UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
MESTRADO PROFISSIONAL EM HEMOTERAPIA E BIOTECNOLOGIA

ANA MARIA DO NASCIMENTO COSTA

**Qualificação das unidades de SCUP criopreservadas
no banco de sangue de cordão umbilical e placentário
da Fundação HEMOPE no período de dezembro de
2014 a junho de 2017**

**Ribeirão Preto
2018**

ANA MARIA DO NASCIMENTO COSTA

**Qualificação das unidades de SCUP criopreservadas
no banco de sangue de cordão umbilical e placentário
da Fundação HEMOPE no período de dezembro de
2014 a junho de 2017**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Hemoterapia e Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dra. Maristela Delgado
Orellana

Ribeirão Preto
2018

Nome: COSTA, Ana Maria do Nascimento

Título: Qualificação das unidades de SCUP criopreservadas no banco de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP) da Fundação HEMOPE no período de dezembro de 2014 a junho de 2017

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Hemoterapia e Biotecnologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

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.

Costa, Ana Maria do Nascimento

Qualificação das unidades de SCUP criopreservadas no banco de sangue de cordão umbilical e placentário da Fundação HEMOPE no período de dezembro de 2014 a junho de 2017. Ribeirão Preto, 2010.

82 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador::Delgado Orellana, Maristela.

1.Células Progenitoras Hematopoéticas. 2. Células-tronco hematopoéticas. 3.Transplante de células progenitoras hematopoéticas. 4. Banco de sangue de cordão umbilical e placentário. 5. Criopreservação

Dedicatória

Aos meus pais, Maria Iracema Alves do Nascimento e José Neves do Nascimento, por todo amor dedicado; por priorizarem a educação dos seus filhos acreditando ser este o grande instrumento de transformação;

A minha filha Mariana Nascimento Vieira da Costa, que ao nascer me trouxe uma outra visão de mundo e com quem aprendo até hoje;

Aos irmãos Profs. Drs. Rildo Saraiva de Melo e Gilson Saraiva de Melo (in memoriam), por solidificarem a base da minha formação e paixão pela Hematologia;

A todos os meus professores que, em cada etapa da minha vida escolar e acadêmica, contribuíram para que eu chegasse até aqui;

A todos os meus familiares e amigos pelo apoio durante as minhas ausências e pelas palavras de incentivo, em especial a minha querida irmã Ana Lucia Alves Farfan, que cuidou de tudo e de todos nas minhas ausências;

A Deus, acima de tudo, por tudo o que sou e por preencher minha existência com fé e esperança;

Agradecimentos

A Fundação HEMOPE, Instituição responsável pela complementação da minha formação profissional;

Ao Prof. Dr. Divaldo de Almeida Sampaio, pelo incentivo, pela confiança e pelo comprometimento formal viabilizando a minha participação neste mestrado;

À Profa. Dra. Maristela Delgado pelo profissionalismo, gentileza, generosidade e parceria na orientação deste trabalho;

À Edineide Viana, ex-secretária do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, pelas palavras de incentivo e pela organização de toda a documentação necessária para ingresso neste mestrado;

À Mestre. Niedja Maristone Queiroz por sua sempre valiosa contribuição no desenvolvimento estatístico deste trabalho;

A todos os inesquecíveis amigos de turma de mestrado por todo apoio, companheirismo, incentivo e generosidade;

À equipe do BSCUP/HEMOPE: Dra. Carolina Luisa Cardoso Militão, médica, Dra. Thaís Marques Modesto, biomédica, a José Ricardo Silva e Maria Betânia Silva, Enfermeiros, a Lavosier Quintino de Menezes, Técnico em Manutenção, a Paulo Roberto da Silva, assistente administrativo, sem os quais este trabalho não seria possível.

*“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar
que Deus nela escreva o que quiser”
- Santo Agostinho.*

Resumo

COSTA, A. M. N.. **Qualificação das unidades de SCUP criopreservadas no banco de sangue de cordão umbilical e placentário da Fundação HEMOPE no período de dezembro de 2014 a junho de 2017.** 2018. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Objetivo: Qualificar as primeiras unidades de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP) criopreservadas no Banco de Sangue Umbilical e placentário da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (BSCUP/HEMOPE), no período de dezembro de 2014 a junho de 2017. **Justificativa:** O sangue do cordão é rico em células progenitoras hematopoéticas (CPH), utilizado para transplante e tratamento de patologias benignas e malignas. Avaliar as primeiras unidades coletadas no BSCUP/HEMOPE será de grande valia para sua caracterização, planejamento de ações de melhoria do processo, contribuindo para o aumento da eficácia dos transplantes. **Métodos:** Foram triadas gestantes sem histórico de diagnóstico para doenças transmissíveis pelo sangue, com gestação terminada em recém-nascido (RN) vivo; caracterizadas através das variáveis sociodemográficas: idade, idade gestacional, antecedentes obstétricos e cor da pele dos RN foram caracterizados pelas variáveis explicativas: Gênero e Peso; as amostras das mães foram coletadas no dia do parto ou em até 48h após. O tempo entre o término da coleta e o início da criopreservação da unidade das CPH não excedeu 48 horas. As unidades de SCUP foram avaliadas quanto ao volume, total de células nucleadas (TCN), quantificação de células CD 34+, contagem de eritroblastos viabilidade celular e contaminação microbiológica. Neste estudo foi avaliada a variável “unidades adequadas ao uso em relação ao peso do receptor, tomando com o base o TCN e o peso de um provável receptor, assim categorizados: unidades $<12,5 \times 10^8$ para peso $< 50\text{kg}$ e unidades $>12,5$ para peso $>50\text{kg}$; **Resultados:** Volume Inicial (ml): (min.50,0; max.166,80); Volume final(mL): (min.19,07;max.21,75); TCN pré ($\times 10^8$): (min.6,0;max.27,80);TCN pós($\times 10^8$): (min.5,0; max.22,6); Recuperação Celular (%): (min.0,67; max.39,50); CD34+ ($\times 10^6$): (min.0,67;max.39,50); Viabilidade(%): (min.71,35max.100); **Conclusão:** Das 113 unidades armazenadas, 89 (78,76%) atendem a receptores $< 50\text{kg}$ (crianças) e 24 (21,24%) atendem a receptores $>50\text{k}$ (adultos). O inventário apresentou resultados em conformidades com o especificado na legislação vigente, portanto, qualificadas para atender à demanda transfusional de transplantes de CPH.

Palavras chaves: Células progenitoras hematopoiéticas. Células-tronco hematopoéticas. Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário. Transplante de Células progenitoras hematopoiéticas. Criopreservação.

Abstract

COSTA, A. M. N..COSTA, A. M. N.. **Qualification of cryopreserved SCUP units in the umbilical cord and placental blood bank of the HEMOPE Foundation from December 2014 to June 2017.**..2018. 82f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Purpose: To qualify the first units of cryopreserved Umbilical Cord and Placental Blood (SCUP) in the Umbilical and Placental Blood Bank of the Hematology and Hemotherapy Foundation of the State of Pernambuco (BSCUP / HEMOPE), from December 2014 to June 2017 Rationale: Cord blood is rich in hematopoietic progenitor cells (HPC), used for transplantation and treatment of benign and malignant pathologies. Evaluating the first units collected in the BSCUP / HEMOPE will be of great value for its characterization, planning of actions to improve the process, contributing to increase the efficiency of transplants. **Methods:** Pregnant women with no history of diagnosis for blood-borne diseases were screened, with gestation terminated in live newborn (NB); characterized by the sociodemographic variables: age, gestational age, obstetric history and skin color, NB were characterized by the explanatory variables: Gender and Weight; the samples of the mothers were collected on the day of delivery or within 48 hours after delivery. The time between the end of the collection and the beginning of the cryopreservation of the MHC unit did not exceed 48 hours. SCUP units were evaluated for volume, total nucleated cells (TNC), CD34 + cell count, cell viability erythroblast counts, and microbiological contamination. In this study, the variable “units suitable for use in relation to the weight of the receptor” was evaluated, taking as base the TNC and the weight of a probable receiver, as follows: units $<12.5 \times 10^8$ for weight $<50\text{kg}$ and units $> 12, 5$ for weight $> 50 \text{ kg}$; **Results:** Initial volume (ml): (min.50.0, max.166.80); Final volume (mL): (min.19.07, max.21.75); TCN pre ($\times 10^8$): (min.6,0; max.27,80); TCN post ($\times 10^8$): (min.5,0; max.22,6); Cellular Recovery (%): (min.0.67, max.39,50); CD34 + ($\times 10^6$): (min.0.67, max.39.50); Viability (%): (min.71,35max.100); : Of the 113 stored units, 89 (78.76%) attend to receptors $<50\text{kg}$ (children) and 24 (21.24%) attend receptors $> 50\text{k}$ (adults). **Conclusion:** The inventory presented results in compliance with that specified in current legislation, therefore, qualified to meet the transfusional demand for HPC transplants.

Key Words: Haematopoietic progenitor cells. Haematopoietic stem cells. Blood Bank of Umbilical and Placental Cord. Transplantation of hematopoietic progenitor cells. Cryopreservation

Lista de ilustrações

Figura 1 – Figura - 1 Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas	21
Figura 2 – Figura 2 - Número de transplante de medula óssea, por Estado brasileiro (2016)	26
Figura 3 – Figura 3 - Distribuição dos BSCUPs no Brasil	31
Figura 4 – Figura 4 - Estrutura do cordão umbilical	36
Figura 5 – Figura 5 - Distribuição dos BSCUPs no Brasil	38
Figura 6 – Figura 6 - Locais de coleta das unidades de SCUP	49
Figura 7 – Figura 7 - Caracterização das Gestantes Quanto à Cor da Pele	50
Figura 8 – Figura 8 - Caracterização das Gestantes quanto à Paridade	51
Figura 9 – Figura 9 - Classificação sanguínea das doadoras de SCUP	52
Figura 10 – Figura 10 – Análise do perfil de hemoglobinas das doadoras de SCUP	53
Figura 11 – Figura 11 - Classificação sanguínea dos RN	54
Figura 12 – Figura 12 – Análise do perfil de hemoglobinas dos RN	55
Figura 13 – Figura 13 – Análise do gênero dos RN	56
Figura 14 – Figura 14 - Total de Células Nucleadas Unidades de SCUP Pós Processamento	59
Figura 15 – Figura 15 - Quantificação CD 34+ nas Unidades de SCUP Pós Processamento	60
Figura 16 – Figura 16 - Contagem de Eritroblastos nas Unidades de SCUP	61
Figura 17 – Legenda	74
Figura 18 – Ficha com dados da Mãe e RN	75
Figura 19 – Ficha com dados da Mãe e RN	76
Figura 20 – Ficha com dados da Mãe e RN	77
Figura 21 – Ficha com dados da Mãe e RN	78
Figura 22 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	80

Lista de tabelas

Tabela 1 – Tabela 1 - Número de transplantes de medula óssea, por Estado, durante o ano de 2016 no Brasil	24
Tabela 2 – Tabela 2 - Indicações para transplantes de células-tronco hematopoéticas em 2012	27
Tabela 3 – Tabela 3 - Número de BSCUPs públicos e privados no Brasil em 2016	31
Tabela 4 – Parâmetros Analisados nas Unidades de SCUP Armazenadas . . .	56

Lista de abreviaturas e siglas

ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
BSCUP	Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
CMV	Citomegalovirus
CTH	Células Tronco Hematopoiéticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
GVHD	Graft versus host disease/Doença Enxerto x Hospedeiro
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HLA	Human Leucocyte Antigen /Antígenos Leucocitários Humanos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Performance)
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
IMIP	Instituto de Medicina Interna de Pernambuco
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rede BrasilCord	Rede Nacional de Bancos Públicos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas
SC	Seleção de Características

SCUP	Sangue de Cordão Umbilical e Placentário
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMO	Transplante de Medula Óssea

Sumário

1	Introdução	15
1.1	Caracterização, propriedades e aplicação das células progenitoras hematopoéticas (CPHS)	16
1.2	Hematopoese	18
1.3	Caracterização das células-tronco hematopoéticas	21
1.4	Transplantes de medula óssea no Brasil	24
1.5	Bancos de sangue de cordão umbilical - origem e legislação	29
1.6	Captação/ triagem das doadoras e coleta de unidades de SCUP	33
1.7	Volume total de SCUP coletado	36
1.8	Processamento e criopreservação de SCUP	38
2	OBJETIVO GERAL	40
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	JUSTIFICATIVA	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	Aspectos Éticos	42
4.2	Dados descritivos das doadoras de SCUP	42
4.3	Captação/ triagem das doadoras de SCUP	42
4.4	Coleta de SCUP	43
4.5	Processamento e criopreservação das unidades de SCUP	44
4.6	Análise dos parâmetros nas unidades de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP)	45
4.6.1	Análise do volume das unidades de SCUP	46
4.6.2	Análise do número de células nucleadas	46
4.6.3	Quantificação das células CD34 positivas e análise da viabilidade celular	46
4.6.4	Contagem de eritroblastos	47
4.6.5	Análise das hemoglobinas anormais	47
4.6.6	Determinação da tipagem ABO e RHD de unidades de SCUP e de doadoras	47
4.6.7	Análise microbiológica	48
4.6.8	Análise Estatística	48
5	RESULTADOS	49
5.1	Local de coleta das unidades de SCUP	49
5.2	Caracterização sociodemográfica das gestantes	50
5.2.1	Idade e período gestacional das doadoras de SCUP	50

5.2.2	Cor da pele das doadoras de SCUP	50
5.2.3	Paridade das doadoras de SCUP	51
5.2.4	Classificação sanguínea das doadoras de SCUP	51
5.2.5	Análise do perfil de hemoglobinas das doadoras de SCUP	52
5.3	CARACTERIZAÇÃO SÓCIODEMOGRÁFICA DOS RECÉM NASCIDOS (RN)	53
5.3.1	Classificação sanguínea dos RN	53
5.3.2	Perfil de hemoglobinas dos RN	54
5.3.3	Classificação gênero e avaliação do peso dos RN	55
5.4	ANÁLISE DESCRITIVA DAS UNIDADES DE SCUP	56
5.4.1	Análise do volume	58
5.4.2	Análise do total de células nucleadas	58
5.4.3	Análise da quantificação de células CD34+	59
5.4.4	Análise da contagem de eritroblastos	61
5.4.5	Análise da viabilidade celular	62
5.4.6	Análise Microbiológica	62
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÃO	67
	Referências	69
	APÊNDICES	71
	APÊNDICE A – APÊNDICE A - ENDEREÇO DOS CURRÍCULOS LATTES DOS PESQUISADORES	72
	ANEXOS	73
	ANEXO A – Ficha com dados da Mãe e RN	74
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	80

1 Introdução

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação por divisão mitótica assimétrica e simétrica. Normalmente, as células-tronco são submetidas a repetidas divisões de células assimétricas intrinsecamente determinadas, as quais produzem uma filha diferenciada (progenitora) e outra filha que ainda é uma célula-tronco. As divisões simétricas permitem que o tamanho do pool de células-tronco seja regulado por fatores que controlam a probabilidade de autorrenovação contra divisões diferenciadoras, ou seja, as células-tronco possuem propriedades de autorrenovação e potencial de diferenciação (MORRISON; SHAH; ANDERSON, 1997).

Com base na sua origem as células-tronco classificam-se em embrionárias e adultas. As células-tronco embrionárias são oriundas da massa interna de embriões em fase de pré-implante. Este tipo de célula é capaz de formar todas as camadas germinativas embrionárias (ectoderma, endoderma e mesoderma). As células-tronco adultas encontram-se espalhadas em vários tecidos e órgãos com capacidade de produzir ao menos um tipo de linhagem funcional diferenciada, podem ser obtidas a partir do sangue do cordão umbilical, medula óssea ou sangue periférico. Presente em tecidos e órgãos específicos em todo o corpo adulto, são capazes de realizar divisões assimétricas, multiplicarem-se por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que, um pequeno número pode originar uma grande população semelhante, repondo o pool de células progenitoras possuem também capacidade de se diferenciar em células especializadas de um tecido específico (AMORIN et al., 2014).

Quanto ao potencial de diferenciação as células-tronco classificam-se em Totipotente, Pluripotente, Multipotente e Unipotente. As células totipotentes têm a capacidade de produzir todos os tipos de células (1-3 d da fertilização do oócito), estas células têm a capacidade de formar todos os tecidos de um indivíduo adulto e inicialmente se multiplicam em células idênticas, portanto, o zigoto é a única célula de mamífero capaz de reproduzir todas as células e tecidos de um organismo sendo assim considerado totipotente. As células pluripotentes, tal como a massa celular interna dos blastocistos (dias 4-14 após a fertilização dos oócitos), podem gerar todos os tipos de células excluindo linhagem extra de trofoblasto embrionário. As células-tronco multipotentes têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células dentro de uma linhagem particular e as células-tronco unipotentes, são definidas como células que têm a competência de se diferenciar em apenas uma linhagem celular (SOBHANI et al., 2017).

As células-tronco não são apenas unidades de organização biológica, responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração de sistemas de tecido e órgãos, mas também são unidades em evolução por seleção natural. São geralmente definidas

como células clonogênicas capazes de autorrenovação e diferenciação multilinhagem. As células-tronco podem ser divididas em um subconjunto de longo prazo, capazes de autorrenovação indefinida, bem como um subconjunto de curto prazo que se autorrenova por um intervalo definido. As primeiras células-tronco na ontogenia são totipotentes, estendendo-se do zigoto para a massa celular interna do blastocisto, logo a seguir, as células-tronco totipotentes dão origem a células somáticas/células progenitoras e células-tronco primitivas.

Pouco se sabe sobre as etapas que as células-tronco somáticas apresentam entre o estágio de blastocisto e o surgimento de tecido e células-tronco específicas de órgãos no estágio de nêurula. Estudos, portanto, sugerem a possibilidade de existência de células-tronco hematopoética de curto prazo (CTH-CP) com capacidade definida de autorrenovação e células-tronco de longo prazo (CTH- LP) com indefinida capacidade de renovação (WEISSMAN, 2000).

As principais características das células-tronco que as tornam extremamente atraentes para a terapia celular são a capacidade acima mencionada de autorrenovação, ou seja, sua capacidade de se multiplicar, permanecendo indiferenciada, permitindo uma substituição constante e ativa das populações celulares nos tecidos e sua capacidade potencial de diferenciação em uma variedade de tipos de células distintas de células-tronco são, portanto, células indiferenciadas e, como tal, apresentam características que as tornam candidatas à utilização terapêutica.

1.1 Caracterização, propriedades e aplicação das células progenitoras hematopoéticas (CPHS)

O estudo dos organismos vivos desde a sua fase embrionária até o seu pleno desenvolvimento, passando por suas diversas fases de evolução, mostra que as células-tronco hematopoéticas (CTHs) localizam-se inicialmente no saco vitelino, posteriormente este papel passa a ser do fígado fetal e, em seguida, a medula óssea fetal passa a ser o principal sítio.

O sangue de cordão umbilical possui CTHs, que podem ser evidenciadas através de ensaio clonogênico, técnica de cultivo e diferenciação celular "*in vitro*", em meios enriquecidos, denominados unidade formadora de colônia (CFU), assim denominadas: unidade formadora de colônia para granulócito e macrófago (CFU-GM), unidade formadora de blasto para Eritrócito (BFU-E) e unidade formadora de colônia para megacariócito (CFU-GEMM). O crescimento destas células nestes meios de cultivo demonstra a capacidade de autorrenovação e de multipotencialidade das mesmas (BROXMEYER et al., 1989).

As células-tronco hematopoéticas, apresentam antígeno CD34 em sua superfí-

cie, sendo este seu principal marcador, embora outros marcadores e corantes sejam utilizados, atualmente estas células são definidas como CD34+, CD38-, CD33-Thy-1low, CD71-, CD45RA^{low}, lin-(ausência de marcadores linhagem-específicos), Rh 123^{low}, (corante fluorescente rodamina 123), Ho 33342^{low} (corante de ácido nucléico). Outro marcador recentemente descrito é o CD133. Estes conjuntos de marcadores de superfície têm sido explorados para o isolamento das CTHs por citometria de fluxo, porém nenhuma das combinações é definitiva na identificação de uma população pura de CTHs (ZAGO; COVAS, 2006).

Durante a formação do embrião grupos de células adquirem características especializadas, enquanto vão restringindo sua capacidade de diferenciação, nos tecidos adultos existem reservas de células capazes de se multiplicar e se diferenciar no tipo de tecido a que pertencem, mantendo ao mesmo tempo células indiferenciadas. Essas células-tronco tecido-específicas são responsáveis pela integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação de órgãos. Não se sabe ao certo se as células têm capacidade ilimitada de diferenciação ou de formar múltiplos tecidos, ou seja, se existem células pluripotentes, as mesmas devem ser muito raras e difíceis de isolar.

As células pluripotentes, por sua vez se tornam mais especializadas e com restrita capacidade de diferenciação passando a chamar-se de multipotentes ou células adultas aptas à reparação e manutenção tecidual, possuem grande capacidade de autorrenovação e comprovado potencial proliferativo, capazes de se diferenciar em células progenitoras das diversas linhagens hematológicas e reconstituir a hematopoese (VIGORITO; SOUZA, 2009) .

As células-tronco multipotentes (MSCs) por sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em diversas linhagens celulares são elementos chaves na reparação de tecidos e defesa do organismo. Utilizadas em diversos tratamentos de distúrbios entre eles cardíacos e neurais. Este tipo de célula-tronco pode produzir outra linha de células, a pesar disso tem alguma limitação na sua capacidade de diferenciação. Por exemplo, os MSCs do cérebro podem gerar células neurais diferentes e glia ou células estaminais hematopoiéticas que podem se diferenciar na maioria das células sanguíneas, mas não têm a capacidade de produção das células cerebrais. A medula óssea, além disso, consiste em MSCs que podem se diferenciar para todas as formas de células sanguíneas, estas são consideradas como células estaminais adultas devido à sua limitada capacidade de diferenciação. Outro tipo de célula-tronco bastante estudado são as células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em diversos tecidos como ósseo, muscular, cartilaginoso, adiposo entre outros. Possuem receptores de quimiocina e são atraídas para o local da lesão atraídas pela quantidade crescente de quimiocinas liberadas pelo tecido lesado(SOBHANI et al., 2017) .

1.2 Hematopoese

Denomina-se Hematopoese o processo de renovação celular do sangue por meio de processos de divisões celulares mitóticas, dando origem aos diversos tipos de células do sangue a partir das células-tronco. Este processo inclui: a autorregeneração das células-tronco; a restrição da progênie das células-tronco a uma única linhagem celular; a proliferação e diferenciação das células precursoras em células maduras funcionais. Para que este processo ocorra é necessário a existência de um microambiente normal, capaz de sintetizar fatores de crescimento necessários à sobrevivência das células progenitoras, com capacidade de acomodar as células em desenvolvimento e que favoreça as interações entre os diferentes tipos celulares.

A hematopoese na vida intrauterina se inicia nas ilhotas sanguíneas do saco vitelino e nas primeiras semanas de gestação é praticamente restrita à eritropoese. Após a 6ª a 8ª semana de gestação, o fígado fetal assume este papel e passa a ser o principal sítio da hematopoese até aproximadamente metade da gestação, os eritrócitos aqui produzidos são menores que os produzidos nas ilhotas sanguíneas e são anucleados. A partir do 5º mês de gestação a medula óssea passa a ser o principal órgão da hematopoese. Ao final da gestação todo o espaço intramedular passa a ser ocupado por células hematopoéticas.

Os órgãos hematopoéticos são divididos em: estroma e células hematopoéticas. O estroma possui o microambiente que favorece ao crescimento e diferenciação das células hematopoéticas, regula a hematopoese por meio de fatores solúveis ou pelas interações célula-célula ou célula-matriz extracelular. O estroma é constituído por um componente celular representado por fibroblastos, adipócitos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais dos sinusóides medulares e um componente acelular representado pela matriz extracelular, esta composta por proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas produzidas pelas células estromais. As células progenitoras hematopoéticas possuem receptores para estas macromoléculas e se ligam a sítios específicos do estroma, o que se acredita contribua para a regulação da sua proliferação e diferenciação.

O espaço medular é preenchido por um complexo de seios venosos, cujos sinusóides são formados por uma camada contínua de células endoteliais revestidas por uma camada descontínua de células reticulares. Células adiposas situam-se adjacentes aos sinusóides. Todas as células participam da hematopoese secretando fatores solúveis e como reserva de lipídeos necessários às células em proliferação.

A hematopoese é restrita ao espaço extravascular. As células maduras passam para o sangue atravessando o citoplasma das células endoteliais. Estudos *in vitro* demonstram que estas células são capazes de manter a proliferação de células hematopoéticas a longo prazo secretando citocinas como G-CSF, GM-CSF, M-CSF, ligante

do kit interleucina 6 (IL6) e ligante do FLK-2.

Células-tronco possuem capacidade de reconstruir a hematopoese a longo prazo e de forma completa em animais que sofreram processo de irradiação, ao se dividirem de forma assimétrica dão origem a uma nova célula-tronco e a uma célula precursora comprometida com uma linhagem específica. A maior parte das células progenitoras encontra-se na forma quiescente, ou seja, na forma G_0 do ciclo celular, acredita-se que um pool destas células permaneça constante ao longo da vida. A maior parte das células-tronco reside na medula óssea, no entanto, estudos mostram que um pequeno número destas células ou unidades semelhantes pode ser encontrado no sangue periférico.

Células Precursoras originadas da divisão das células-tronco se caracterizam pela perda do potencial de autorregeneração e pelo comprometimento com uma determinada via de diferenciação, isto foi demonstrado através de cultura celular em presença de fatores de crescimento onde células precursoras inicialmente são capazes de originar colônias multilinhagens (precursores multilinhagem), mas à medida que se dividem e se diferenciam tornam-se mais restritas uma única linhagem (precursores unilinhagem). As células Precursoras são geralmente designadas como Unidades Formadoras de Colônias (CFU, colony-forming units).

A figura 1 mostra um esquema da diferenciação da hematopoese. Nela também estão representados os mais importantes fatores de crescimento para a proliferação das células-tronco e dos precursores de linhagens múltiplas que são o ligante Kit, GM-CSF, G-CSF, CSF, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11, IL-12 e o ligante Fit-3. Os fatores de crescimento são glicoproteínas secretadas pelas células estromais que atuam na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. Sua ação tem como resultado o recrutamento de células-tronco, proliferação e diferenciação dos precursores intermediários comprometidos com mais de uma linhagem. Para a diferenciação de linhagens únicas são necessários fatores específicos.

A mielopoese, processo de formação das células granulocíticas (eosinófilos, basófilos e neutrófilos), a partir da UFC-G (unidade formadora de colônias granulocítica), denominadas G-CFC para neutrófilos, E-CFC para eosinófilos, B-CFC para basófilos. Todas essas etapas se passam na medula óssea. Na regulação da linhagem da mielopoese atuam em um amplo espectro de colônias a IL-3 e o GM-CSF, no entanto, para o desenvolvimento de colônias mielóides maduras granulocíticas (CFU-G) e monocíticas (CFU-M) é necessária a adição de G-CSF e M-CSF. O fator de crescimento GM-CSF inibe a migração, aumenta a atividade fagocítica e induz a citotoxicidade dependente de anticorpos (antibody-dependent cytotoxicity, ADCC) dos polimorfonucleares, já o G-CSF induz a síntese de superóxido e estimula também a ADCC dos neutrófilos e o M-CSF ativa macrófagos maduros.

A eritropoese, processo de produção de eritrócitos, também denominados como hemácias ou células vermelhas do sangue, responsáveis pelo transporte de oxigênio e gás carbônico é regulado pela eritropoietina, responsável pela maturação de células restritas à linhagem eritróide. Sua produção é regulada pelo teor de Oxigênio no sangue arterial que irriga as células peritubulares no córtex renal. A eritropoietina atua sobre a CFU-E e BFU-E, aparentemente modulando a apoptose. O ligante Kit, a IL-3 e o GM-CSF também participam da regulação da proliferação e diferenciação das BFU_E.

A linfopoese (processo de formação dos linfócitos T e B) é regulada pela IL-7 e IL-6 as quais exercem importante função na proliferação dos precursores de linfócitos B, enquanto que as IL-2 e IL-3 são relevantes aos precursores T.

A megacariocitopoese, que é o processo de formação das plaquetas. Este processo *in vitro* é regulado por fatores que atuam nos precursores multilinhagem, como I-3, IL-6, GM-CSF e ligante Kit, sendo que o número de unidades formadoras de megacariócitos (CFU-MK) depende diretamente da presença e combinação destes fatores. Já *in vivo* a produção de plaquetas é controlada pelo número de plaquetas no sangue periférico, a qual não afeta a produção destes fatores. O fator responsável por esta modulação é a Trombopoetina (TPO) produzida principalmente no fígado (ZAGO; COVAS, 2006)

A regulação da hematopoese é multifatorial e suas vias são influenciadas por múltiplos circuitos de amplificação e inibição dos quais participam células hematopoéticas e não-hematopoéticas.

As células hematopoéticas sanguíneas, diferente de outros órgãos vitais exibem características próprias, tais como: tempo de vida relativamente curto, multiplicidade de tipos celulares e grande dispersão no organismo. Entre as células sanguíneas são reconhecidas duas linhagens: a linfóide que inclui os linfócitos B, T e NK (natural killer) e a mielóide que inclui os eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), todas estas células são originadas de um precursor comum, através de várias etapas de maturação, a célula progenitora hematopoética (CPH).

Figura 1 – Figura - 1 Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas

Fonte: Livro Hematologia Fundamentos e Práticas de ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R.

A presença ou frequência de uma célula-tronco e progenitoras em uma amostra pode ser realizada “in vitro” através de ensaios funcionais. O estabelecimento de culturas de células de medula óssea “in vitro” foi um passo decisivo na elucidação de características funcionais destas células. Neste tipo de ensaio clonogênico, as células são cultivadas em meios enriquecidos que resultam em diferentes tipos de precursores hematopoéticos. Estes ensaios caracterizam a célula “in vitro” quanto a sua multipotencialidade e proliferação, no entanto o padrão-ouro para a determinação da atividade destas células consiste no seu potencial de colonização in vivo. O conhecimento sobre elas ainda é parcial embora seja consenso a sua heterogeneidade em relação ao tamanho, densidade e perfil antigênico(MORRISON; SHAH; ANDERSON, 1997)

1.3 Caracterização das células-tronco hematopoéticas

Diversos estudos mostram o papel da medula óssea como fonte de célula-tronco hematopoéticas, estas células são multipotentes e possuem capacidade de autorrenovação para todos os tipos celulares sendo caracterizadas pela seleção LKS (Lin – c-Kit+Scal), sendo também caracterizadas pelo receptor de adesão CD 34, que é uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 110 Kd expressa nas CPH, nas células endoteliais dos vasos de pequeno calibre e nos fibroblastos embrionários.

Células CD34 positivas representam 1,5 a 3,0% das células mononucleares da medula óssea normal e 0,1 a 0,5% das células mononucleares do sangue periférico e 0,33 a 1,98% das células mononucleares. Quando cultivadas, em ensaios clonogênicos, são capazes de gerar todos os precursores das linhagens hematopoéticas. Anticorpos anti CD34 foram produzidos em laboratório com a finalidade de reconhecerem diferentes sítios da molécula de CD34. Atualmente os anticorpos monoclonais são divididos em três classes de acordo com a sensibilidade diferenciada à ação da neuroaminidase, glicoprotease derivada da *Pasteurella hemolytica* e quimiopapaína.

A expressão celular de antígenos de superfície permite avaliar a eficácia da criopreservação e a sua viabilidade uma vez que as células C34+ compreendem todos os progenitores que formam colônias de células granulomonocíticas (CFU-GM), eritróides (BFU-E), megacariocíticas (CFU-MK), multilinhagens (CFU-MIX) e blastos (CFU-blastos), portanto, quanto maior a quantidade de células CD34+ em uma amostra maior a capacidade de recuperação da hematopoese. Não existe um valor ideal para a infusão do material avaliado, muitos serviços recomendam a quantidade mínima de $2,0 \times 10^6$ /kg de peso do receptor, no entanto, a literatura mostra valores que variam de $1,0$ a $2,5 \times 10^6$ /kg do receptor, sem que se consiga demonstrar uma correlação estatística entre a quantidade de células infundidas e o tempo de recuperação medular.

Em laboratório a quantificação das células CD34+ é realizada através da metodologia de citometria de fluxo em dupla plataforma ou em plataforma única. O protocolo ISHAGE (Internacional Society of Hematotherapy and Graft Engineering), em dupla plataforma utiliza quatro parâmetros de citometria de fluxo: CD45PerCP/CD34PE, onde o CD45 segrega os linfócitos e monócitos que poderiam ser confundidos com as células CD 34+ verdadeiras que possuem baixa fluorescência e baixa complexidade. Já o método ISHAGE em plataforma única utiliza beads fluorescentes na sua execução (MASSUMOTO et al., 2014)

Transplantes de células-tronco hematopoéticas

O transplante de medula óssea (TMO) consiste na infusão intravenosa de células progenitoras hematopoéticas. Este procedimento tem por objetivo reestabelecer a função medular nos pacientes com medula óssea danificada ou defeituosa.

O transplante de medula óssea é, portanto, um tratamento que proporciona o reabastecimento de todas as células sanguíneas, através da infusão intravenosa de células progenitoras hematopoéticas, a fim de tratar algumas doenças que afetam as células do sangue, garantindo a reconstituição multilinhagem a longo prazo, representa, em alguns casos, o único tratamento curativo para diversas doenças hematológicas benignas e malignas. Consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficiente, por células normais da medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula saudável. Na medula óssea se localizam as células-tronco hematopoé-

tivas, responsáveis pela geração de todos os elementos figurados do sangue como glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Essas são as células substituídas no transplante de medula. As células-tronco hematopoéticas também circulam no sangue periférico (caso estimuladas com medicamento fator de crescimento), podendo ser coletadas por aférese, e no sangue do cordão umbilical, quando são coletadas após o nascimento do bebê. Por isso, o termo “transplante de medula óssea” tem sido substituído por “transplante de células-tronco hematopoéticas” (JR; GREGIANIN; BRUNETTO, 2018).

As células-tronco hematopoéticas são células com a capacidade única de produzir progenitores celulares mais diferenciados, assim como células filhas, que mantêm a capacidade de autorrenovação. Embora o transplante de células-tronco humano (TCTH) humano seja referido frequentemente como um “transplante de células-tronco”, na verdade o enxerto utilizado no TCTH contém uma mistura de células progenitoras hematopoéticas imaturas e mais maduras, incluindo as células-tronco com capacidade de autorrenovação (VIGORITO; SOUZA, 2009).

Em todo o mundo as células progenitoras hematopoéticas (CPH) utilizadas em transplante são obtidas a partir de três fontes: da medula óssea (MO) por procedimento cirúrgico com o doador sob anestesia, do sangue periférico (SP), por procedimento não cirúrgico de aférese, após a estimulação medular do doador e através da coleta do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) imediatamente após o nascimento do bebê. Em termos de terapêutica, a terapia com CTH é uma das modalidades de terapia celular que mais tem conseguido eficácia ao longo dos anos no tratamento de doenças malignas e benignas em crianças e adultos sendo as principais as leucemias, desordens linfoproliferativas como doença das células plasmáticas, linfomas e tumores sólidos. Entre as doenças não malignas as maiores indicações são as falhas da medula óssea, hemoglobinopatias, doenças do metabolismo, doenças autoimunes entre outras.

Os transplantes de CPH podem ser classificados em: autólogo, onde se coleta as células do próprio paciente para posterior infusão, após regime de condicionamento de quimioterapia e radioterapia; transplante alogênico, aquele onde as células são coletadas de um doador aparentado ou não aparentado e transplante singênico, onde o doador é um irmão gêmeo idêntico, modalidade mais rara devido à baixa frequência destes casos na população. A escolha do tipo de transplante depende basicamente da doença do paciente e da avaliação clínica. O transplante de medula óssea, por exemplo, é rotineiramente usado no tratamento de linfomas e leucemias e certas condições não-malignas, como imunodeficiências congênitas.

Os transplantes autólogos são os realizados com células do próprio receptor. Os transplantes alogênicos guardam o risco de desencadear uma reação enxerto versus hospedeiro, na qual linfócitos transplantados geram uma resposta imune contra os

tecidos do receptor. Em certos casos, como no tratamento de neoplasias, essa reação aumenta a eficiência do tratamento na medida em que os linfócitos transplantados atacam as células neoplásicas remanescentes no receptor (“enxerto versus neoplasia”). Estudos realizados mostram que CTH de medula óssea contêm mais progenitores mielóides do que as CTH de cordão umbilical, além de terem uma atividade mitótica mais intensa e um menor potencial apoptótico. CTH de cordão umbilical, por sua vez, apresentam uma menor dependência de comunicação intercelular com o estroma, apresentam mais células quiescentes e têm um maior potencial de diferenciação celular. Além disso, as CTH de cordão umbilical apresentam um maior potencial de migração do que as CTH de outras fontes, apesar de sua capacidade de adesão celular ser diminuída (CASTRO JR.; GREGIANIN; BRUNETTO, 2001)

1.4 Transplantes de medula óssea no Brasil

A Associação Brasileira de Transplante publicou em 2016 o Relatório Brasileiro de Transplante informando o dimensionamento dos transplantes no Brasil por Estado, no período de 2009 a 2016.

Os dados dos Transplantes de Medula Óssea foram (TMO) foram obtidos de 12 Estados brasileiros, nos quais atuam 61 equipes de transplantes. Segundo o relatório o Estado de São Paulo foi o Estado que mais realizou transplantes (406 alogênicos e 602 autólogos), seguido do estado do Paraná (112 alogênicos e 110 autólogos) e de Pernambuco (70 alogênico e 117 autólogos), os dados referentes aos demais Estados encontram-se descritos na tabela 1 e figura 2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2016)(MEDINA PESTANA SECRETÁRIO et al., 2016).

Tabela 1 – Tabela 1 - Número de transplantes de medula óssea, por Estado, durante o ano de 2016 no Brasil

Número de Transplantes de Medula Óssea, por Estado, durante o ano de 2016 - Brasil

Número de Transplantes de Medula Óssea, por Estado, durante o ano de 2016 - Brasil			
Estado	Alogênico	Autólogo	Total
SP	406	602	1008
PR	112	110	222
PE	70	117	187
MG	53	102	155
DF	29	82	111
BA	25	84	109
RS	48	55	103
CE	30	67	97
RJ	14	57	71
SC	0	69	69
GO	11	34	45
RN	4	6	10
Brasil	802	1385	2187

Fonte: Relatório Brasileiro de Transplantes, por Estado, no período de 2009 a 2016 - ABTMO

Figura 2 – Figura 2 - Número de transplante de medula óssea, por Estado brasileiro (2016)

Fonte: Relatório Brasileiro de Transplantes, por Estado, no período de 2009 a 2016 - ABTMO

A *Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation* (WBMT), considerada a maior organização não governamental, científica, sem fins lucrativos, cuja missão é promover a excelência no transplante de células-tronco, doação de células-tronco e terapia celular, apoiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com quem manteve uma relação de cooperação em atividades desde a sua criação em empreendimentos científicos e educacionais e que participa desde 2012 como membro oficial da OMS, com o status de organização não governamental, atua recolhendo e divulgando dados a nível mundial regularmente.

Em seu quarto relatório emitido em 2012, a WBMT publicou dados referentes à atividade de Transplante de Células-tronco Hematopoéticas recolhidos por 1.566 equipes de 77 países, relatados através de suas organizações regionais de transplantes, os quais foram analisados pela principal indicação, tipo de doador e fonte de células-tronco mostra um aumento no número absoluto de transplantes de 46.563 (20.333 alogênico; 26.230 autólogos) em 2006 para 68.146 (31.926 alogênicos; 36.220 autólogos) em 2012. Comparativamente houve aumento absoluto de 21.583 totais (11.593 alogênicos;

9.990 autólogos) e um aumento relativo de 46% no total (57% alogênico contra 43% autólogo). Segundo o relatório este crescimento deve-se, primeiro ao aumento no número de equipes de 1.327 em 67 países para 1.566 em 77 países declarantes e, segundo por um aumento da atividade de transplante em equipes previamente estabelecidas.

A tabela 2 mostra as principais indicações e tipos de transplantes realizados em 2012. Dos 68.176 transplantes de células progenitoras hematopoéticas, realizados em 2012, 53% foram autólogos e 47% foram alogênicos. O Estudo mostra que, dos 36.220 transplantes autólogos, 290 (1%) foram oriundos da MO, 35.920 (99%) do sangue periférico e 10 foram derivados de SCUP. A indicação mais frequente foram as desordens linfoproliferativas com 36.243 pacientes (53,2% do total de transplantes). As leucemias foram a segunda indicação mais frequente com 24.280 pacientes (36% do total), onde 23.236 (96%) dos pacientes receberam transplante alogênico e 1.044 (4%) autólogo.

Segundo o estudo a proporção de transplante alogênico usando medula óssea como fonte celular foi a mais elevada para os distúrbios não malignos (53%), seguido de leucemias (20%) e foi muito baixa em desordens linfoproliferativas (15%). O uso do sangue do cordão como fonte transplante alogênico foi maior para pacientes com leucemia (71%), seguidos por aqueles com distúrbios não malignos (16%), distúrbios linfoproliferativos (10%) e tumores sólidos (1%). O estudo mostra também um interesse especial pela adoção de uma nova tecnologia emergente, por exemplo, o número de transplantes de doadores familiares ou “haploidênticos” aumentou de 1186 (6%) em 2006 para 3171 em 2012, quando eles constituíram 10% de todos os transplantes alogênicos (NIEDERWIESER et al., 2016).

Tabela 2 – Tabela 2 - Indicações para transplantes de células-tronco hematopoéticas em 2012

	Alogênico	Autólogo	Total	Alogênicos	Autólogos
LEUCEMIAS	23236	1044	24280	95,70%	4,3%
LMA	11122	831	11953	34,84%	2,29%
LLA	5544	149	5693	17,37%	0,41%
LMC	1059	10	1069	3,32%	0,03%

	Alogênico	Autólogo	Total	Alogênicos	Autólogos
SMD, SMD/NMP sobrepostos	3595	18	3613	11,26%	0,05%
NMP	804	2	806	2,52%	0,01%
LLC	815	30	845	2,55%	0,08%
Outras Leucemias	297	4	301	0,93%	0,01%
DESORDENS LINFOPROLIFERATIVAS	4322	31921	36243	11,93%	88,07%
Desordens de Células Plasmáticas - MM	907	16871	17778	2,84%	46,58%
Desordens de Células Plasmáticas - outras	56	719	775	0,18%	1,99%
Linfoma de Hodgkin	664	3579	4243	2,08%	9,88%
Linfoma Não Hodgkin	2695	10752	13447	8,44%	29,69%
Tumores Sólidos	130	2884	3014	0,41%	7,96%
DESORDENS NÃO MALIGNAS	4068	330	4398	12,74%	0,91%
Falha da Medula Óssea – AAS	1608	7	1615	5,04%	0,02%
Falha da Medula Óssea – outras	371	0	371	1,16%	0,00%
Hemoglobinopatias	906	0	906	2,84%	0,00%
Deficiência Imune Primária	738	10	748	2,31%	0,03%

	Alogênico	Autólogo	Total	Alogênicos	Autólogos
Desordens do metabolismo	258	39	297	0,81%	0,11%
Doença Autoimune	25	239	264	0,08%	0,66%
Outras Desordens Não Malignas	162	35	197	0,51%	0,10%
OUTROS	170	41	197	0,53%	0,11%
TOTAL	31926	36220	197	-	-
Abreviaturas = SM: Síndrome Mielodisplásica; MM: Mieloma múltiplo; NMP: Neoplasia mieloproliferativa; LLC: Leucemia Linfocítica Crônica; LMA=Leucemia Mielóide Aguda; AAS= Anemia Aplástica Severa					

Fonte: Relatório da Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBM)- 2012

1.5 Bancos de sangue de cordão umbilical - origem e legislação

O uso de sangue de cordão umbilical como fonte de células progenitoras hematopoéticas (CPH) teve início no final da década de 1960, quando Ende e Ende trataram um paciente de 16 anos de idade portador de uma leucemia linfocítica aguda, com infusão de sangue fresco de cordão umbilical obtido de oito doadores, embora os autores não tenham evidenciado reconstituição medular, observaram uma alteração transitória em antígenos eritrocitários, que sugeria um quimerismo misto a partir de um cordão ou de várias unidades(ENDE; ENDE, 1972).

Estudos pré-clínicos realizados por Koike e Besalduch-Vidal no final de 1970 e início de 1980, comparando o número de células progenitoras hematopoéticas (CPH) na unidade de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) e na medula óssea sugeriram que uma unidade de SCUP poderia conter um número suficiente de CPH para realização de transplante, desde que a coleta fosse realizada em um volume adequado. Koike mostrou também que a unidade de SCUP poderia ser criopreservada sem que houvesse perda significativa da sua viabilidade e capacidade proliferativa(KOIKE, 1993).

Destacam-se também os trabalhos realizados por de Hal Broxmeyer e colaboradores, os quais avaliaram o potencial hematopoético de uma unidade de SCUP “in vitro” e a capacidade de uma única coleta de sangue do cordão possuir um número suficiente de células com capacidade de enxertar um adulto (BROXMEYER et al., 1989; BROXMEYER et al., 1992).

Estes estudos, entre outros, propiciaram a decisão de realização do primeiro transplante realizado em 1988, em Paris, no Hospital Saint-Louis, pela doutora Eliane Gluckman. A paciente, uma criança com diagnóstico de Anemia de Fanconi (FA) foi submetida a um transplante, o qual foi bem-sucedido, comprovando a eficácia deste tipo de procedimento (Gluckman E, 1989).

O sangue de cordão umbilical utilizado em um paciente previamente condicionado, o sangue utilizado neste transplante foi coletado no Estado de Indiana nos Estados Unidos e transportado para Paris criopreservado em nitrogênio líquido e descongelado antes da sua infusão. O paciente teve sua hematopoese regenerada e não desenvolveu doença do enxerto contra o hospedeiro, fato este atribuído à relativa imaturidade imunológica das células presentes no sangue de cordão umbilical (GLUCKMAN, 2009).

O sucesso deste evento mostrou que o sangue de cordão umbilical poderia ser uma fonte alternativa de células progenitoras hematopoéticas, que uma unidade de cordão umbilical possuía células suficientes para recomposição da hematopoese, que a coleta podia ser realizada de forma segura e que o congelamento e descongelamento não interferiram na capacidade proliferativa (GLUCKMAN, 2011).

O sangue de cordão pode ainda ser coletado e criopreservado ficando à espera de um eventual receptor e que Bancos de cordões umbilicais poderiam ser criados com a possibilidade de o seu inventário atender à diversidade genética da população. Surgiu desta forma a necessidade de se armazenar células oriundas do cordão e a possibilidade de ampliar o número de transplantes à população. Em 1993, foi inaugurado o primeiro banco de sangue público de cordão umbilical e placentário nos Estados Unidos, no New York Blood Center (NAVARRETE; CONTRERAS, 2009a).

No Brasil, temos como marco regulatório a Portaria Ministerial 903/ GM de 16/08/2000, a qual regulamenta o funcionamento e cadastramento de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS. O primeiro banco público de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP) foi inaugurado no Instituto do Câncer – INCA, na cidade do Rio de Janeiro em 2001. Em 2004, por força da portaria Nº 2.381, DE 29 DE SETEMBRO, foi criada a Rede Nacional de Bancos Públicos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas – BrasilCord (PORTARIA, 2004).

Esta rede, atualmente, composta por 13 bancos públicos de cordão umbilical e placentários (BSCUP) assim localizados: quatro em São Paulo (dois em São Paulo capital, um em Campinas e um em Ribeirão Preto), um no Rio de Janeiro (no INCA), um em Brasília (Distrito Federal), um em Santa Catarina (Florianópolis), um no Rio Grande do Sul (Porto Alegre), um no Ceará (Fortaleza), um no Pará (Belém), um em Pernambuco (Recife), um no Paraná (Curitiba), um em Minas Gerais (Belo Horizonte). A Rede

BrasilCord tem como objetivo a coleta de sangue de cordão umbilical e placentário para atender à diversidade genética da população brasileira. O Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário de Pernambuco foi o décimo primeiro banco público brasileiro a ser inaugurado pela Rede BrasilCord (“INCA - Orientações ao Paciente e Familiares”, [s.d.]). Atualmente, segundo o 7º. Relatório de Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, publicado pela ANVISA em 2017, com dados referentes a 2016, existem em funcionamento, no Brasil, 19 Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário Privados para uso autólogo (BSCUPA) conforme Tabela 3, estrategicamente distribuídos em todo o território brasileiro, conforme mostra a figura 3.

Tabela 3 – Tabela 3 - Número de BSCUPs públicos e privados no Brasil em 2016

Número de BSCUPs públicos e privados no Brasil em 2016	
BSCUP	13
BSCUPA	19

Fonte: 7º Relatório de Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, ANVISA/ 2017

Figura 3 – Figura 3 - Distribuição dos BSCUPs no Brasil

Legenda: BSCUP – banco de sangue de cordão umbilical e placentário público da Rede BrasilCord.
BSCUPA – banco de sangue de cordão umbilical e placentário privado para uso autólogo.

Fonte: 7º Relatório de Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, ANVISA/ 2017

Todos os serviços brasileiros obedecem à Resolução da Diretoria Colegiada, RDC 56 de 16/12/2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cujo objetivo é estabelecer requisitos técnico-sanitários mínimos para o funcionamento de laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea, sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional, dos bancos públicos e privados. Este regulamento determina, entre outros, que as unidades de CPH de medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico, só podem ser liberadas para uso terapêutico depois de satisfeitos todos os requisitos obrigatórios para a manutenção da qualidade das células e segurança do receptor, para tanto devem ser realizados os seguintes testes na alíquota da unidade de SCUP antes da sua criopreservação: teste para detecção de hemoglobinas anormais; tipagem de HLA-A, HLA-B e HLA-DR, conforme legislação específica vigente; tipagem ABO e RhD; contagem do número total de células nucleadas e de eritroblastos; contagem de células CD34 positivas; teste de viabilidade celular por citometria de fluxo sendo recomendável a contagem diferencial dos leucócitos e a quantificação de plaquetas, por meio de contagem automatizada, com a finalidade de excluir doadores que apresentem neutropenia, trombocitopenia/ plaquetopatias e imunodeficiência congênitas (BRASIL, RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA, 2010).

A Rede Nacional de Bancos Públicos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para Transplantes de Células-Tronco Hematopoéticas – BrasilCord, entrou em vigor por força da Portaria N.º 2.381/GM, a qual determinou que esta fosse formada pelos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) já existentes e em operação no Instituto Nacional de Câncer - INCA/Rio de Janeiro, no Hospital Israelita Albert Einstein - HIEA/São Paulo, Hemocentro de Ribeirão Preto, Hemocentro de Campinas e pelos que viessem a ser implantados, com base nas necessidades da diversidade étnica e genética da população brasileira segundo critérios a serem estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

Neste contexto, foi fundado o Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) da Fundação HEMOPE, integrante da rede BrasilCord. Este possui o objetivo de armazenar amostras de sangue de cordão umbilical, material rico em células-tronco hematopoéticas capaz de produzir os elementos fundamentais do sangue na reconstituição da hematopoese após um tratamento mieloablativo do paciente, para uso alogênico não-aparentado, sendo o 11.º BSCUP implantado no país (PORTARIA, 2004).

Os inventários crescentes de unidades de sangue do cordão umbilical (SCUP) têm facilitado o acesso ao transplante de células-tronco hematopoéticas para muitos pacientes que não encontram doadores convencionais. As unidades de SCUP são, em

princípio, disponíveis, prontas para uso, consideradas produtos de terapia segura e eficaz. A contagem celular pode ser usada como um indicador da potência do enxerto. No entanto, quando as unidades são selecionadas, inicialmente com base na comparação do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) e avaliação da dose celular, sua qualidade absoluta permanece incerta. Infelizmente, as questões relacionadas à qualidade (particularmente relacionadas à viabilidade) não são incomuns no transplante de sangue do cordão umbilical. As razões para falhas de potência são diversas, mas a falta de validação completa durante as etapas críticas do processo e de uso adequado de ferramentas de controle de qualidade para detecção oportuna de unidades problemáticas são contribuintes significativos. Além disso, a incongruência entre diferentes conjuntos de normas e regulamentos e a falta de sistemas de qualidade comuns entre os bancos resultam em um inventário internacional altamente heterogêneo.

Para melhorar esta situação, é essencial melhorar a qualidade em cada uma das fases críticas de obtenção do produto em que a potência pode ser ameaçada, criando assim inventários homogêneos de unidades com excelente qualidade e quantidade.

Embora a legislação vigente estabeleça requisitos técnico-sanitários mínimos para o funcionamento de laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas disponibilizadas para transplante convencional, cada BSCUP estabelece seus próprios critérios visando a melhoria da qualidade dos produtos a serem disponibilizado, o que propicia a geração de um inventário, tanto nacional como internacional, bastante heterogêneo (QUEROL et al., 2010).

A RDC 56 de 16 de dezembro de 2010 determina que o sangue coletado deve ser aceito para processamento quando o número total de células nucleadas na unidade for igual ou superior a 5×10^8 (quinhentos milhões) de células nucleadas, podendo este ser aumentado de acordo com a política de qualidade instituída por cada serviço. Testes adicionais são realizados nas unidades SCUP para detecção de hemoglobinas anormais, tipagem ABO, RhD, Identificação do Perfil HLA, contagem do número total de células nucleadas e de eritroblastos, quantificação de células CD34 positivas, teste de viabilidade celular por citometria de fluxo e testes microbiológicos. As unidades de SCUP que atendem a todos os critérios técnicos, após processadas são criopreservadas e disponibilizadas para transplantes (BRASIL, RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA, 2010).

1.6 Captação/ triagem das doadoras e coleta de unidades de SCUP

As coletas de SCUP realizadas pelo HEMOPE foram realizadas de acordo com as normativas da ANVISA respeitando os princípios éticos, garantindo o sigilo, a gratuidade, de caráter público e somente coletadas após a assinatura do consentimento

livre e esclarecido (TCLE) pela doadora, segue como anexo I o TCLE usado nas coletas de unidades de SCUP usadas no desenvolvimento do projeto.

A seleção e qualificação do candidato à doação de CPH de medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário o serviço deve ter informações sobre a história clínica do doador e realizar os testes de triagem laboratorial do doador, de acordo com este regulamento e demais normas específicas vigentes. Os critérios de seleção devem assegurar proteção ao doador e a segurança do receptor.

A detecção de marcadores para infecções transmissíveis pelo sangue, realizada durante a triagem sorológica, deve ser efetivada por meio de testes de alta sensibilidade, devendo ser seguidos os mesmos algoritmos para a triagem sorológica para doação de sangue. Resultados laboratoriais ou outros achados anormais nos testes de seleção devem ser reportados ao respectivo doador, com o devido encaminhamento a um serviço de assistência especializado, para que sejam tomadas as medidas cabíveis.

O uso de CPH em transplante alogênico-aparentado ou autólogo, que não preencha integralmente os critérios de qualificação, exige uma avaliação considerando a relação risco benefício do procedimento, em decisão conjunta entre a equipe médica do serviço onde serão feitas a coleta e o transplante, e o receptor ou seus responsáveis legais (BRASIL, RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA, 2010) (RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA, 2010).

O cordão umbilical se forma a partir da 26ª semana da gestação a partir do pedúnculo embrionário que se liga à vesícula vitelínica e à amniótica, também chamado de pedúnculo abdominal seu principal papel é transportar nutrientes maternos para o feto e eliminação de excretas fetais para a mãe. O cordão umbilical humano cresce de forma helicoidal, mede de 30 a 50 cm de comprimento, possui diâmetro médio de 1,5 cm a termo e pesa cerca de 40g. É coberto por uma camada de células epiteliais escamosas cuboides, chamada de epitélio umbilical, muito provavelmente derivado do epitélio amniótico e internamente formado por um tecido conjuntivo (estroma) de origem extraembrionária possuindo duas artérias e uma veia. O tecido conjuntivo frouxo é também chamado de Geleia de Wharton, estrutura tecidual esponjosa formada por fibras de colágeno e elastina, proteoglicanas, ácido hialurônico e células estromais. Esta substitui a camada adventícia nas artérias umbilicais. As células endoteliais do interior das artérias e veias são ricas em organelas que participam na formação do líquido amniótico (MASSUMOTO et al., 2014).

Segundo a Anvisa em seu regulamento técnico a coleta de medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão umbilical e placentário deve seguir os critérios legais assegurar proteção ao doador. A coleta de sangue de cordão umbilical pode ser realizada por profissional de nível superior da área de saúde habilitado, capacitado e treinado, sendo que a responsabilidade pela coleta de sangue de cordão umbilical

e placentário é do responsável técnico do banco de sangue de cordão umbilical e placentário ou do serviço para o qual a unidade coletada será encaminhada para processamento.

A coleta deve ser realizada em estabelecimentos de saúde que atendam às exigências da legislação vigente, devendo ser mantidas as condições de assepsia necessárias, de forma a minimizar o risco de contaminação microbiana, para isto o sangue de cordão umbilical e placentário deve ser coletado em sistema fechado próprio para coleta deste tipo de material e hospital ou maternidade regularizada junto ao órgão de vigilância sanitária competente.

São candidatas à doação de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico não-aparentado as gestantes que satisfaçam pelo menos as seguintes condições: ter idade materna acima de 18 (dezoito) anos e que tenha se submetido há, no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas; idade gestacional igual ou superior a 35 (trinta e cinco) semanas; ter bolsa rota há menos de 18 (dezoito) horas; ter trabalho de parto sem anormalidade e ausência de processo infeccioso e ou doença durante a gestação que possa(m) interferir na vitalidade placentária(BRASIL, RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA, 2010).

A coleta é parte importante do processo e pode ser realizada de duas maneiras: intraútero e extraútero. A coleta intraútero é realizada no momento em que a placenta ainda se encontra dentro do útero através da punção da veia umbilical, com conexão direta com a bolsa de processamento contendo anticoagulante, no momento em que a placenta ainda se encontra intraútero, aproveitando a própria contração uterina.

A coleta extraútero é realizada após a retirada da placenta, sem qualquer interferência com o parto; a coleta pode também ser feita com uma combinação entre estas duas modalidades tanto de um parto normal quanto de cesariano(NAVARRETE; CONTRERAS, 2009b) .

Os BSCUPs conseguem preservar as células progenitoras hematopoéticas capazes de salvar vidas. Estas células, se não aproveitadas, são descartadas logo após o parto.

O momento preciso para extrair o sangue do cordão umbilical é importante porque os vasos entram em colapso causando perda de fluxo, pressão e possivelmente temperatura. O tempo preciso para clampar e extrair o sangue do cordão umbilical é importante porque os vasos tendem a entrar em colapso, o que dificulta a extração de sangue não coagulado. A imediata consequência da oclusão vascular é a coagulação. A coagulação é uma das barreiras para a extração da amostra. O objetivo dos Bancos de Cordão Umbilical é recolher o sangue do cordão que, de outro modo, seria descartado. Além disso, este procedimento é não invasivo, não doloroso, e aplicável à grande

maioria dos partos, seja vaginal ou cesariana, induzida ou não induzida.

A coleta em si é realizada por venopunção e drenagem em bolsa de sangue estéril contendo anticoagulante. Rotineiramente é um procedimento rápido que dura cerca de 5 minutos, contudo, a contaminação do material coletado pode correr neste ponto simples, mas crítico. Durante um parto vaginal, o lado externo do cordão umbilical (membrana do epitélio amniótico) entra em estreito contato com a vagina ou mesmo fluidos derivados de cólon, proporcionando assim uma entrada para contaminantes durante a punção venosa. A unidade de cordão umbilical (UCB) supostamente não é contaminada porque o conjunto incluindo o bebê, o cordão e a placenta formam um sistema fechado estéril, sendo a venopunção a única forma de abrir este sistema fechado. Testes de esterilidade são realizados para assegurar a ausência de contaminação (ROURA et al., 2015).

Figura 4 – Estrutura do cordão umbilical

Fonte: ROURA et al., 2015.

¹ A figura 4 mostra em A, o cordão umbilical rico em células tronco; em B, as duas artérias (A) e uma veia (V) do cordão umbilical; em C, a coloração tricrômica de Masson de uma microsecção completa

1.7 Volume total de SCUP coletado

O volume é uma medida simples, confiável com pequena variabilidade, por esta razão, o volume continua a ser um parâmetro importante para estimar o custo/benefício na obtenção das unidades de sangue do cordão umbilical, embora o regulamento técnico não defina um volume específico, este dado é útil na tomada de decisões rápidas sobre se os bancos devem investir no processamento e análise das unidades coletadas. O volume coletado correlaciona-se bem com as medidas hematopoéticas de qualidade unitária, como a contagem de células nucleadas totais e o número de células CD34+ e pode auxiliar os bancos a decidir quais unidades excluir sem ter que realizar uma caracterização adicional. Curiosamente, o peso ao nascer tem sido associado a maiores volumes de coleta e pode ser considerado como um critério inicial para a seleção de doadores de sangue do cordão umbilical para aumentar ainda mais a sua eficiência. Embora os limiares mínimos precisos de volumes necessários nas unidades de coleta a banco sejam tipicamente de 40 ml, as evidências que correlacionam o volume com as taxas de enxerto hematopoético permanecem obscuras em relação aos volumes mínimos. Praticamente todos os bancos de sangue de cordão relatam o volume coletado quando suas unidades estão listadas em registros internacionais (WEN et al., 2012).

Destaca-se neste campo o papel do corpo de Enfermagem, os quais são devidamente capacitados pela Rede BrasilCord, desempenham um importante papel na captação, triagem e coleta de doações de sangue de cordão umbilical e placentário, desenvolvendo sua habilidade técnica, que diz respeito aos aspectos mais gerais e instrumentais do próprio trabalho; desenvolvem também uma atuação de forma política, de constante negociação, criação do conhecimento, articulação e integração entre a equipe do BSCUP e o corpo técnico das unidades coletoras, com o objetivo de obter um produto de qualidade, apto a ser processado e posteriormente criopreservado (BERNARDINO; FELLI; PERES, 2010).

Segundo o 7º Relatório de Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário publicado pela ANVISA em 2017, o número de coletas realizadas pelos bancos privados foi 23,1% menor quando comparado ao ano anterior, valor este reputado ao maior esclarecimento do público alvo, pais e profissionais da saúde, acerca dos reais benefícios do armazenamento de células do sangue de cordão umbilical para uso autólogo.

Ainda segundo o mesmo relatório a Rede BrasilCord de bancos públicos apre-

do cordão, onde podem ser diferenciadas a membrana amniótica (AM), a gelatina de Wharton (WJ) e a musculatura lisa (SM) associada à parede do vaso (VW) e ao Lúmen (VL); Em D, a visualização de células pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência utilizando sondas específicas para cromossomo X (em verde) e Y (em vermelho).

sentou um percentual de 19,8% menor que em 2015, e no quadriênio 2013-2016 esta redução foi de aproximadamente 30%, tal situação é justificada pela política de qualidade estipulada pelo Instituto Nacional do Câncer – INCA e pelo Ministério da Saúde para compor um inventário de sangue de cordão umbilical capaz de atender aos padrões exigidos mundialmente, uma vez que aumentaram os critérios de desqualificação e descarte destas unidades, que são armazenadas e disponibilizadas aos receptores nacionais e internacionais por meio de sistemas integrados de busca de doadores (BRASIL, ANVISA, 2016).

Figura 5 – Figura 5 - Distribuição dos BSCUPs no Brasil

Fonte: 7º Relatório de Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário - ANVISA 2017

1.8 Processamento e criopreservação de SCUP

A legislação vigente determina que o sangue coletado deve ser aceito para processamento quando o número total de células nucleadas na unidade for igual ou superior a 5×10^8 , embora a legislação permita que cada BSCUP defina sua política de qualidade, podendo o serviço decidir por aumentar o valor mínimo aceito para o processamento de unidades de sangue de cordão umbilical e placentário em suas instalações.

Segundo a RDC 56 de 2010, os seguintes testes laboratoriais devem ser realizados na mãe, em uma primeira amostra de sangue colhida no dia do parto ou até 48 (quarenta e oito) horas após:

I – testes de triagem de infecções transmissíveis pelo sangue; II – citomega-

lovírus - sorologia para a detecção de anticorpos totais e IgM; III – toxoplasmose - sorologia para a detecção de anticorpos IgM; e IV – teste para detecção de hemoglobinas anormais com a recomendação de, sempre que possível, repetir os testes de triagem de doenças transmissíveis em uma amostra de sangue materno, coletada após o segundo mês pós-parto, idealmente no sexto-mês pós-parto.

Já na alíquota coletada da unidade de sangue de cordão umbilical e placentário devem ser realizados, antes da criopreservação os seguintes testes laboratoriais: I – teste para detecção de hemoglobinas anormais; II – tipagem de HLA-A, HLA-B e HLA-DR, conforme legislação específica vigente; III – tipagem ABO e RhD; IV – contagem do número total de células nucleadas e de eritoblastos; V – contagem de células CD34 positivas; VI – teste de viabilidade celular por citometria de fluxo. É recomendável a contagem diferencial dos leucócitos e a quantificação de plaquetas, por meio de contagem automatizada. Estes parâmetros devem ser avaliados para exclusão de neutropenia, trombocitopenia/ plaquetopatias e imunodeficiências congênitas.

São critérios de desqualificação da unidade de SCUP para uso alogênico não-aparentado: I – teste positivo para qualquer dos marcadores para infecções transmissíveis pelo sangue; II – teste positivo para citomegalovírus e ou toxoplasmose (anticorpos da classe IgM); III – teste microbiológico positivo; IV – presença de hemoglobinopatia congênita; ou V – número total de células nucleadas viáveis, determinado após o processamento da unidade e anteriormente a criopreservação, inferior a 5×10^8 (quinhentos milhões) de células nucleadas, ou conforme definido pelo BSCUP de acordo com o estabelecido.

A legislação determina que a unidade de sangue de cordão umbilical e placentário somente deve ser liberada para uso pelo BSCUP após a realização de teste molecular para HIV/HCV, na amostra materna coletada no dia ou até 48 horas após o parto e preferencialmente após um exame clínico na criança, após dois meses de idade, ou após obter informações sobre o estado de saúde da mesma, por contato telefônico com a família. Estas informações devem ser registradas e arquivadas juntas aos outros documentos referentes à unidade em questão.

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo realizar a qualificação das unidades de SCUP criopreservadas no Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) da Fundação HEMOPE no período de dezembro de 2014 a junho de 2017.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil das unidades criopreservadas quanto ao volume, total de células nucleadas, quantificação de células CD34+ e viabilidade celular;
- Avaliar a contagem de eritroblastos nas unidades de SCUP criopreservadas;
- Avaliar a diversidade dos antígenos tipagem ABO e Rh de gestantes e das unidades de SCUP;
- Avaliar a percentagem de unidades de SCUP com controle microbiológico positivo;
- Identificar o percentual de traço falciforme nas gestantes e nas unidades de SCUP;
- Identificar no inventário, o percentual de unidades adequadas ao uso em relação ao peso do receptor;
- Correlacionar os dados laboratoriais encontrados nas unidades de SCUP com as características sociodemográficas da gestante e do recém-nascido (RN);
- Variáveis explicativas para caracterização sociodemográfica da gestante: Idade (variável contínua, em anos completos), idade gestacional, antecedentes obstétricos, cor da pele (variável categórica em branca, parda, preta, amarela ou indígena);
- Variáveis explicativas para caracterização sociodemográfica do recém-nascido (RN): Gênero e Peso.

3 JUSTIFICATIVA

O sangue do cordão é uma das fontes de células-tronco para o transplante de medula óssea e este é o único uso deste material atualmente. O transplante é indicado para pacientes com leucemia aguda; leucemia mielóide crônicas; leucemia mielomonocítica crônica; linfomas; anemias graves; anemias congênitas; hemoglobinopatias; imunodeficiências congênitas; mieloma múltiplo; Síndrome mielodisplásica hipocelular; Imunodeficiência combinada severa; osteopetrose; mielofibrose primária em fase evolutiva; Síndrome mielodisplásica em transformação; talassemia maior, além de outras doenças do sistema sanguíneo e doenças autoimunes.

O BSCUP/ HEMOPE iniciou suas atividades em dezembro de 2014, o processo de implantação exigiu treinamento de pessoal, validação de processos e qualificação de equipamentos. Avaliar as primeiras unidades de SCUP armazenadas será de grande valia para caracterização do seu inventário, auxiliará o planejamento de ações de melhoria contínua da qualidade do produto disponibilizado à população, contribuindo para o aumento da eficácia dos transplantes de CPH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Esta dissertação atende às disposições preliminares da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a qual incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre outros.

O desenvolvimento desse projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado de Pernambuco – HEMOPE e encontra-se registrado sob o processo de número 48875515.1.0000.5195

4.2 Dados descritivos das doadoras de SCUP

Para a análise dos dados descritivos das doadoras de SCUP foram usados como fonte dados descritivos das gestantes e recém-nascidos obtidos da ficha de Histórico Clínico, a qual contém informações sobre a entrevista pré-natal e parto. Estes dados antes de serem arquivados são transcritos para o software cedido, desenvolvido e gerenciado pelo INCA/MS, o qual armazena todos os dados de produção do BSCUP/HEMOPE, permitindo assim a sua rastreabilidade.

4.3 Captação/ triagem das doadoras de SCUP

Foram coletadas amostras de sangue da mãe doadora de SCUP para a realização de triagem de doenças transmissíveis pelo sangue. O sangue da mãe doadora foi coletado e distribuído em 5 tubos de coleta de sangue a vácuo de 5 ml cada, sendo três contendo anticoagulante EDTA e dois tubos secos.

Nessas amostras foram realizados testes para HIV, HTLV, Hepatites B e C, Sífilis e Chagas, Citomegalovírus (CMV) com detecção de anticorpos totais e IgM, toxoplasmose para detecção de anticorpos IgG e IgM, teste do ácido nucleico (NAT) para HIV, HCV e HBV, pesquisa de hemoglobinas anormais através de Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC.

Foram avaliadas neste estudo, as variáveis explicativas para caracterização sociodemográfica da gestante: Idade (variável contínua, em anos completos), idade gestacional, antecedentes obstétricos, cor da pele, (variável categórica em branca, parda, preta, amarela ou indígena); bem como, as variáveis explicativas para caracterização sociodemográfica do recém-nascido (RN), gênero e peso.

4.4 Coleta de SCUP

O SCUP foi coletado inicialmente em bolsas estéreis simples da marca Griffols e, posteriormente em bolsas da marca JP, desenvolvidas especialmente para este fim e as bolsas processadas em até 48 horas após a sua coleta.

O sangue de cordão umbilical foi coletado de gestantes saudáveis, sem histórico de diagnóstico definido para qualquer doença transmissível pelo sangue, com gestação terminada em recém-nascido (RN) vivo de parto cesário ou vaginal, no período de dezembro de 2014 a junho de 2017, em Recife na Maternidade do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira e em Olinda na Maternidade do Tricentenário. A triagem das gestantes e a coleta de sangue a partir do cordão umbilical doado no BSCUP/HEMOPE é realizada por Enfermeiros, devidamente treinados e capacitados. A enfermagem desenvolve um importante papel para as atividades desenvolvidas no serviço, uma vez que é na triagem que se observa o perfil da gestante quanto aos critérios que as torna aptas ou inaptas à coleta. A triagem clínica tem um importante papel, contribuindo para a garantia da qualidade das unidades de SCUP doadas.

Todas as coletas obedeceram aos critérios estipulados na legislação vigente quanto à doação de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico não-aparentado, sendo consideradas as seguintes condições:

I - idade materna acima de 18 (dezoito) anos e que tenha se submetido há, no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas;

II – idade gestacional igual ou superior a 35 (trinta e cinco) semanas;

III – bolsa rota há menos de 18 (dezoito) horas;

IV – trabalho de parto sem anormalidade; e

V – ausência de processo infeccioso bacterianos, virais e fúngicos e de doenças relacionadas a estes, como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), Infecção pelo Vírus T- linfotrópico humano (HTLV), Hepatites, Sífilis, Doença de Chagas, Citomegalovírus (CMV) e Toxoplasmose;

VI – ausência de doenças durante a gestação que possam interferir na vitalidade placentária.

Como critérios de desqualificação à doação, foram considerados as seguintes condições:

I – sofrimento fetal grave;

II – feto com anormalidade congênita;

III – temperatura materna igual ou superior a 38°C, durante o trabalho de parto;

IV – gestante com situação de risco acrescido para infecções transmissíveis pelo sangue;

V – presença de processos infecciosos e ou doença durante o trabalho de parto, que possam interferir na vitalidade placentária;

VII – gestante em uso de hormônios ou drogas que se depositam nos tecidos;

VIII – gestante com história pessoal de doença sistêmica autoimune ou de neoplasia; ou

IX – gestante e seus familiares, pais biológicos e seus familiares ou irmãos biológicos do recém-nascido com história de doenças hereditárias do sistema hemato-poético, tais como, talassemia, deficiências enzimáticas, esferocitose, eliptocitose, anemia de Fanconi, porfiria, plaquetopatias, neutropenia crônica ou outras doenças de neutrófilos, bem como com história de doença granulomatosa crônica, imunodeficiência, doenças metabólicas ou outras doenças genéticas;

X – gestante incluída nos demais critérios de exclusão visando à proteção do receptor, descritos nas normas técnicas vigentes para doação de sangue.

Foram considerados ainda, como critérios de exclusão, unidades de SCUP coletadas com dados incompletos no banco de dados do BrasilCord; unidades de SCUP descartadas por teste sorológico reagente para doenças transmissíveis pelo sangue; presença de hemoglobinopatias e contagem total de células nucleadas menor que 5×10^8 .

Nas amostras de SCUP processadas foram realizados testes para pesquisa de hemoglobinas anormais através da metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Performance – HPLC, tipagem de HLA-A, HLA-B, HLA-DR e DQ, Tipagem ABO e RhD, contagem do número total de células nucleadas (TCN) e de eritroblastos, quantificação de células CD34 positivas, teste de viabilidade celular e teste microbiológico para detecção de contaminação microbiológica da amostra. Neste estudo foram avaliados a variável “unidades adequadas ao uso em relação ao peso do receptor”, que será categorizada tomando como base a dose padrão recomendada de $2,5 \times 10^7$ / Kg, o TCN e o peso de um provável receptor, assim categorizado: unidades $< 12,5 \times 10^8$ para peso < 50 kg e unidades $> 12,5$ para peso > 50 kg.

4.5 Processamento e criopreservação das unidades de SCUP

As unidades de SCUP, que compõe o inventário do BSCUP/HEMOPE, objeto deste estudo, foram processadas no sistema automatizado SEPAX (*Sepax Cord Blood Processing System from Biosafe SA, Eysins, Switzerland*), este sistema consiste em uma unidade Sepax, equipamento totalmente automatizado para separação celular

através do processo de centrifugação. O kit Sepax de Separação Celular utilizado foi o de referência CS-530.4b, próprio para utilização neste sistema. Para o processamento, inicialmente este kit é acoplado à bolsa de coleta de sangue contendo o sangue do cordão umbilical. O protocolo de centrifugação utilizado foi o UCB-HES, o qual permite a concentração da fração de células nucleadas presentes no concentrado leucoplaquetário, após adição de uma solução precipitadora (hidroxietilamido a 6%). O kit é composto por uma câmara de separação (seringa), onde o sangue é centrifugado, à qual são conectadas bolsas para obtenção dos sub- produtos: concentrado de hemácias, plasma e concentrado leucoplaquetário, neste estão concentradas as células de interesse para o transplante. O processamento das unidades de SCUP tem por objetivo: reduzir o volume da unidade coletada; diminuir o espaço necessário para o armazenamento das unidades de SCUP, reduzindo, assim, os custos que envolvem o armazenamento, propiciando o aumento do número de unidades criopreservadas; reduzir a quantidade de dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado para criopreservação das células, diminuindo a toxicidade desta substância, por ocasião do transplante e, ainda, propiciar a redução do volume eritrocitário, diminuindo os riscos de reações de incompatibilidade ABO no receptor.

O concentrado leucoplaquetário é obtido em uma bolsa apropriada ao congelamento em baixas temperaturas, em um volume final aproximado de 21ml. Antes do congelamento foi adicionado à esta bolsa, uma solução crioprotetora composta por dimetilsulfóxido (DMSO) e hidroxietilamido a 130/0,4%, em iguais proporções. Esta solução, tem por objetivo proteger as células durante o congelamento a baixas temperaturas, impedindo a formação de gelo intracelular, o que causaria morte celular. As unidades de SCUP foram criopreservadas e armazenadas em um sistema denominado Bioarquivo (*Thermogenesis BioArchive System, GE Healthcare*), o qual é composto por um tanque inviolável, equipamento totalmente automatizado de criopreservação e armazenamento em nitrogênio líquido, e por um software de controle de acesso, que monitora todo o processo de congelamento e armazenamento, com capacidade para congelar até 3.670 unidades a uma temperatura mínima de 190°C negativos. As unidades de SCUP são resfriadas de modo gradativo, de forma a impedir que cristais de gelo se forme no interior das células, danificando-as.

4.6 Análise dos parâmetros nas unidades de sangue de cordão umbilical e plaquetário (SCUP)

Os parâmetros avaliados antes do congelamento das unidades de SCUP que compõem o inventário do BSCUP/HEMOPE, obtidas no período de dezembro de 2014 a julho de 2017, estão abaixo descritos:

4.6.1 Análise do volume das unidades de SCUP

Os volumes das unidades de SCUP foram obtidos automaticamente por meio do relatório emitido pelo sistema SEPAX após processamento automatizado.

4.6.2 Análise do número de células nucleadas

A contagem de células nucleadas, nas unidades de SCUP foram realizadas em contador celular automatizado da marca BC *Mindray* 2800.

Diariamente este contador automatizado é calibrado e periodicamente é realizado o controle externo de amostragem.

4.6.3 Quantificação das células CD34 positivas e análise da viabilidade celular

A quantificação das células CD34 positivas foi realizada em citômetro de fluxo (CF) *FACSCalibur* da marca *Becton Dickinson* (BD). O método utilizado na contagem de células CD34+ foi a citometria de fluxo, com base no protocolo recomendado pela ISHAGE (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*), este protocolo permite avaliar o tamanho e complexidade celular, bem como selecionar subpopulação de células CD34+ viáveis a partir da população total de leucócitos, células que expressam o antígeno CD45+. A quantidade de células CD34+ viáveis foi reportada em valores absolutos. Para este estudo utilizou-se plataforma dupla, na qual o percentual de células CD34+ é determinado por um citômetro de fluxo (CF) e a contagem absoluta de leucócitos é determinada por um contador hematológico.

A metodologia de plataforma única, onde se utilizam esferas fluorescentes (*beads*) para contagem absoluta de células, utilizando somente o CF, foi implantada a partir de julho de 2017, período posterior a este estudo e está em uso até a presente data. Esta utiliza o corante nuclear, o qual analisa células que estão no fim da apoptose, o 7- amino actinomicina (7AAD), o qual é capaz de separar células não viáveis de células integras, quantificando células CD34+ dentro da população de células viáveis. A viabilidade celular de amostras, coletadas no período anterior a julho de 2017 foram realizadas utilizando o do método de Azul de Trypan. Esta metodologia consiste em preparar uma suspensão celular em uma solução de sais balanceada e adicionar a esta a solução Azul de Trypan 0,4%. Um volume de 100 μ L desta mistura de suspensão celular é pipetada em Câmara de Neubauer, onde são contadas 100 células nos quadrantes externos dentre as quais se identifica as viáveis e não viáveis. As células não viáveis ficam coradas de azul. O resultado da viabilidade é expresso em percentual utilizando-se a seguinte fórmula:

VIABILIDADE CELULAR (%) = total de células viáveis (não coradas) total de

células (coradas e não coradas) X 100

4.6.4 Contagem de eritroblastos

A contagem de eritroblastos foi realizada a partir de uma lâmina com esfregaço obtido da amostra de SCUP, corada pelo método de May-Grunwald-Giemsa, que consiste em cobrir o esfregaço para fixação e coloração pelo May Grunwald, na qual, em seguida se processa uma segunda coloração com solução de Giemsa, obtendo-se um resultado final melhor e mais detalhado do esfregaço. Em seguida realizou-se a contagem dos eritroblastos em 100 células contadas com o auxílio do microscópio óptico.

4.6.5 Análise das hemoglobinas anormais

Aproximadamente 500 mL de amostra do concentrado de hemácias de cada unidades de SCUP foram coletadas para análise das hemoglobinas anormais utilizando a metodologia de cromatografia líquida (HPLC). Este método tem por fundamento a separação de componentes de uma mesma mistura de sangue que passa através de uma coluna cromatográfica com partículas porosas (fase estacionária) seguida por suas eluições induzidas pela passagem de um líquido (fase móvel), com altas concentrações de cátions. Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma. Este processo permite a quantificação de hemoglobinas A, A2 e Fetal, bem como de hemoglobinas variantes.

4.6.6 Determinação da tipagem ABO e RHD de unidades de SCUP e de doadoras

A determinação da tipagem ABO e RhD, das unidades de SCUP e das mães doadoras, foi realizada através da técnica em tubo, utilizando-se a pesquisa direta para determinação da presença de antígenos do sistema ABO nas hemácias testadas e a pesquisa reversa para identificação dos anticorpos correspondentes utilizando hemácias conhecidas A1 e B.

A pesquisa do antígeno RhD foi realizada colocando-se as hemácias com antissoro anti-RhD (Anti-D). Paralelo a este procedimento foi realizado um controle da tipagem RhD, utilizando-se soro controle compatível com o antissoro utilizado obtido do mesmo fabricante do anti-D. Para as reações que apresentaram resultado negativo para a presença do antígeno RhD, foi efetuada a pesquisa do antígeno D-fraco negativo com, no mínimo, dois antissoros anti-RhD (anti-D), onde pelo menos um deles continha anticorpos da classe IgG. Estes antissoros foram obtidos de linhagens celulares distintas.

4.6.7 Análise microbiológica

O teste para controle microbiológico foi realizado por meio da coleta de amostra da unidade de SCUP pós processamento, em frascos Bact/Alert PF Plus. O sistema utilizado para o teste microbiológico foi o Sistema Bact/Alert, que permite a monitorização contínua e automática na detecção colorimétrica que identifica a produção de CO₂, caso haja desenvolvimento bacteriano; as amostras positivas foram encaminhadas para a realização da bacterioscopia e identificação do microorganismo.

4.6.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o soft SPSS, VERSÃO 15. Para avaliação da Normalidade utilizou-se o teste Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors ou o Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$). Para análise de igualdade de variância utilizou-se o teste de Levene's. O teste t foi utilizado para análise de significância de populações distintas ($\alpha=0,05$). O coeficiente de correlação de Spearman (r_s), não paramétrico, foi utilizado para verificar a existência de associação entre variáveis numéricas, pois algumas variáveis não apresentaram distribuição Gaussiana, devido a rejeição da hipótese de normalidade segundo o teste de Kolmogorov-Smirnov.

5 RESULTADOS

5.1 Local de coleta das unidades de SCUP

O inventário do BSCUP/ HEMOPE no período de 01/12/2104 a 30/07/2017, é composto por 113 amostras das quais 59,29% foram coletadas na Maternidade do Instituto Materno Infantil de Pernambuco - (IMIP), localizada em Recife e 40,71% no Hospital do Tricentenário, este localizado em Olinda. (figura no. 6)

Figura 6 – Figura 6 - Locais de coleta das unidades de SCUP

Fonte: <https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

1

Durante este período foram coletadas 252 unidades de sangue de cordão umbilical, destas 123 (48,81%) foram descartadas por diversos motivos inerentes à coleta e ao processamento, 16 (6,35%) foram reservadas para controle de qualidade e plano de estabilidade e 113 (44,84%) fazem parte do inventário do BSCUP/HEMOPE no período definido para este estudo.

¹ Em azul está representado o número de unidades de SCUP coletadas no IMIP e em vermelho o número de unidades de SCUP coletadas no Hospital Tricentenário

5.2 Caracterização sociodemográfica das gestantes

5.2.1 Idade e período gestacional das doadoras de SCUP

Embora haja outros requisitos específicos para qualificação de doador para uso alogênico não aparentado, anteriormente descritos, para fins desta pesquisa os dados coletados mostram que as gestantes apresentaram idade mediano de 25 anos com mínima de 18 e máxima de 40 anos e período gestacional mediano de 39 semanas com mínimo de 36 e máximo de 42 semanas.

5.2.2 Cor da pele das doadoras de SCUP

Das gestantes que concordaram em doar o sangue de cordão umbilical e placentário ao BSCUP/HEMOPE, 21(18,58%) eram da cor branca, 09 (7,96%) eram negras e 83 (73,45%) da cor parda, estes dados estão demonstrados na figura 7.

Figura 7 – Figura 7 - Caracterização das Gestantes Quanto à Cor da Pele

Fonte: <https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

² Em verde está representado a percentagem de doadoras de SCUP de cor de pele parda, em azul está representado a percentagem de doadoras de SCUP da cor de pele branca e em vermelho a percentagem de doadoras de SCUP da cor de pele negra.

5.2.3 Paridade das doadoras de SCUP

Dados coletados na triagem clínica mostrou que quanto à paridade, 57 gestantes (50,44%) eram nulíparas, ou seja, não tinham partos anteriores, 28 (24,78%) eram primíparas, tinham tido um parto e 28 (24,78%)S eram múltíparas, referiram ter tido dois ou mais partos. Estes dados são mostrados na figura 8.

Figura 8 – Figura 8 - Caracterização das Gestantes quanto à Paridade

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

5.2.4 Classificação sanguínea das doadoras de SCUP

A classificação sanguínea das doadoras de SCUP encontra-se descrita na figura 9, embora a distribuição se assemelhe à encontrada em estudos populacionais a amostra não é representativa ainda para um estudo comparativo. Nas amostras analisadas observou-se a seguinte distribuição percentual dos grupos sanguíneos e fator Rh: O Positivo (39,82%), A positivo (36,28%), B Positivo (10,62%), AB Positivo (5,31%), O Negativo (3,54%), A negativo (2,65%), B Negativo (0,88%) e AB negativo (0,88%).

Figura 9 – Figura 9 - Classificação sanguínea das doadoras de SCUP

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

3

5.2.5 Análise do perfil de hemoglobinas das doadoras de SCUP

Do total de 113 doadoras de SCUP analisadas quanto ao perfil de hemoglobinas foram encontradas 110 (97,35%) doadoras com ausência de hemoglobinas anormais e 3 (2,65%) apresentaram presença de hemoglobina S anormais em heterozigose, caracterizando um traço falciforme conforme mostrado na figura 10.

³ Percentagem dos diferentes tipos sanguíneos das 113 doadoras de SCUP

Figura 10 – Figura 10 – Análise do perfil de hemoglobinas das doadoras de SCUP

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

4

5.3 CARACTERIZAÇÃO SÓCIODEMOGRÁFICA DOS RECÉM NASCIDOS (RN)

5.3.1 Classificação sanguínea dos RN

A classificação sanguínea dos RN encontra-se descrita na figura 11 e corresponde ao perfil das unidades que fazem parte do inventário.

Similar ao encontrado nas mães doadoras, a amostra não é representativa para um estudo comparativo, porém observou-se no inventário do BSCUP/HEMOPE a seguinte distribuição percentual dos grupos sanguíneos e fator Rh: O Positivo (37,17%), A positivo (31,86%), seguidos do grupo B Positivo (10,62%), AB Positivo (6,19%), A Negativo (6,19%), O negativo (6,19%), B Negativo (1,77%) e AB negativo (0,00%).

⁴ Em azul, percentagem de doadoras de SCUP com hemoglobinas normal e, em vermelho, com traço falciforme.

Figura 11 – Figura 11 - Classificação sanguínea dos RN

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

5

5.3.2 Perfil de hemoglobinas dos RN

O perfil de hemoglobinas foi avaliado nos 113 recém-nascidos que fazem parte do grupo de estudo. Nestes, 109 (96,46%) RN apresentaram ausência de hemoglobinas anormais e em 4 (3,54%) apresentaram a hemoglobina S em heterozigose, caracterizando um traço falciforme conforme mostrado na figura 12.

⁵ Nesta figura são representados a percentagem dos diferentes tipos sanguíneos do inventário de 113 unidades de SCUP do BSCUP/HEMOPE.

Figura 12 – Figura 12 – Análise do perfil de hemoglobinas dos RN

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

6

5.3.3 Classificação gênero e avaliação do peso dos RN

Os RN foram avaliados quanto ao gênero, dos 113 RN avaliados 61 (53,8%) eram do gênero feminino e 52 (46,02%) eram do gênero masculino conforme mostrado na figura 13.

Quanto ao peso, os recém-nascidos pesquisados apresentaram peso mediano de 3,38 kg com mínimo de 2,42 kg e máximo de 4,30 kg.

Este estudo buscou avaliar se havia correlação significativa entre o peso dos RN e a idade gestacional das mães. Aplicando-se o teste de Spearman's para verificação da associação do peso dos RN em relação à idade gestacional nas 113 amostras, obteve-se uma correlação igual a 0,316, com $p=0,001$, onde se conclui que a correlação é significativa ao nível de 0,05.

⁶ Percentagem de RN com hemoglobinas normal em azul e com hemoglobina S em vermelho.

Figura 13 – Figura 13 – Análise do gênero dos RN

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

7

5.4 ANÁLISE DESCRITIVA DAS UNIDADES DE SCUP

A análise descritiva é apresentada sob forma de gráficos e os dados observados, expressos pela frequência (n) e percentual (%) para dados categóricos (qualitativos) e pela mediana (mínimo – máximo) para dados numéricos. Estes dados estão resumidos na Tabela 4.

Na tabela número 4 estão apresentados os parâmetros referentes ao volume inicial de SCUP coletado, volume final de SCUP após processamento, número total de células nucleadas das unidades de SCUP antes e após processamento, bem como as contagens de células CD34+, contagem de eritroblastos e o percentual de células viáveis de todas as unidades de SCUP processadas durante o desenvolvimento deste projeto.

Tabela 4 – Tabela 4 - Parâmetros Analisados nas Unidades de SCUP

Número Amostral	113
-----------------	-----

⁷ Percentagem de RN do sexo feminino estão representados de azul e do sexo masculino está representado de vermelho.

Número Amostral	113
Parâmetros	Mediana (min-máx)
Volume Inicial (mL)	86,40 (50-166,8)
Volume final (mL)	21,50 (19,1-21,7)
TCN pré processo (x 108)	10,20 (6,0-27,8)
TCN pós processo (x 108)	8,40 (5,0-22,6)
Recuperação de Células (%)	81,82 (56,7-118,5)
CD 34+ (x 106)	4,21 (0,67-39,5)
Contagem de Eritroblastos	5,0 (36,00-42,00)
Viabilidade(%)	97 (71,3-100,0)
Idade das gestantes	25,00 (18,00-40,00)

Número Amostral	113
Idade gestacional	39,00 (36,00-42,00)

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

5.4.1 Análise do volume

Nas 113 amostras criopreservadas, o volume inicial mínimo coletado foi de 50mL, o volume inicial máximo foi de 166,80, com mediana de 86,40. Quanto ao volume final após o processamento totalmente automatizado, utilizando-se o sistema Sepax para processamento do material coletado, observou-se um volume final com mediana de 21,40 mL, mínimo de 19,07 mL e máximo de 21,75 mL.

Aplicando-se o teste de Spearman's para verificação da associação do volume inicial em relação ao peso do recém-nascido nas 113 amostras obteve-se uma correlação igual a 0,259, com $p=0,006$, onde conclui-se que a correlação é significativa ao nível de 0,05.

5.4.2 Análise do total de células nucleadas

A análise das unidades de SCUP coletadas mostrou uma contagem mediana de $10,20 \times 10^8$ total de células nucleadas (TCN), com valores mínimo e máximo de TCN de $6,0 \times 10^8$ e $27,80 \times 10^8$, respectivamente.

O TCN após o processamento apresentou contagem mediana de $8,4 \times 10^8$ com mínima de $5,0 \times 10^8$ células e a contagem máxima encontrada foi de $22,6 \times 10^8$ células.

A legislação determina que o número total de células nucleadas viáveis, após o processamento da unidade e anteriormente a criopreservação seja igual ou superior a 5×10^8 (quinhentos milhões) de células nucleadas viáveis ou de acordo com o estabelecido por cada serviço. Semelhante ao modelo proposto por Querol e colaboradores, 2010, realizamos a categorização das unidades de sangue de corão umbilical e placentário de acordo com o total de células nucleadas ($TCN \times 10^8$) após processamento. As unidades com $TCN > 12,5 \times 10^8$, como sendo unidades para atender a pacientes adultos com peso acima de 50kg e as que possuem TCN em $< 12,5 \times 10^8$, como sendo unidades para atender a crianças com peso abaixo de 50kg. O inventário do BSCUP/HEMOPE mostra que do total das 113 unidades armazenadas no período a que se refere este estudo 89 unidades atendem a crianças, o que corresponde a 78,76% do inventário total e 24 unidades atendem a adultos, o que corresponde a 21,24%.

A recuperação TCN após o processamento das unidades de SCUP no sistema automatizado SEPAX foi de 81,82% com valores mínimo e máximo de 56,73% e 118,46%, respectivamente.

Figura 14 – Figura 14 - Total de Células Nucleadas Unidades de SCUP Pós Processamento

Fonte: <https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

8

Aplicando-se o teste de Spearman's para verificação da associação significativa entre as variáveis TCN $\times 10^8$ pré processamento e peso do RN nas 113 amostras obteve-se uma correlação igual a 0,300, com $p=0,001$, onde conclui-se que a correlação é significativa ao nível de 0,05. O mesmo teste foi aplicado para verificação da associação entre as variáveis TCN $\times 10^8$ pré processamento e volume inicial nas 113 amostras obteve-se uma correlação igual a 0,648, com $p=0,000$, onde conclui-se que a correlação é significativa ao nível de 0,05.

5.4.3 Análise da quantificação de células CD34+

Com relação a quantificação de Células CD34+, nas 113 amostras estudadas, a quantificação de células CD34 positivas, apresentou um valor mediana de $4,21 \times 10^6$

⁸ Análise do número de TCN de unidades de SCUP. Percentagem de unidades de SCUP com TCN $< 12,50 \times 10^8$ representadas de azul e com TCN $\geq 12,50 \times 10^8$ representadas de vermelho.

com valor mínimo de $0,67 \times 10^6$ células e valor máximo de $39,5 \times 10^6$ células conforme mostra figura 15.

Figura 15 – Figura 15 - Quantificação CD 34+ nas Unidades de SCUP Pós Processamento

Fonte: <https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

9

Este estudo buscou avaliar se havia correlação significativa entre a idade gestacional e o valor encontrado do número de células cd34+. Para tanto denominamos de Grupo 0 o grupo que apresentou valores de CD34+ menor que 1,25 e Grupo 1 o que apresentou valores de cd34+ maior ou igual a 1,25. Para saber se as idades gestacionais médias amostrais dos cordões do grupo 0 e dos cordões do grupo 1, cujos valores são respectivamente iguais a 39,57 u.m. e 39,28 u.m., provêm de populações com as mesmas idades gestacionais médias, isto é, se a diferença de 1 u.m é ou não estatisticamente significativa, recorreu-se ao teste t. Analisando, portanto, a estatística t para populações independentes com variâncias iguais. O valor da estatística t foi -0,599 com p valor de 0,551. Logo, através dos dados deste estudo e a um nível de significância de $\alpha=0,05$, não se rejeitou que as médias das idades gestacionais são iguais para os dois grupos. Esta conclusão é confirmada pelo intervalo de confiança a 95% para as iguais idades gestacionais médias dos dois grupos, compreendido entre -0,1243

⁹ Análise do número de TCN de unidades de SCUP. Percentagem de unidades de SCUP com TCN <12,50 x 108 representadas de azul e com TCN >12,50 x 108 representadas de vermelho.

u.m. e 0,666 u.m., que como se pode ver inclui o zero, correspondente à igualdade das médias. Deste modo, pode-se concluir que não houve diferença estatística entre as médias das idades gestacionais dos cordões do grupo 0 e dos cordões do grupo 1, pelo teste t valor igual a -0,599 ($p=0,551$), ao nível de significância de 0,05.

5.4.4 Análise da contagem de eritroblastos

A contagem de eritroblastos nas 113 unidades de SCUP avaliadas, apresentou um percentual mediano de 6,1% com valor mínimo de 1,0% e máximo de 89%. A figura 16 mostra a contagem de eritroblastos categorizadas em dois grupos: o grupo de unidades com contagem de 0 a 10 ($EB < 10$), para efeito didático aqui chamado de grupo controle, o qual corresponde a 70,80% e o grupo de unidades com contagem maior igual a 10 ($EB \geq 10$), para efeito didático, denominado grupo de estudo, este correspondendo a 29,20%.

Figura 16 – Contagem de Eritroblastos nas Unidades de SCUP

Fonte: <https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

Este estudo buscou realizar a comparação de médias entre a contagem de Eritroblastos e o Peso do RN, para tanto recorreu-se ao teste t para saber se os pesos médios dos RN amostrais dos cordões no grupo controle e do grupo do estudo, os quais possuem respectivamente, 3,4023 u.m. e 3,3485 u.m., provêm de populações com mesmos peso RN médios, isto é, se a diferença de 1 u.m. é ou não estatisticamente

significativa. Pretendeu-se comparar os pesos médios dos RN, numa amostra aleatória de 33 cordões do grupo de estudo e 80 do grupo controle. O valor da estatística t foi -0,667 com p valor de 0,506. Logo, através dos dados deste estudo e a um nível de significância de $\alpha=0,05$, não se rejeitou que as médias dos Peso dos RN são iguais para os dois grupos. Esta conclusão é confirmada pelo intervalo de confiança a 95% para os iguais peso médios dos dois grupos, compreendido entre -0,21345 u.m. e 0,10592 u.m., que como se pode ver inclui o zero, correspondente à igualdade das médias. Deste modo, conclui-se que não há diferença estatística entre os pesos dos RN entre o Grupo Estudo e o Grupo Controle.

Este estudo buscou também realizar a comparação de médias entre a contagem de Eritroblastos e a Idade Gestacional, para tanto, recorreu-se ao teste t para saber se as idades gestacionais médias amostrais do grupo controle e do grupo de estudo, os quais possuem respectivamente, 39,29 u.m. com desvio padrão 1,193 e 39,33 u.m., com desvio padrão de 1,339, provêm de populações com mesmas idades gestacionais médias, isto é, se a diferença de 1 u.m. é ou não estatisticamente significativa. Pelo teste F, valor 0,774 ($p=0,381$), com nível de significância de 0,05, não se rejeitou a hipótese nula de igualdade de variâncias. O valor da estatística t foi 0,179 com p valor de 0,858. Logo, através dos dados deste estudo e a um nível de significância de $\alpha=0,05$, não se rejeitou que as médias das idades gestacionais são iguais para os dois grupos. Logo, não houve diferença estatística entre as médias das idades gestacionais entre os cordões do grupo de estudo e os cordões do grupo controle.

5.4.5 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular nas 113 unidades de SCUP estudadas apresentou percentual mínimo de 71,35%, máximo de 100% com mediana de 97,00%. O BSCUP/HEMOPE estabeleceu internamente neste período a viabilidade mínima de 70% para armazenamento das unidades de SCUP.

5.4.6 Análise Microbiológica

6 DISCUSSÃO

Neste capítulo serão avaliados os resultados encontrados que contribuem para a qualificação das primeiras unidades de SCUP coletadas tendo como base a literatura científica e a legislação vigente.

Estudos mostram que desde que aconteceu o primeiro transplante em 1988, os BSUCP's se estabeleceram como uma alternativa para reconstituição celular da medula óssea por ser rico em células progenitoras hematopoéticas, as células obtidas dos cordões umbilicais apresentam vantagens sobre as obtidas através do sangue periférico mobilizado e da medula óssea, uma vez que a coleta não apresenta risco ao doador, apresentam menos rigor quanto à compatibilidade HLA, menor chance do receptor desenvolver doença do enxerto versus hospedeiro (GVHD) e podem permanecer armazenadas por longos períodos disponíveis para uso. No entanto as unidades oriundas do sangue de cordão têm limitações para uso em adultos de maior peso, possuem uma pega de transplante mais lenta em relação às células obtidas por outros métodos. Tais situações têm levado ao desenvolvimento de estratégias para implementação do uso destas unidades como a expansão *ex vivo* destas células antes do transplante, transplantes de unidades de SCUP associadas a células mesenquimais e uso de duplo cordão na utilização em adultos e para acelerar a pega do transplante. Estas novas estratégias, no entanto, introduzem custos adicionais aos serviços, que buscam alternativas para se manterem economicamente viáveis. O estabelecimento dos BSCUP permitiu fácil acesso às unidades de sangue de cordão armazenadas com registro de até 30.000 transplantes realizados até o ano de 2015 em todo o mundo (ARMSON; ALLAN; CASPER, 2015).

Estudos mostram que o aumento da diversidade étnica é crescente em muitos países, sendo imperativo a busca de fontes alternativas de células-tronco em casos em que não se identificam doadores relacionados dentro da família, sendo as unidades de SCUP, uma das poucas alternativas para atender a pacientes adultos nestes casos. No entanto, diversos fatores podem interferir na qualidade das unidades produzidas a partir de sistemas de redução do volume, entre eles o tempo estendido de transporte das unidades, o tempo de armazenamento que podem afetar a qualidade das unidades, devendo cada serviço implementar protocolos de qualificação de processamento, criopreservação e isolamento de células como forma de garantir um produto com dosagem ótima para o sucesso do transplante (ROURA et al., 2015).

Estudos mostram também que os inventários de unidades de SCUP são crescentes em todo o mundo, o que tem facilitado acesso aos transplantes, que a contagem celular tem sido utilizada como substituto da potência do enxerto e que os usuários confiam na avaliação rigorosa realizada pelos bancos de sangue de cordão para evi-

tar o enxerto fraco após o descongelamento. Na prática as unidades de SCUP são selecionadas com base no sistema HLA e na dose celular. As falhas de pega de transplantes particularmente relacionadas à viabilidade geralmente se devem à falta de validação completa das etapas críticas do processo, ou mesmo falta de uso de ferramentas de controle de qualidade para detecção de unidades não conformes. Além disso a falta de congruência entre diferentes conjuntos de padrões e regulamentos e a falta de sistema comuns de qualidade entre os serviços resultam em um inventário internacional altamente heterogêneo. Para melhorar esta situação é fundamental a padronização dos processos e a melhoria da qualidade em cada etapa de fabricação que contribuam para a criação de inventários homogêneos com excelentes unidades em quantidade e qualidade (QUEROL et al., 2010)

A implantação do BSCP/HEMOPE exigiu uma série de ações como capacitação dos técnicos, validação dos processos críticos como transporte, coleta, processamento e criopreservação, qualificação de equipamentos, padronização de seus processos através de protocolos definidos e validados, implantação de controle de qualidade interno, gerenciamento de sistema de registro de não conformidades de forma a garantir a segurança e rastreabilidade de todos os seus processos.

Todas as unidades de sangue de SCUP, que fazem parte deste estudo foram obtidas de acordo com critérios técnicos referentes ao período analisado, a começar pela triagem clínica das gestantes onde se buscou pesquisar todo o histórico de eventos que pudessem comprometer o material a ser doado. Todas as doações foram autorizadas através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo doador ou representante legal, o qual esclarece todo e qualquer aspecto relacionado à doação. Todo o material referente a cada doação foi devidamente identificado através de etiquetas contendo código de barras de forma a garantir a rastreabilidade das unidades. Todas as unidades obedeceram ao tempo máximo de 48 horas entre o término da coleta e o início da criopreservação. A coleta de sangue da mãe foi realizada no dia do parto ou 48 (quarenta e oito) horas após. Em todas as unidades foram realizados testes de triagem para doenças transmissíveis pelo sangue (HIV, HTLV I/II, Hepatites, Doença de Chagas, Sífilis); testes moleculares para HIV/HVC, seguindo os mesmos algoritmos da triagem sorológica para doação de sangue; testes sorológicos para detecção do Citomegalovírus e Toxoplasmose e testes para detecção de hemoglobinas anormais. O processo de transporte das unidades de CPH entre o local de coleta e o BSCUP foi validado e monitorado continuamente através do uso de loggers para registro das temperaturas. Todas as unidades de SCUP que fizeram parte deste estudo apresentaram resultados não reagentes para doenças transmissíveis pelo sangue, bem como teste microbiológico negativo para fungos e bactérias.

O volume inicial de uma coleta oriunda de um cordão umbilical e placentário

sofre variações em função de uma série de fatores obstétricos, neonatais e técnicos. A capacitação e a habilidade da equipe técnica contribuem para que os resultados obtidos sejam satisfatórios. Atualmente a legislação não determina um volume inicial mínimo, mas sim uma celularidade inicial mínima capaz de gerar um produto eficaz para a pega de um transplante. Nas 113 amostras criopreservadas, o volume inicial mínimo coletado foi de 50mL, o volume inicial máximo foi de 166,80, com mediana de 86,40. Embora a legislação não determine um valor mínimo para processamento das amostras, na prática, o BSCUP/HEMOPE adotou um volume mínimo de 65 mL, quantidade adequada para uma boa separação deste produto hemoterápico, desde que atenda aos critérios de celularidade inicial prevista na legislação. O volume inicial coletado apresentou significativa correlação com o peso do recém-nascido, tal circunstancia foi evidenciada em estudos anteriores onde observou-se correlação direta significativa do peso fetal com o volume inicial coletado evidenciando também a correlação entre o peso fetal e a celularidade inicial peso fetal e a celularidade inicial, onde conclui que quanto maior o peso fetal maior a possibilidade de se obter um maior volume e consequentemente maior celularidade .o valor de celularidade(IZU et al., 2013).Outro estudo sugere que, uma abordagem prática pode ser definir o peso de nascimento específico como um preditivo de altas contagens e coletas seletivas de unidades, usando uma contagem de TCN para decidir quais unidades armazenar. Sugere também a caracterização mais completa com os níveis de CD34 e os níveis de CFU nas amostras pré-armazenamento.(ALLAN et al., 2013).

Em relação à celularidade, as amostras do BSCUP/HEMOPE se mostram dentro do especificado na legislação, estadetermina que o número total de células nucleadas viáveis, após o processamento da unidade e anteriormente a criopreservação seja igual ou superior a 5×10^8 (quinhentos milhões) de células nucleadas viáveis. O valor a partir deste limite, pode ser determinado de acordo com a política de cada serviço. No início das atividades, o BSCUP/Hemope estabeleceu o valor mínimo de $5,0 \times 10^8$, porém ,na prática, observou-se que adotar o valor mínimo inicial pode dificultar o atingimento do valor mínimo estipulado para os pós processamento, devido às perdas celulares que acontecem durante o processo. Como estratégia para evitar o aumento do índice de descarte, por insuficiente celularidade pós processamento, adotou-se o valor mínimo de $6,0 \times 10^8$ como parâmetro inicial de aceitação para coleta. A análise estatística pode-se constatar que a celularidade inicial apresentou significativa correlação com o peso do RN e com o volume de sangue coletado. Categorizar as amostras em unidades para uso adulto ou pediátrico foi importante para avaliar o inventário inicial e promover ações que possam equalizar o inventário de forma a atender à demanda dos transplantes para ambas as categorias. Este estudo mostrou que o BSCUP/HEMOPE possui em seu inventário inicial 21,24% unidades aptas a atenderem a pacientes adultos, com 50kg ou mais, e 78,76% unidades aptas para pacientes pediátricos com peso inferior a

50 kg. Dados de um estudo revelam que o inventário de um BSCUP em Barcelona , o qual possui 32% das unidades aptas para atender pacientes adultos e 38% a crianças, e explicam que a categorização facilita a tomada de decisões quanto à reposição de unidades ou mesmo orienta o descarte das mesmas(QUEROL et al., 2010) .

Em relação às células CD34 positivas, estudos indicam que a quantificação destas células indica a presença de células progenitoras hemtopoéticas na amostra coletada a fresco, embora não haja um consenso, aconselha-se para fins de transplante o cálculo em torno de $2,5 \times 10^6$ células por quilo de peso do receptor. Durante o período em que foi realizado este estudo não havia na legislação vigente uma referência de valores para a quantificação de Cdd34+ por unidade. O valor do parâmetro foi avaliado com base na legislação atual que determinou que uma unidade de SCUP a ser disponibilizada para transplante deve conter no mínimo $1,25 \times 10^6$ (um milhão e duzentos e cinquenta mil) células CD34+ viáveis (BRASIL, ANVISA, 2018).

Em relação à Contagem de Eritroblastos estudos mostram que a contagem destas células é variável nas primeiras horas de vida de um recém-nascido. Consideram-se típicos os valores de 0 a 10 eritroblastos por 100 leucócitos contados. Para efeito da análise da comparação de médias entre o peso RN e a Contagem de Eritroblastos(EB) do inventário do BSCUP/HEMOPE, categorizou-se a Contagem dos mesmos em dois grupos: um grupo com contagem de 0 a 10 Eritroblastos ($EB < 10$), para efeito didático aqui chamado de Grupo Controle e um grupo de unidades com contagem maior e igual a 10 Eritroblastos ($EB \geq 10$), para efeito didático, aqui denominado Grupo de Estudo, a análise estatística mostrou não houve diferença entre os pesos dos RN entre o grupo de Estudo e o grupo Controle. Ao se compararas médias entre a Idade Gestacional e a Contagem de Eritroblastos, categorizada conforme descrito acima a análise estatística mostra não haver diferença entre os dois grupos estudo e controle.

Um estudo realizado por Mendes et al, demonstrou uma associação entre RN de baixo peso, quando comparado ao grupo de $EB \geq 10$ (estudo), diferente do resultado aqui encontrado, no entanto, semelhante ao resultado encontrado neste estudo, não encontraram diferença estatística relacionadas ao grupo controle ($EB < 10$), nem com a idade gestacional(MENDES et al., 2015). Um segundo estudo, que avaliou RN de baixo peso, conseguiu demonstrar correlação entre a contagem de Eritroblastos no grupo de estudo ($EB \geq 10$) e a idade gestacional, o peso do nascimento e o pH do cordão. O autor sugere que a contagem de Eritroblastos pode ser uma ferramenta adicional no diagnóstico de fetos com restrição de crescimento e metabolicamente comprometidos que a quando ocorre hipóxia tecidual, no adulto ou mesmo no feto, ocorre aumento da produção de eritropoetina, só que esta não atravessa a barreira placentária o que provoca o aumento dos Eritroblastos (R; HJ; W, 2002)

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no período de dezembro de 2014 a junho de 2017, referentes ao processo de coleta e processamento das unidades coletadas pelo BSCUP/HEMOPE para composição do seu inventário inicial, mostram que as mesmas se encontram em conformidades com o especificado na legislação vigente no país e, portanto, qualificadas para atender à demanda transfusional de transplantes de células progenitoras hematopoéticas;

Este estudo evidenciou correlações estatísticas positivas entre o peso de RN e o volume inicial de sangue de cordão umbilical coletado nas unidades de SCUP; entre o peso do recém-nascido e a celularidade inicial das unidades de SCUP coletadas; entre o volume inicial e a celularidade pré processamento das unidades de SCUP coletadas; Identificar as correlações positivas do peso do RN com o aumento do volume inicial coletado e com o aumento da celularidade inicial das unidades de SCUP, será um dado importante na escolha do RN para coleta de sangue de cordão umbilical e placentário, como critério de triagem para a obtenção de unidades com maior volume e consequentemente, maior celularidade, contribuindo para a melhoria da qualidade do inventário do BSCUP/HEMOPE quanto ao conteúdo de células-tronco hematopoéticas;

Este estudo evidenciou que em relação à igualdade de médias não houve diferenças estatísticas entre a idade gestacional e o valor de células CD34+ nos grupos 0 (CD34+ <1,25) e CD34+(>=1,25); da mesma forma, não houve diferença estatística entre os pesos dos RN e os grupos de contagem de eritroblastos categorizadas em: grupo de unidades com contagem de 0 a 10 (EB<10), para efeito didático aqui chamado de grupo controle e o grupo de unidades com contagem maior igual a 10 (EB>=10), denominado grupo de estudo;

Este estudo possibilitou avaliar de forma panorâmica a possibilidade de aumento da celularidade inicial e o aumento do Total de Células inicial de coleta dos cordões atualmente $6,0 \times 10^8$ para $7,0 \times 10^8$, sem que haja um impacto significativo do descarte de unidades de SCUP coletadas e contribuindo assim para melhoria da qualidade das unidades de SCUP coletadas quanto à celularidade;

Este estudo favoreceu a análise do inventário inicial do BSCUP/HEMOPE, quanto à caracterização sócio-demográfica das gestante e dos recém-nascidos; quanto ao percentual de amostras que podem ser disponibilizadas para atender a pacientes adultos e pediátricos, mostrando que o percentual de unidades para atender a pacientes pediátricos é predominante; evidenciou também a necessidade de implantação ferramentas para análise do inventário após o descongelamento de suas unidades, como a implantação do teste de cultura celular para análise das amostras pós descongelamento; elaboração de um plano de estabilidade de amostras para avaliação

periódica do seu inventário; implantação do processo de acreditação do serviço, de forma a estabelecer medição e avaliação sistemática dos seus processos e torná-lo mais competitivo e auto sustentável;

Caracterizar as unidades de SCUP que compõem o inventário do BSCUP/HEMOPE mostrou ser uma importante ferramenta para tomadas de decisões futuras, para nortear a implementação de melhoria dos seus processos e produtos, para estimular e servir como referencial comparativo a outros serviços que queiram realizar o estudo dos seus inventários, por fim, este estudo favoreceu a melhoria da qualidade produto oferecido à população e ao incremento da qualidade na terapia transfusional disponibilizada à população.

Referências

- ALLAN, D. et al. A Review of Factors Influencing the Banking of Collected Umbilical Cord Blood Units. v. 2013, p. 1 – 7, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/sci/2013/463031/>>.
- AMORIN, B. et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. v. 27, n. 4, p. 137 – 150, 2014.
- ARMSON, B. A.; ALLAN, D. S.; CASPER, R. F. Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection, and Banking. v. 37, n. 9, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. *Dimensionamento dos Transplantes no Brasil e em cada estado (2009-2016)*. [S.l.], 2016.
- BERNARDINO, E.; FELLI, V. E. A.; PERES, A. M. COMPETÊNCIAS GERAIS PARA O GERENCIAMENTO EM ENFERMAGEM DE HOSPITAIS. v. 15, n. 2, p. 349 – 353, 6 2010. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/cogitare/article/view/17875>>.
- BRASIL, ANVISA. Relatório de Avaliação dos Dados de Produção dos Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário, 1–19. 2016.
- BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 214 , DE 7 DE FEVEREIRO DE 2018*, 2018.
- BRASIL, RESOLUÇÃO DIRETORIA COLEGIADA. RESOLUÇÃO Nº 56, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010. 2010. Disponível em: <http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG_NORMA_PESQ_CONSULTA.CFM>.
- BROXMEYER, H. E. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. v. 86, n. 10, p. 3828 – 32, 5 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2566997><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC287234>>. Acesso em: 2016-09-18T00:00:00+00:00.
- BROXMEYER, H. E. et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. v. 89, n. 9, p. 4109 – 13, 5 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373894><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC525642>>. Acesso em: 2016-09-18T00:00:00+00:00.
- CASTRO JR., C. G. de; GREGIANIN, L. J.; BRUNETTO, A. L. Transplante de Medula Óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. *Jornal de Pediatria*, v. 77, n. 5, p. 345 – 360, 2001.
- ENDE, M.; ENDE, N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. v. 99, n. 3, p. 276 – 80, 3 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4502979>>. Acesso em: 2016-09-18T00:00:00+00:00.
- GLUCKMAN, E. History of cord blood transplantation. v. 44, n. 10, p. 621 – 626, 2009.
- GLUCKMAN, E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. v. 25, n. 6, p. 255 – 259, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2011.06.003>>.

- KOIKE, K. Cryopreservation of Pluripotent and Committed Hemopoietic Progenitor Cells from Human Bone Marrow and Cord Blood. v. 25, p. 275 – 283, 1993. Acesso em: 2016-09-18T00:00:00+00:00.
- MASSUMOTO, C. et al. *Células-tronco: da Coleta aos Protocolos Terapêuticos*. [S.l.]: Atheneu, 2014.
- MORRISON, S. J.; SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. v. 88, n. 3, p. 287 – 298, 1997.
- NAVARRETE, C.; CONTRERAS, M. Cord blood banking: a historical perspective. v. 147, n. 2, p. 236 – 45, 10 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/7693><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796273>>.
- NAVARRETE, C.; CONTRERAS, M. *Cord blood banking: A historical perspective*. 2009. 236 – 245 p. Acesso em: 2016-09-18T00:00:00+00:00.
- NIEDERWIESER, D. et al. Hematopoietic stem cell transplantation activity worldwide in 2012 and a SWOT analysis of the Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation Group including the global survey. n. October 2015, p. 1 – 8, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bmt.2016.18>>.
- PORTARIA. *PORTARIA Nº 2.381/GM em 29 de setembro de 2004*. [S.l.], 2004. Disponível em: <http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG_NORMA_PESQ_CONSULTA.CFM>.
- QUEROL, S. et al. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. v. 45, n. 6, p. 970 – 978, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2010.7>>.
- R, A.; HJ, H.; W, S. Nucleated red blood cell counts in growth-restricted neonates with absent or reversed-end-diastolic umbilical artery velocity. *Clin Exp Obstet Gynecol.*, v. 29, p. 242 – 246, 2002.
- ROURA, S. et al. The role and potential of umbilical cord blood in an era of new therapies: a review. v. 6, n. 1, p. 123 –, 2015. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/6/1/123>>.
- SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. v. 55, n. 1, p. 6 – 23, 1 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188938>>.
- VIGORITO, A. C.; SOUZA, C. a. D. Transplante de células-tronco hematopoéticas e a regeneração da hematopoese. v. 31, n. 4, p. 280 – 284, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000400017&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.
- WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. v. 100, n. 1, p. 157 – 168, 2000.
- WEN, S. H. et al. Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. v. 46, n. 1, p. 39 – 45, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.transci.2011.10.031>>.
- ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. *Células-tronco : a nova fronteira da medicina*. [S.l.: s.n.], 2006. Acesso em: 2016-09-17T00:00:00+00:00.

Apêndices

**APÊNDICE A – APÊNDICE A - ENDEREÇO DOS CURRÍCULOS LATTES DOS
PESQUISADORES**

Maristela Delgado Orellana - <http://lattes.cnpq.br/790039955152800>

Ana Maria do Nascimento Costa - <http://lattes.cnpq.br/7900399551528003>

Anexos

ANEXO A – Ficha com dados da Mãe e RN

Figura 17 – Legenda

HEMOPE - RECIFE - PE

Número: 000001/17

Histórico Clínico

Formulário 1: entrevista Pré-natal e Parto

0.1.Maternidade 0.2.Data 0.3.Horário inicial
 0.4.Entrevista ☐ Pré-parto ☐ Pré-natal

1.Dados Maternos

1.1.Nome
 1.2.D.N. 1.3.Idade
 1.4.Endereço
 1.5.Número 1.6.Complemento 1.7.Bairro
 1.8.Município 1.9.UF 1.10.CEP
 1.11.telefone1 1.12.telefone2 1.13.telefone3
 1.14.Profissão 1.15.RG 1.16.CPF
 1.17.Religião ☐ Católico Apostólico Romano ☐ Evangélica ☐ Judaica
☐ Espírita ☐ Sem religião ☐ Outros (especificar)

<https://brasilcord.inca.gov.br/BNC/HEMOPE>

Figura 19 – Ficha com dados da Mãe e RN

HEMOPE - RECIFE - PE

Número: 000001/17

Molusco Contagioso	☐ Não	☐ Sim
Pediculose do púbis	☐ Não	☐ Sim
SIDA (AIDS)	☐ Não	☐ Sim

3.2. Antecedentes Obstétricos

Gestação Paridade

Aborto

Espontâneo Provocado

Figura 20 – Ficha com dados da Mãe e RN

HEMOPE - RECIFE - PE

Número: 000001/17

4. Fator de Risco

Esteve em área endêmica de Chagas/Malária?	☐ Não	☐ Sim
Fez tattoo e/ou piercing?	☐ Não	☐ Sim
Fez uso de drogas?	☐ Não	☐ Sim
Praticou sexo seguro (uso de preservativo)?	☐ Não	☐ Sim
Recebeu transfusão sanguínea no último ano?	☐ Não	☐ Sim
Teve acidente com agulhas/vidros?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato com fezes de animais durante essa gestação?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato com sangue e/ou fluidos corporais?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pessoas hemofílicas/politransfundid?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pessoas homo ou Bissexuais?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pessoas que tenham tido Hepatite?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pessoas que tenham tido Icterícia?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pessoas que tenham tido Sífilis?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pss que tenham teste positivo HIV?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com pss Teste positivo Hepatite B?	☐ Não	☐ Sim
Teve contato sexual com usuários de drogas (inj ou não)?	☐ Não	☐ Sim
Teve gravidez de risco?	☐ Não	☐ Sim
Vc teve Zika ou relações sexuais com alguém que tenha tido?	☐ Não	☐ Sim

5. Gravidez Corrente

5.1. DUM	<input type="text"/>	5.2. DPP	<input type="text"/>
5.3. Pré-Natal	☐ Não ☐ Sim	Local:	<input type="text"/>
5.4. Número de Consultas:	<input type="text"/>		
5.5. Idade Gestacional (USG)	<input type="text"/>	Data:	<input type="text"/>
5.6. Idade Gestacional (UM)	<input type="text"/>	Data:	<input type="text"/>
5.7. Febre sem diagnóstico?	☐ Não ☐ Sim		
5.8. Infecção Diagnosticada?	☐ Não ☐ Sim	5.9. Qual?	<input type="text"/>
5.10. Imunização Antitetânica?	☐ Não ☐ Sim	☐ Incompleta	
5.11. Imunização Hepatite B?	☐ Não ☐ Sim	☐ Incompleta	

5.12. Testes Sorológicos Realizados Pré-Natal

Exames	Não Reagentes	Reagentes	Inconclusivo	N/I
--------	---------------	-----------	--------------	-----

Figura 21 – Ficha com dados da Mãe e RN

HEMOPE - RECIFE - PE

Número: 000001/17

Anti-HBc-IgG	☐	☐	☐	☐
Anti-HBc-total	☐	☐	☐	☐
Anti- HCV	☐	☐	☐	☐
Anti-HIV I/II	☐	☐	☐	☐
Anti-HIV I/II -1	☐	☐	☐	☐
Anti-HIV I/II -2	☐	☐	☐	☐
Anti- HTLV I/II	☐	☐	☐	☐
Chagas	☐	☐	☐	☐
CMV IgG	☐	☐	☐	☐
CMV IgM	☐	☐	☐	☐
Eletroforese de Hb	☐	☐	☐	☐
HBS-Ag	☐	☐	☐	☐
NAT (Teste de Ácido Nucleico)	☐	☐	☐	☐
Sífilis-VDRL	☐	☐	☐	☐
Toxoplasmose IgG	☐	☐	☐	☐
Toxoplasmose IgM	☐	☐	☐	☐

5.13. ImunoHematologia

	ABO				Rh (D)	
Gestante	☐ A	☐ B	☐ O	☐ AB	☐ POS	☐ NEG
PAI RN	☐ A	☐ B	☐ O	☐ AB	☐ POS	☐ NEG

5.14. Coombs Indireto

☐ Negativo ☐ Positivo

5.15. Fez uso de Imunoglobulina anti D?

☐ Não ☐ Sim

5.16. Gestação a partir de fertilização assistida com gametas (óvulo ou sptz) de doadores?

☐ Não ☐ Sim

HEMOPE - RECIFE - PE

Número: 000001/17

6. Dados do Parto

6.1. Data de Admissão:	<input type="text"/>	6.2. Hora de Admissão:	<input type="text"/>
6.3. Data de Coleta	<input type="text"/>	6.4. Hora de Coleta	<input type="text"/>
6.5. Trabalho de Parto?	☐ Não ☐ Sim	Início (hora)	<input type="text"/> Duração (h) <input type="text"/>
6.6. Trabalho de Parto Induzido?	☐ Não ☐ Sim		
6.7. Tipo de Trabalho de Parto?			
☐ Vaginal (Natural)	6.7.1. Vaginal Assistido?	☐ Não ☐ Sim	☐ Fórceps ☐ Vácuo
☐ Cesárea			
6.8. Indicação	<input type="text"/>		
6.9. Sofrimento Fetal?	☐ Não ☐ Sim		
6.10. Líquido amniótico com mecônio?	☐ Não ☐ Sim		
6.11. Ruptura da membrana antes do parto?	☐ Não ☐ Sim	Início (hora)	<input type="text"/> Duração (h) <input type="text"/>
6.12. Infecções ou lesões na genitália durante o	☐ Não ☐ Sim		
6.13. Febre durante o trabalho de parto?	☐ Não ☐ Sim ☐ Ignorado		
6.14. Hora do Nascimento	<input type="text"/>	6.15. Hora Dequitação	<input type="text"/>
6.16. Peso Placentário (g)	<input type="text"/>		
6.18. Composição do cordão umbilical:	Artérias:	<input type="text"/>	Veia: <input type="text"/>
6.19. Complicações durante o parto	6.20. Outras complicações durante o parto		
☐ Discinesias ☐ Distocia	<input type="text"/>		
☐ Distocia do cordão umbilical			
☐ DPP			
6.21. Complicações no pós-parto	6.22. Outras complicações no pós-parto		
☐ Hemorragia pós-parto	<input type="text"/>		
☐ Encarceramento da placenta			
☐ Retenção placentária			
☐ Atonia uterina ☐ Laceração de trajeto			
☐ Inversão uterina			

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Figura 22 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome(Mãe): _____
 Data de Nascimento: _____ Idade: _____
 Endereço: _____
 Telefones: _____ E-mail: _____
 Maternidade: **HOSPITAL DO TRICENTENÁRIO** Membro da Equipe: _____

No momento da assinatura do presente termo, foi esclarecido que o sangue de cordão umbilical placentário (SCUP) deverá ser coletado somente após a secção do cordão umbilical, não trazendo, portanto, nenhum prejuízo à mãe e ao(a) filho(a); deverá ser utilizado para realização de transplante de células progenitoras hematopoiéticas. O critério de utilização deverá ser do banco de sangue de cordão umbilical e placentário – BSCUP; todas as informações referente à mãe, ao(a) filho(a) e ao SCUP coletado, deverão ser tratadas de forma sigilosa, garantindo o anonimato; no momento do parto, deverá ser coletada uma amostra de sangue da mãe para realização de exames de detecção de doenças infecciosas transmissíveis pelo sangue. A critério do BSCUP outros testes poderão ser realizados nesta amostra; também deverá ser coletada uma amostra do SCUP para realização de exames necessários para o transplante de células progenitoras hematopoiéticas; qualquer resultado alterado nos exames será comunicado à mãe pelo médico responsável pelo BSCUP; amostras de células, plasmas, soro e DNA do sangue da mãe e do SCUP deverão ser armazenadas para testes futuros; o prontuário hospitalar da mãe e do(a) filho(a) poderão ser consultados a qualquer momento pelo BSCUP ou pelo serviço de transplante, para obtenção de dados clínicos e história médica necessários; o BSCUP fica autorizado a transferir a unidade de SCUP, assim como todos os dados a ela relacionados, para serviços de transplante e centros de registro; o BSCUP fica autorizado a descartar a unidade de SCUP caso não sejam atendidos os critérios de armazenamento, ou seja, excedido seu prazo de validade; fica autorizada a utilização da unidade de SCUP em projetos de pesquisa aprovados pelo comitê de ética do hospital ou maternidade vinculado(a) ao BSCUP; não será recebida nenhuma remuneração, compensação material ou financeira, ou privilégio pela doação de SCUP; a doação é livre e voluntária sendo facultada a desistência no momento da coleta, sem que isso cause prejuízo ao atendimento da mãe e do recém-nascido; este consentimento prévio não obriga o hospital, a maternidade, ou o BSCUP a coletar o SCUP do(a) filho(a), se houver impedimentos técnicos para a coleta. As partes declaram, expressamente, que leram, compreenderam e estão satisfeitos com todas as informações recebidas e que todas as dúvidas foram esclarecidas. Em consequência, dão o seu consentimento para a coleta de SCUP do(a) filho(a) e aceitam as condições acima descritas.

Recife, de de 20

ASSINATURAS:

 Doadora (mãe)

 Médico / CRM

BSCUP/HEMOPE