopreservação/descongelamento e segmentos distal, medial e proximal

SCUP	Bolsa Pré	Seg. Distal	Seg. Medial	Seg. Proximal	Bolsa Pós
338	10,25	8,62	9,15	8,78	9,62
339	7,81	8,94	7,92	7,67	7,93
503	8,14	8,74	8,41	8,78	7,50
507	5,87	6,99	5,41	6,35	5,98
540	13,06	12,24	13,97	16,03	13,64
548	5,95	4,25	5,94	6,50	5,76
561	9,39	8,57	9,93	10,91	9,33
575	9,74	8,77	8,92	10,85	9,65
582	10,57	10,39	10,05	11,66	10,85
584	7,19	6,54	6,96	7,44	7,16
604	6,49	5,83	6,49	8,02	6,40
657	8,06	9,64	7,25	9,84	8,05
663	7,23	7,13	7,53	6,86	7,07
665	7,87	5,84	7,52	8,82	7,63
672	7,09	7,33	7,29	8,61	6,99

SCUP= sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.** = segmento.

Tabela suplementar C5 - Recuperação das de células nucleadas totais (%) da bolsa pós-criopreservação/descongelamento e dos segmentos

SCUP	Seg. Distal	Seg. Medial	Seg. Proximal	Bolsa Pós
338	84,10	89,27	85,66	93,85
339	114,47	101,41	98,21	101,54
503	107,37	103,32	107,86	92,14
507	119,08	92,16	108,18	101,87
540	93,72	106,97	122,74	104,44
548	71,43	99,83	109,24	96,81
561	91,27	105,75	116,19	99,36
575	90,04	91,58	111,40	99,08
582	98,30	95,08	110,31	102,65
584	90,96	96,80	103,48	99,58
604	89,83	100,00	123,57	98,61
657	119,60	89,95	122,08	99,88
663	98,62	104,15	94,88	97,79
665	74,21	95,55	112,07	96,95
672	103,39	102,82	121,44	98,59

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.** = segmento; % = porcentagem.

Tabela suplementar C6 - Viabilidade das células nucleadas (%) da bolsa pré e pós-criopreservação (20 e 5 mL) e segmento proximal

SCUP	Bolsa Pré	Seg. Proximal	Bolsa 20 mL	Bolsa 5 mL
338	99,90	70,00	68,00	70,00
339	99,80	69,00	69,00	67,00
503	97,20	64,00	75,00	58,00
507	92,20	50,00	47,00	40,00
540	99,10	85,00	66,00	70,00
548	97,40	58,00	66,00	72,00
561	98,00	71,00	83,00	86,00
575	99,60	88,00	91,00	76,00
582	98,80	70,00	80,00	83,00
584	99,80	74,00	86,00	92,00
604	99,30	61,00	85,00	83,00
657	94,00	63,00	87,00	87,00
663	97,80	70,00	87,00	88,00
665	98,90	42,00	78,00	84,00
672	99,40	60,00	80,00	83,00

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.** = segmento.

APÊNDICE D - CÉLULAS CD34+ TOTAIS E VIÁVEIS

Tabela suplementar D1 - Quantificação das células CD34+ e CD34+ viáveis ($\times 10^6$) das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento

SCUP	CD34 Pré	CD34 Pós	CD34 Viável Pré	CD34 Viável Pós
338	6,05	5,02	6,04	4,11
339	3,67	3,90	3,66	3,60
503	2,04	2,33	1,98	2,12
507	1,12	0,87	1,03	0,75
540	7,97	8,62	7,89	7,42
548	1,61	1,55	1,56	1,31
561	2,25	2,18	2,21	1,98
575	3,70	3,82	3,69	3,41
582	6,24	6,42	6,16	5,79
584	3,02	2,90	3,01	2,56
604	3,25	2,75	3,22	2,39
657	4,43	2,85	4,17	2,62
663	1,23	1,44	1,20	1,24
665	2,20	2,59	2,18	1,99
672	1,06	0,87	1,06	0,71

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.**= segmento.

Tabela suplementar D2 - Porcentagem das células CD34 viáveis das bolsas pré e pós-criopreservação/descongelamento

SCUP	CD34+ Bolsa pré (%)	CD34+ Bolsa pós (%)
338	99,9	84,0
339	99,8	98,0
503	97,2	99,0
507	92,2	100,0
540	99,1	89,0
548	97,4	88,0
561	98,0	92,0
575	99,6	93,0
582	98,8	92,0
584	99,8	87,0
604	99,3	88,0
657	94,0	93,0
663	97,8	86,0
665	98,9	75,0
672	99,4	82,0

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; % = porcentagem.

Tabela suplementar D3 - - Quantificação das células CD34 x 10⁶ das bolsas pré e pós-criopreservação e segmento proximal

SCUP	Bolsa Pré	Seg. Proximal	Bolsa Pós
338	6,05	4,74	5,02
339	3,67	2,99	3,90
503	2,04	2,28	2,33
507	1,12	0,95	0,87
540	7,97	10,10	8,62
548	1,61	1,56	1,55
561	2,25	2,18	2,18
575	3,70	3,80	3,82
582	6,24	7,35	6,42
584	3,02	2,60	2,90
604	3,25	3,85	2,75
657	4,43	3,25	2,85
663	1,23	0,82	1,44
665	2,20	2,47	2,59
672	1,06	0,86	0,87

SCUP = sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.** = segmento.

Tabela suplementar D4 - Mediana viabilidade das células CD34 (%) na bolsa pré-criopreservação, segmento proximal e bolsa pós-criopreservação (20 e 5 mL)

SCUP	Bolsa Pré	Seg. Proximal	Bolsa 20 mL	Bolsa 5 mL
338	N.R	87	84	73
339	N.R	93	98	99
503	97	85	99	99
507	98	70	100	91
540	N.R	85	89	66
548	N.R	65	88	66
561	94	80	92	73
575	98	87	93	76
582	N.R	71	92	80
584	100	60	87	90
604	100	64	88	78
657	99	35	93	90
663	100	60	86	82
665	100	86	75	87
672	100	75	82	67

N.R = não realizado; **Seg.**= segmento; **SCUP** = sangue de cordão umbilical e placentário.

APÊNDICE E - ENSAIO CLONOGÊNICO

Tabela suplementar E1- CFU-GM x 10⁵ CN plaqueadas da bolsa e segmentos

SCUP	Seg. Distal	Seg. Medial	Bolsa
338	NR	1	35
339	0,00	14	24
503	19,58	7	34
507	0,47	0	16
540	35,09	30	43
548	0,00	0,25	30,5
561	1,78	0,75	35
575	2,27	1	37,5
582	21,30	0,75	40
584	19,83	9	33
604	3,03	28	37
657	0,00	0,5	37,5
663	3,29	6	24,5
665	1,78	0,5	31
672	0,00	4,5	20

SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg.** segmento.

APÊNDICE F - TOTAL CÉLULAS ALDHBR/CD45+

Tabela suplementar F1 - Total células ALDH^{br} /CD45+ segmento e bolsa

SCUP	Seg. Prox.	Bolsa 5 mL
338	0,58	0,82
339	0,45	0,40
503	0,29	0,28
507	0,16	0,17
540	0,37	0,15
548	NR	0,13
561	0,18	0,19
575	0,25	0,29
582	0,29	0,29
584	0,31	0,47
604	0,71	0,40
657	0,19	0,39
663	0,11	0,12
665	0,53	0,26
672	0,31	0,07

SCUP= sangue de cordão umbilical e placentário; **Seg. Prox.** = segmento proximal.

APÊNDICE G - JUSTIFICATIVA PARA A NÃO UTILIZAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, JANETE LOURDES CATTANI BALDISSERA, abaixo assinada, pesquisadora responsável pelo projeto título: AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES METODOLOGIAS DE REALIZAÇÃO DOS TESTES DE CONTROLE DE QUALIDADE DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO CRIOPRESERVADO, que tem por objetivo validar o método de criopreservação e de ressuspensão das bolsas de SCUP e analisar as diferentes metodologias de realização dos testes de controle de qualidade do produto final utilizando o segmento ligado à unidade em comparação com o conteúdo interno da bolsa, solicito, perante este Comitê de Ética em Pesquisa, a dispensa da utilização do TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO para a realização desse projeto.

Esse projeto é relevante para a rede pública de sangue de cordão umbilical e placentário (BRASILCORD). Para alcançar os objetivos propostos, serão utilizadas bolsas de sangue de cordão umbilical e placentário que não atingiram os critérios para liberação ao RENACORD e que já foram destinadas ao controle de qualidade, conforme recomendado pela norma técnica que regulamenta os BSCUP (RDC 56 de dezembro de 2010). Os testes realizados nessas bolsas serão usados para verificar a qualidade do produto, validar a metodologia de criopreservação, descongelamento e ressuspensão da unidade de SCUP.

Em respeito à Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde, dentro dos preceitos da bioética, destaca-se a autonomia, direito possibilitado pelo termo de consentimento livre e esclarecido. Contudo, tendo em vista a inviabilidade de localizar os doadores e de se tratar de projeto no qual um dos principais objetivos é a validação de um processo, validação essa obrigatória

pela RDC 56 de dezembro de 2010, que os dados a serem gerados não identificam os sujeitos de pesquisa, que o anonimato e a confidencialidade dos dados serão assegurados em todos os momentos e que, no TCLE, assinado pela mãe no ato da coleta do SCUP, consta a possibilidade do destino da amostra para controle de qualidade, acredito que a aplicação de um TCLE específico para esse projeto pode ser dispensada, sem ferir os preceitos éticos.

Declaro que as informações contidas neste documento são verdadeiras e me responsabilizo pela coleta dos dados e uso científico das informações conforme a Resolução 466/2012.

Atenciosamente,

Janete Lourdes Cattani Baldissera.

APÊNDICE H- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DE SANTA CATARINA - HEMOSC



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação das diferentes metodologias de realização dos testes de controle de qualidade do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado.

Pesquisador: JANETE LOURDES CATTANI BALDISSERA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20268513.6.0000.0110

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 370.248

Data da Relatoria: 19/08/2013

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto é clara e objetiva. Apresenta de forma coerente as etapas de execução, explicitando a importância da pesquisa, seus objetivos e metodologias, observando e respeitando as normas éticas conforme a Resolução 196/96.

Objetivo da Pesquisa:

Validar o método de criopreservação e de ressuspensão das bolsas de SCUP e analisar as diferentes metodologias de realização dos testes de controle de qualidade do produto final utilizando o segmento ligado à unidade em comparação com o conteúdo interno da bolsa.

Analisar a melhor metodologia de preparo da suspensão celular do segmento para realizar o ensaio clonogênico pós-descongelamento;

Avaliar a correlação entre o produto contido na bolsa e no segmento em relação à: quantificação das células nucleadas; viabilidade das células nucleadas e das CD34+; quantificação das unidades formadoras de colônias granulócitos-macrófagos; quantificação de células Aldefluor bright.

Validar a metodologia de criopreservação e descongelamento do SCUP avaliando: a recuperação de células nucleadas viáveis pós-criopreservação e descongelamento, em relação às células pré-criopreservação; a viabilidade das células nucleadas CD34+ pós-criopreservação e descongelamento, em relação às células pré-criopreservação; a recuperação de unidades

Endereço: Av. Othon Gama D'Almeida, nº 756 - Praça D. Pedro I

Bairro: Centro

CEP: 88.015-240

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)-3251-9854

Fax: (48)-3251-9726

E-mail: cep@fns.hemosc.org.br

**CENTRO DE HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DE SANTA
CATARINA - HEMOSC**



Continuação do Parecer: 370.248

formadoras de colônia pós-criopreservação e descongelamento, em relação às células pré-criopreservação. Avaliar o ALDEFLUOR como método eficaz para determinar a função das CTHs do SCUP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A execução do projeto não trará riscos. A pesquisa possibilitará a validação de metodologias de realização dos testes de controle de qualidade do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa proposta é de suma importância, tendo em vista a necessidade de validação e de avaliação das metodologias utilizadas nos testes de controle de qualidade do sangue de cordão umbilical e placentário criopreservado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com o necessário.

Recomendações:

Recomendamos a execução do referido projeto e ao seu término, a socialização do conhecimento construído.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme leitura e análise do projeto, não verificamos inadequações nem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado sem pendências

FLORIANOPOLIS, 26 de Agosto de 2013

Assinatura
Assinador por:
ANDREA THIVES CARVALHO HOEPERS
(Coordenador)

Assinatura
D^{ra} Andréa T. de C. Hoepers
Hematologia - ROE 3535
Hematologia - ROE 3535
Pediatra - ROE 3537
CRMSC 4791

Endereço: Av. Othon Gama D'Almeida, nº 756 - Praça D. Pedro I
Bairro: Centro CEP: 88.015-240
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48-)3251-9854 Fax: (48-)3251-9726 E-mail: cep@fns.hemosc.org.br