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

PAULA RENATA MACHADO PASSOS

Associação entre os níveis citoplasmáticos da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e a capacidade proliferativa “*in vitro*” das células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

Ribeirão Preto

2018

PAULA RENATA MACHADO PASSOS

Associação entre os níveis citoplasmáticos da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e a capacidade proliferativa “*in vitro*” das células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

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

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

Ribeirão Preto

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

P289a

Passos, Paula Renata Machado

Associação entre os níveis citoplasmáticos da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e a capacidade proliferativa “*in vitro*” das células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário./ Paula Renata Machado Passos – Ribeirão Preto, 2018.

81f.; il. 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional

Orientador: Eduardo Magalhães Rego

1. Sangue de cordão umbilical e placentário. 2. Ensaio clonogênico. 3. Aldeído desidrogenase. 4. Células progenitoras hematopoéticas.

CDU 616-089.843

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PASSOS, Paula Renata Machado

Título: Associação entre os níveis citoplasmáticos da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e a capacidade proliferativa “*in vitro*” das células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário

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

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina
Transfusional

Aprovada em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Assinatura: _____

**Dedico este trabalho aos meus pais e
ao André pelo apoio incondicional e
constante incentivo.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Eduardo M. Rego pela orientação, compreensão e todo o conhecimento transmitido e compartilhado.

À Dra. Karen, Dra. Márcia, Sandra e diretoria da Fundação Hemominas pelo incentivo e apoio.

À colega e amiga do Cetebio, Nathália, pelo companheirismo e ajuda durante todos esses anos trabalhando juntas.

À equipe do Laboratório de Hematologia do HC-FMRP, principalmente à Priscila, por sempre me receber tão bem e me ajudar com as dúvidas que surgiram durante o estudo.

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

Ao Hemocentro de Ribeirão Preto pelos ensinamentos teóricos e práticos compartilhados.

À Raquel Botelho por nos ajudar em todos os momentos.

Aos colegas do mestrado por compartilharem suas experiências e tornar as idas a RP sempre produtivas e muito divertidas.

Aos colegas do Cetebio pelo suporte nos momentos em que estava ausente.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e não mediram esforços para me sentir realizada.

Ao André pelo companheirismo, paciência, apoio e compreensão pelos momentos que não estava presente durante o desenvolvimento deste trabalho.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

RESUMO

PASSOS, P.R.M. **Associação entre os níveis citoplasmáticos da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) e a capacidade proliferativa “*in vitro*” das células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário.** 2018, 81p. Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2018.

A utilização das células progenitoras hematopoéticas (CPH) obtidas do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) apresenta vários benefícios para o transplante de CPH em comparação às células provenientes de outras fontes. Dentre eles, a maior disponibilidade e a maior imaturidade imunológica das CPH, o que permite certa flexibilidade nos critérios de compatibilidade entre doador e receptor e uma menor taxa de reação do enxerto-versus-hospedeiro. A legislação brasileira e órgãos internacionais exigem a realização de vários testes para garantir a qualidade do produto hemoterápico contendo CPH a ser transplantado. O objetivo deste estudo foi confirmar que o teste para quantificação de CPH com elevada atividade da enzima ALDH1(ALDH^{br}) pode ser considerado um teste de adequado ou seja, é capaz de prever quais produtos tem melhor capacidade de repopular a medula óssea do recipiente após o transplante. Para isso, foram utilizadas 40 unidades de SCUP coletadas e processadas pelo Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio / Fundação Hemominas. As unidades foram processadas por método automatizado e amostras do creme leucocitário (*buffy coat*) foram coletadas para a realização da quantificação de células ALDH^{br}, quantificação de células CD34+, ensaio clonogênico (CFU), hemograma e cálculo do total de células nucleadas (TCN). A citometria de fluxo foi utilizada para a quantificação das CPH ALDH^{br} e CD34+ e das subpopulações CD45^{dim} e CD38+. Outras informações como idade materna, idade gestacional e sexo do recém-nascido também foram coletadas para descrição das unidades. Para verificar a viabilidade da utilização do teste de ALDH pelos BSCUP foi realizado o levantamento do seu custo. A capacidade funcional das CPH em proliferar e se diferenciar em tecido hematopoético foi avaliada por meio do ensaio clonogênico. Detectou-se correlação entre a quantidade de células ALDH^{br} e o número de colônias no ensaio clonogênico ($p<0,001$), entre o número de células ALDH^{br} e de células CD34+ ($p=0,001$) e entre o número de colônias no ensaio clonogênico e o número de células CD34+ ($p<0,001$). A imunofenotipagem mostrou que 46,25% das células ALDH^{br} eram CD45^{dim}CD38+CD34+. Os dados sugerem que a quantificação de células ALDH^{br} em unidades de SCUP pode ser considerada teste adequado, de baixo custo, de execução simples, rápida e menos dependente do operador em relação ao ensaio clonogênico.

Palavras-chaves: ALDH, CFU, Sangue de cordão umbilical e placentário, Células Progenitoras Hematopoéticas, CD34+, Banco de sangue de cordão umbilical e placentário.

ABSTRACT

Passos, P.R.M. **Association between the cytoplasmic levels of dehydrogenase aldehyde enzyme (ALDH) and the “in vitro” proliferative capacity of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood.** 2018, 81p. Master dissertation. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2018

The use of the umbilical cord blood cells presents numberless benefits when compared to the cells from different sources. Among them, the ease of availability, the bigger immunological immaturity, which allows some flexibility in the compatibility between donor and receptor and less induction of reaction of graft-versus-host. The Brazilian legislation and international organizations demand the practice of various tests to guarantee the quality of the product to be transplanted. The aim of this research was to confirm that the test used to quantify ALDH^{br} cells can be considered a power test, meaning that it tests the ability to repopulate the bone marrow after transplant. For this study, it has been used 40 units of SCUP collected and processed by the Cetebio Umbilical Cord Blood Bank - Fundação Hemominas. The units were processed by the automatized method and the samples of the final product (buffy coat) were collected for the quantification of ALDH^{br} cells, quantification of CD34+ cells, clonogenic essay (CFU), hemogram and the total number of nucleated cells (TNC). It was used the flow cytometry to perform ALDH and CD34+ tests. Besides that, it was also performed the association of antibodies anti-CD34, anti-CD45 and anti-CD38 for the immunophenotyping of the units. Other information such as maternal age, fertilization age and the newborn gender were also collected for description of the units. In order to verify the viability of the use of the ALDH test by BSCUP its costs were calculated, as well as of the clonogenic essay. The results showed a significant correlation between ALDH^{br} cells and the clonogenic essay ($p < 0.001$), between ALDH^{br} and CD34+ cells ($p = 0,001$) and between the clonogenic essay and the quantification of CD34+ cells ($p < 0,001$). The immunophenotyping revealed that 46,25% of ALDH^{br} cells were CD45^{dim}CD38+CD34+. The data indicated that the quantification of ALDH^{br} cells in the SCUP units can be considered a powerful and low cost procedure, of easier and quicker execution and less operator dependent.

Keywords: ALDH, CFU, Umbilical cord blood, Hematopoietic stem cells, CD34+, Umbilical cord blood bank

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Transplantes de tecidos realizados no Brasil nos últimos anos	15
Figura 2: Colônia CFU-GEMM. Aumento 4X.....	31
Figura 3: CFU – G/M Aumento 4X.....	31
Figura 4: CFU/BFU – E Aumento 4X.....	31
Figura 5: ALDH – SCUP	32
Figura 6: Controle Negativo – ALDH – SCUP	33
Figura 7: Estratégia de análise - Amostra 198 – Pós-processamento.....	34
Figura 8: Estratégia de análise - Amostra 198 – “Lixo”	35
Figura 9: Estratégia de análise - Amostra 218 – Pós-processamento.....	36
Figura 10: Estratégia de análise - Amostra 218 – “Lixo”	37
Figura 11: Distribuição das células ALDH ^{br} CD45 ^{dim} CD38+CD34+ no Número de Células ALDH ^{br}	40
Figura 12: Distribuição do Número de Células ALDH ^{br} no TCN da unidade	40
Figura 13: Correlação entre os valores de ALDH CD38/nº células e Número CFU total bolsa.....	41
Figura 14: Correlação entre os valores de ALDH sem <i>gate</i> /nº células e Número CFU total bolsa.....	42
Figura 15: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/frequências e Número CFU total bolsa.....	42
Figura 16: Correlação entre os valores de ALDH sem <i>gate</i> /frequências e Número CFU total bolsa.....	43
Figura 17: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/nº células e TCN.....	44
Figura 18: Correlação entre os valores de ALDH sem <i>gate</i> /nº células e TCN.....	44
Figura 19: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/frequência e TCN.....	45
Figura 20: Correlação entre os valores de ALDH sem <i>gate</i> /frequência e TCN.....	45
Figura 21: Correlação entre os valores de células CD34+ e número de CFU total bolsa.....	47
Figura 22: Correlação entre os valores de células CD34+ e TCN.....	47
Figura 23: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH CD38+/nº células	48
Figura 24: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH Total sem <i>gate</i> /nº células.....	48
Figura 25: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH CD38+/frequência.....	49
Figura 26: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH sem <i>gate</i> /frequência.....	49
Figura 27: Correlação entre os valores de células CD34+ e Idade materna.....	50
Figura 28: Correlação entre os valores do TCN e a Idade materna.....	51
Figura 29: Correlação entre os valores do TCN pré-processamento e a Recuperação	51
Figura 30: Resumo do levantamento de custos – Ensaio clonogênico	52

Figura 31: Resumo do levantamento de custos – Teste para quantificação de células ALDH ^{br}	52
Figura Suplementar C 1 – Levantamento de Custos – Ensaio clonogênico 1	68
Figura Suplementar C 2 – Levantamento de Custos – Ensaio clonogênico 2	69
Figura Suplementar C 3 – Levantamento de Custos – Ensaio clonogênico 3	70
Figura Suplementar C 4 – Levantamento de Custos – Ensaio clonogênico 4	71
Figura Suplementar C 5 – Levantamento de Custos – Ensaio clonogênico 5	71
Figura Suplementar C 6 – Levantamento de Custos – ALDH 1	72
Figura Suplementar C 7 – Levantamento de Custos – ALDH 2	73
Figura Suplementar C 8 – Levantamento de Custos – ALDH 3	74
Figura Suplementar C 9 – Levantamento de Custos – ALDH 4	75
Figura Suplementar C 10 – Levantamento de Custos – ALDH 5	75
Figura Suplementar C 11 – Levantamento de Custos – ALDH 6	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nomenclatura utilizada para as análises das células ALDH ^{br}	25
Tabela 2: Caracterização das amostras de SCUP quanto a idade gestacional, peso do RN, sexo do RN e idade materna.....	29
Tabela 3: Quantificação de células CD34+ viáveis.....	38
Tabela 4: Número mediano de CFU, ALDH ^{br} , CD34+ e TCN.....	39
Tabela 5: Valores descritivos das Porcentagens1 (ALDH CD45 ^{dim} CD38+CD34+ em ALDH ^{br}) e 2 (ALDH ^{br} em TCN).....	39
Tabela 6: Análise da correlação de Spearman CFU e ALDH	41
Tabela 7: Análise da correlação de Spearman TCN e ALDH	43
Tabela 8: Análise da correlação de Spearman CD34+, ALDH, CFU e TCN	46
Tabela 9: Análise da correlação de Spearman da Idade Materna com TCN e CD34; e de TCN da unidade de pré-processamento com a Recuperação.....	50
Tabela 10: Frequência de células ALDH ^{br} em outros estudos	57
Tabela Suplementar A: Resultado do Ensaio Clonogênico	64
Tabela Suplementar B1: Quantificação de células ALDH ^{br} com imunofenotipagem CD45 ^{dim} CD38+CD34+	66
Tabela Suplementar B2: Quantificação de células ALDH ^{br} sem imunofenotipagem...	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase
ALDH ^{br}	Aldefluor <i>bright</i> (brilhante ou positivo)
BSCUP	Banco de sangue de cordão umbilical e placentário
Cetebio	Centro de Tecidos Biológicos de Minas Gerais
CD 34	Cluster of Differentiation 34
CD 38	Cluster of Differentiation 38
CD 45	Cluster of Differentiation 45
CFU	Unidade formadora de colônias
CFU/BFU-E	Unidade formadora de colônias de eritrócitos
CFU - GEMM	Unidade formadora de colônias de eritrócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos
CFU-GM	Unidade formadora de colônias de granulócitos, monócitos e macrófagos
CPH	Célula progenitora hematopoética
CT	Células-tronco
CTH	Células tronco hematopoéticas
DEAB	Dimetilaminobenzaldeído
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCl	Ácido Clorídrico
HEMOMINAS	Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais
HLA	Antígeno leucocitário humano
ISHAGE	<i>Internacional Society of Hemotherapy and Graft Engineering</i>
MO	Medula óssea
NRBC	<i>Nucleated red blood cells</i> – Eritrócitos nucleados
RN	Recém-nascido
SCUP	Sangue do cordão umbilical e placentário
SNT	Sistema Nacional de Transplantes
SSC	<i>Side scatter</i>
SSCI	<i>Low side scatter</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas
TCN	Total de células nucleadas
WBC	<i>White Blood Cells</i> - Glóbulos brancos

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.....	16
1.2	CONTROLE DE QUALIDADE EM UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.....	17
1.2.1	Ensaio de formação de colônias – Ensaio Clonogênico	18
1.2.2	Enzimas Aldeído Desidrogenases.....	20
2.	HIPÓTESE.....	22
3.	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4.	MÉTODO	23
4.1	DESENHO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	23
4.2	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS.....	23
4.3	PROCESSAMENTO DO SCUP	24
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE (ALDH) EM UNIDADES DE SCUP	24
4.5	ENSAIO CLONOGÊNICO	25
4.6	QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34+ VIÁVEIS.....	26
4.7	INFORMAÇÕES DA DOAÇÃO E DO RECÉM-NASCIDO.....	26
4.8	CONTAGEM DAS CÉLULAS NUCLEADAS.....	26
4.9	CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO	27
4.10	LEVANTAMENTO DOS CUSTOS	27
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4.12	ASPECTOS ÉTICOS	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	AMOSTRAS.....	29
5.2	ENSAIO CLONOGÊNICO	30
5.3	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ALDH ^{br}	32
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD34+	37
5.5	ANÁLISE DESCRITIVA DA QUANTIFICAÇÃO DE CFU, NÚMERO DE CÉLULAS ALDH ^{br} NAS DIFERENTES FRAÇÕES CELULARES E CÉLULAS CD34+ E TNC	39
5.5.1	Quantificação de células ALDH ^{br} no TCN e da subpopulação ALDH ^{br} CD38+CD45 ^{dim} CD34+ na população ALDH ^{br}	39
5.6	ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES	41
5.6.1	Correlação entre o número de CFU e a quantidade de células ALDH ^{br} nas diferentes subpopulações.....	41

5.6.2	Correlação entre a quantidade de células ALDH ^{br} nas diferentes subpopulações e o TCN	43
5.6.3	Correlação entre a quantidade de células CD34+, a quantificação de células ALDH ^{br} nas diferentes subpopulações, o número de CFU e o TCN	46
5.6.4	Correlação entre a Idade Materna, a quantificação de células CD34++, o TCN pré-processamento e a recuperação.....	50
5.7	LEVANTAMENTO DE CUSTOS.....	52
5.7.1	Ensaio Clonogênico – CFU	52
5.7.2	ALDH	52
6.	DISCUSSÃO	53
7.	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE A – RESULTADO DO ENSAIO CLONOGÊNICO	64
	APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ALDH ^{br}	66
	APÊNDICE C – LEVANTAMENTO DE CUSTOS	68
	APÊNDICE D– TCLE UTILIZADO NA PESQUISA	77

1. INTRODUÇÃO

O Sistema Único de Saúde (SUS), criado pela Constituição Federal Brasileira em 1988, é um dos maiores sistemas públicos de saúde do mundo. Atende mais de 180 milhões de pessoas (BRASIL, 2009) e contempla desde atendimentos ambulatoriais a procedimentos complexos. Apesar das permanentes dificuldades, várias medidas são tomadas pelo Ministério da Saúde visando à promoção da saúde. Uma delas é incorporação do transplante de órgãos, tecidos e células no SUS em quantidade e qualidade adequadas.

O Sistema Nacional de Transplantes (SNT), órgão do Governo Federal responsável por essa área, busca cada vez mais criar novas estratégias para aumentar o número de doadores e consequentemente o número de transplantes. Dentre os transplantes realizados no Brasil, o transplante de células progenitoras hematopoéticas (CPH), conhecido como transplante de medula óssea, vem crescendo muito. A cada ano, novos centros são habilitados para essa finalidade (ABTO, 2017) (FIGURA 1).

Figura 1: Número de transplantes de tecidos realizados no Brasil nos últimos anos

Fonte: ABTO, 2017

As células tronco hematopoéticas (CTH) são células multipotentes, com capacidade de auto renovação e diferenciação, e assim de promover a reconstituição hematopoética de receptores totalmente irradiados. As células progenitoras hematopoéticas (CPH) são células já

diferenciadas em alguma linhagem celular, linfóide ou mielóide e capazes de originar células específicas daquela linhagem (BORDIN; LANGHI; COVAS, 2007; PEARCE; BONNET, 2007).

O transplante de células tronco ou de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) tem como objetivo promover a repopulação celular e restabelecer a hematopoese na medula óssea do receptor. Diferentes doenças são tratadas por esse transplante, como linfomas, leucemias, anemias e doenças autoimunes (AABB, 2014; ZHONG X, *et al.*, 2010; BOUZAS, 2000).

Os transplantes envolvendo essas células podem ser classificados em autólogos, em que as células progenitoras utilizadas são do próprio indivíduo que receberá o transplante, e alogênico, quando as células provêm de outro indivíduo, aparentado ou não, que compartilha grande parte dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade (HLA) com o receptor (AABB, 2014).

As fontes viáveis de obtenção de células para transplante incluem: 1) a medula óssea, por meio de punção aspirativa da crista ilíaca; 2) o sangue periférico, após mobilização farmacológica das células progenitoras da medula óssea e 3) o sangue de cordão umbilical e placentário, coletado imediatamente após o nascimento do recém-nascido (RN) (AABB, 2014).

1.1 SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

O primeiro transplante de medula óssea utilizando o sangue de cordão umbilical e placentário como fonte de CPH ocorreu em 1988 em criança de 5 anos diagnosticada com anemia de Fanconi. O procedimento foi realizado pela equipe médica do Duke University Medical Center (Durham, EUA) e as células foram originadas do SCUP da irmã do paciente (GLUCKMAN *et al.*, 1989).

A utilização das CPH do sangue de cordão umbilical e placentário para transplante apresenta vários benefícios se comparada à das células provenientes das outras duas fontes. Dentre eles, a maior disponibilidade e maior imaturidade imunológica das CPH, o que permite certa flexibilidade nos critérios de compatibilidade entre doador e receptor, e menor taxa de reação do enxerto-versus-hospedeiro, a simplicidade da técnica de coleta, que é não invasiva e sem risco para a mãe ou para o bebê, o menor risco de transmissão de infecções, a maior capacidade proliferativa e o maior número de potenciais doadores (AABB, 2014; SULLIVAN *et al.*, 2008; RUBINSTEIN *et al.*, 1995; SHOULARS *et al.*, 2016.).

Duas informações são fundamentais para estimar o sucesso na enxertia, frequência de complicações e sobrevida após o transplante: a dose celular e a tipagem do antígeno leucocitário humano (HLA). O HLA é o responsável pela regulação da resposta imunológica e é a base para a escolha do doador (CHOO, 2007). Estudos mostram que o número total de células está diretamente relacionado com o sucesso da enxertia e a sobrevida após o transplante (GENEUGELIJK; SPIERING, 2015). Apesar de estes serem o ponto de partida para a escolha de uma unidade de SCUP, outros testes precisam ser realizados com o sangue de cordão umbilical e placentário coletado para garantir a qualidade da unidade, e indiretamente estimar a sua capacidade de restabelecer a hematopoese na medula óssea do receptor. A legislação brasileira determina os testes mínimos a ser realizados que incluem a quantificação de células CD34+ e a avaliação da função das células por meio da quantificação do número de unidades formadoras de colônias (CFU) em ensaio clonogênico, ou da realização de teste funcional equivalente.

Apesar das vantagens, pesquisas indicaram que transplantes com SCUP apresentam enxertia tardia, o que pode favorecer o surgimento de infecções e maior dificuldade de tratá-las (LINDEMANS; BESIEN, 2015; SHOULARS *et al.*, 2016). Outras desvantagens são o baixo volume de sangue e o menor número de células nucleadas por volume do produto em comparação aos aspirados de medula óssea, que muitas vezes podem ser insuficientes para um transplante, principalmente quando o receptor é adulto. Devido a essas desvantagens, os BSCUP buscam criopreservar cada vez mais unidades com o maior TNC possível, e os pesquisadores buscam padronizar testes que auxiliem na escolha das melhores unidades de SCUP para transplante, a fim de minimizar os riscos associados ao tratamento.

Com o objetivo de aumentar a probabilidade de encontro de doadores não aparentados compatíveis, bem como aumentar a realização de transplantes de medula óssea no Brasil, em 2004 criou-se a Rede BrasilCord, que reúne os Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) públicos do país. Atualmente são 13 bancos em funcionamento e quatro em implantação.

1.2 CONTROLE DE QUALIDADE EM UNIDADES DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

Os BSCUP são responsáveis pela captação, triagem, coleta, processamento, criopreservação e armazenamento das CPH. O controle de qualidade garante em todas as

etapas a conformidade das células que serão transplantadas e engloba diversas atividades, como a contagem de células CD34+ e o ensaio de formação de colônias.

O teste para quantificação de células CD34+ é exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2010) e realizado por todos os bancos. A CD34 é uma glicoproteína de membrana da CPH, de aproximadamente 104-120 kDa, que pode ser identificada e quantificada por meio da citometria de fluxo (MORETTI, 2002; GOODELL, 1999). Esta quantificação é considerada o padrão ouro para identificar CPH com elevada probabilidade de enxertia. Estudos mostram que o número de células CD34 está diretamente relacionado ao tempo até enxertia e à sobrevida após o transplante (FALLON et al., 2003; LEE et al., 2015).

Apesar de ser um teste imprescindível, as células CD34+ são diversas e estudos mostraram que a expressão desse marcador não é invariável para todas as células progenitoras hematopoéticas (STORMS *et al.*, 2005; GOODELL, 1999). Estudos mostram que não são todas as CPH que expressam o antígeno, e que não são todas as células CD34+ que estão envolvidas na reconstituição da hematopoese (VEERAPUTHIRAN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

Além do CD34, outros antígenos são expressos nas células tronco e em células progenitoras hematopoéticas. É o caso do CD38, que está diretamente relacionado com a maturidade das células e à capacidade de regeneração e reconstituição da medula óssea (MO) (PERACE; BONNET, 2007). Segundo Summers *et al.* (2001), citado por Hordyjewska, Popiolek e Horecka (2015) e Hao *et al.* (1995), células CD38- são mais primitivas que células CD38+.

1.2.1 Ensaio de formação de colônias – Ensaio Clonogênico

O ensaio de formação de colônias é um ensaio *in vitro* que mostra a capacidade de proliferação e diferenciação das CPH em diferentes linhagens hematopoéticas. Consiste em plaquear a suspensão celular em meio semi-sólido, contendo citocinas e outros suplementos que possibilitam a proliferação celular e sua diferenciação. O meio semi-sólido dificulta o movimento das células e garante que as células originadas de uma única célula progenitora permaneçam próximas entre si, o que permite a constituição de colônias e sua identificação e contagem (STEMCELL, 2010).

A classificação das colônias é realizada de acordo com a composição das células e suas características, como tamanho e formato. O método do ensaio clonogênico pode variar

entre centros, dependendo dos objetivos do médico ou pesquisador. Entretanto, o padrão ouro utilizando atualmente permite detectar células progenitoras da linhagem eritróide (CFU-E [do inglês *colony forming unity*] e BFU-E), células progenitoras da linhagem de granulócitos, monócitos e macrófagos (CFU-GM), da linhagem mielóide como um todo (CFU-GEMM) e progenitoras de megacariócitos (CFU-Mk), sendo que para a identificação desta, é necessário teste específico (STEMCELL, 2010).

Apesar de ser método amplamente utilizado, é considerado tecnicamente difícil, principalmente em relação a interpretação dos resultados. Identificar as colônias após a proliferação e diferenciação não é simples. Exige muita experiência dos profissionais envolvidos. Com o intuito de aprimorar a técnica e padronizar a leitura das CFU, foi criado um equipamento que identifica e conta os diferentes tipos de colônias. Esse equipamento, STEMvision™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá), compara as colônias com as imagens de um banco de dados para identificar a qual grupo pertencem. O STEMvision™ propõe facilitar a realização do ensaio de formação de colônias, mas é um equipamento recente no mercado brasileiro e de custo elevado.

O ensaio de formação de colônias é um teste de potência e pode ser considerado o padrão ouro para determinar a capacidade clonogênica das CPH e relacioná-la com a enxertia após o transplante. Estudos mostram que o CFU está mais relacionado com o tempo de enxertia de plaquetas e neutrófilos, e consequente sobrevida do paciente, do que outros testes como o número total de células, células CD34+ e células nucleadas viáveis (LEE *et al.*, 2014; SHOULARS *et al.*, 2016).

Apesar de ser método e amplamente aplicado na comunidade médica e científica, o teste tem alguns pontos negativos, como a dificuldade de reprodutibilidade entre laboratórios. Como a contagem das colônias e a análise dos resultados baseiam-se na interpretação pessoal, é muito difícil estabelecer um padrão exato, mesmo com inúmeros treinamentos. Além disso, a técnica e o tempo para liberação do resultado podem ser considerados um problema. Por ser um ensaio de longa duração, pois as células ficam incubadas por 14 dias em ambiente úmido e a 37°C, é preciso muito cuidado com a contaminação bacteriana e fúngica.

Com a evolução dos transplantes e um número maior de pesquisas envolvendo CPH, cada vez mais novos equipamentos, métodos, testes e reagentes são descobertos e incluídos nas rotinas dos BSCUP. Neste sentido, o teste de detecção das enzimas aldeído desidrogenase (ALDH) começou a ser utilizado no controle de qualidade de unidades de CPH, ainda que a legislação brasileira não exija sua realização.

1.2.2 Enzimas Aldeído Desidrogenases

As ALDH são uma superfamília de 19 enzimas. Estão associadas a diferentes características e são encontradas em diferentes espécies de animais (BALBER, 2011; JACKSON *et al.*, 2011; MOREB, 2008). Seguem alguns exemplos:

- ALDH3A1 - Síndrome de Sjogren-Larson
- ALDH2 – Doença de Alzheimer
- ALDH2 – Doenças do coração
- ALDH7A1 – Epilepsia
- ALDH5A1 - Convulsões
- ALDH1B1 – Sensibilidade ao álcool
- ALDH18A1 - Catarata

As principais ALDH encontradas nas CPH são ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH1A2 e ALDH3A1 (BALBER, 2011; JACKSON *et al.*, 2011; MOREB, 2008).

As ALDH são um grupo de enzimas intracelulares que desenvolvem importantes funções no organismo. Participam do metabolismo dos aldeídos (oxidação de aldeídos em ácidos carboxílicos), prevenindo o acúmulo destes e evitando interferências na homeostase celular, nas funções gerais dos organismos e no metabolismo da Vitamina A e dos ácidos retinóicos (JONES *et al.*, 1995; MIRABELLI *et al.*, 2008).

Segundo Jackson *et al.* (2011), as ALDH auxiliam na modulação, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Outros estudos indicam ainda que as ALDH são expressas em níveis altos no citoplasma das CPH e estão associadas a resistências aos agentes alquilantes (MOREB, 2008; KASTAN *et al.*, 1990; CHRIST *et al.*, 2007; MIRABELLI *et al.* 2008; JONES *et al.*, 1995; STORMS *et al.*, 1999).

A determinação das ALDH em CPH pode ser realizada utilizando-se a técnica de citometria de fluxo em um curto espaço de tempo, cerca de 4 horas. *Kits* comerciais permitem a identificação, quantificação e isolamento de células progenitoras hematopoéticas baseados na presença das ALDH. (STORMS *et al.*, 2005; STEMCELL, 2009; STEMCELL, 2011).

As estratégias de análise dos resultados obtidos no citômetro são muitas e variam de acordo com o analisador. Apesar das possibilidades, existem critérios mínimos que são comuns em todos os estudos. Para ser considerada CPH, as células marcadas e adquiridas no citômetro precisam ter grande quantidade de enzimas aldeído desidrogenase, identificadas pela intensidade da fluorescência emitida (ALDH^{br}) e ter baixa granulosidade (SSC^{low}), ou

seja, ser pouco complexas (BALBER, 2011; STORMS *et al.*, 2005; PEARCE *et al.*, 2005; LIOZNOV *et al.*, 2005; GENTRY *et al.*, 2007).

2. HIPÓTESE

A identificação e quantificação de enzimas aldeído desidrogenase em células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário por meio da citometria de fluxo é um teste capaz de predizer a capacidade de enxertia e a sua aplicabilidade pode ser comparada ao ensaio de formação de colônias realizado com essas células.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a associação entre a capacidade proliferativa “*in vitro*” e os níveis de ALDH em células progenitoras hematopoéticas de sangue de cordão umbilical e placentário.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o número de CPH ALDH^{br} de sangue de cordão umbilical e placentário destinadas a terapia celular;
- correlacionar o número de CPH ALDH^{br} com a capacidade clonogênica dessas células, por meio do ensaio de formação de colônias;
- correlacionar a quantificação de células CD34+ com sua capacidade clonogênica, por meio do ensaio de formação de colônias, e com o número de CPH ALDH^{br};
- correlacionar o número de CPH ALDH^{br} com o TCN em cada unidade de SCUP;
- correlacionar a idade materna das doadoras de SCUP com a quantificação de células CD34+ na unidade;
- correlacionar a idade materna das doadoras de SCUP com o TCN da unidade;
- quantificar a o número de CPH ALDH^{br} nas células residuais (expurgo do processo de isolamento do creme leucocitário) após o processamento automatizado do SCUP;
- levantar os custos do ensaio de formação de colônias e da quantificação de células ALDH^{br} por meio de citometria de fluxo.

4. MÉTODO

4.1 DESENHO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de estudo observacional, analítico e prospectivo, realizado com unidades de sangue de cordão umbilical e placentário doados e coletados pela equipe de enfermagem do Centro de tecidos biológicos de Minas Gerais da Fundação Hemominas (Cetebio - Fundação Hemominas) na Maternidade Sofia Feldman durante o período de realização do estudo (2016-2017). Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Processamento de CPH do Banco de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio - Fundação Hemominas pela pesquisadora.

4.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS

Foram utilizadas 40 unidades de SCUP, retiradas das bolsas coletadas na maternidade Sofia Feldman, que passaram nos pré-requisitos mínimos estabelecidos pelo Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio - Fundação Hemominas.

As bolsas de SCUP coletadas e enviadas ao banco baseado em protocolos estabelecidos e validados foram verificadas quanto ao volume, celularidade e aspectos gerais, como cor, selagem e indícios de contaminação. As bolsas aprovadas na análise inicial foram encaminhadas para processamento e posterior criopreservação.

As amostras para o estudo foram retiradas em três momentos distintos: a primeira foi retirada do material recém-coletado, até 36 horas após a coleta; a segunda foi obtida do concentrado celular após o processamento da unidade, utilizando método automatizado, e a terceira, do expurgo, denominado ao longo do estudo de “lixo”, definido como material não criopreservado após o processamento da unidade, contendo plasma e hemácias, por método automatizado.

Todas as amostras foram identificadas com um número padrão ISBT 128 e foram armazenadas em condições ideais, de acordo com sua característica, até a realização do ensaio.

4.3 PROCESSAMENTO DO SCUP

As unidades de SCUP foram submetidas a processamento automatizado para redução do volume e separação das células de interesse (concentrado celular ou *buffy coat*). O processamento foi realizado no equipamento Sepax Cell Separation System (GE Healthcare Little Chalfont, United Kingdom) e o volume final do concentrado celular foi configurado para 20 mL.

Após o processamento foram retiradas duas amostras. Uma do concentrado celular, que são as células de interesse que foram criopreservadas e outra do “lixo”, definido anteriormente.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE (ALDH) EM UNIDADES DE SCUP

A quantificação da ALDH foi realizada por citometria de fluxo, no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson, New Jersey, United States), utilizando o *kit* ALDEFLUOR™ (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá).

O primeiro passo foi a ativação do Aldefluor. Inicialmente, o substrato Aldefluor foi dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO) e então exposto ao ácido clorídrico (HCl) para ser convertido em substrato fluorescente. O tubo com essa mistura foi incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado o tampão presente no *Kit* e divididas alíquotas de 15ul, em seguida armazenadas a -30°C.

Para o preparo celular, inicialmente foi realizada lise dos glóbulos vermelhos com a solução *Ammonium Chloride Lysing Solution* 10X a base de cloridrato de amônia (Becton Dickinson, San Jose, United States). Após a lise e lavagem com PBS, a concentração celular foi ajustada para 5×10^6 células/mL. Para cada teste, dois tubos de citometria foram identificados com o número da amostra, sendo um identificado como "Teste" e outro como "Controle".

O ensaio consiste na utilização de um substrato fluorescente e específico (Aminoacetoaldeído – BAAA), que penetra facilmente na membrana das células viáveis. Em contato com as enzimas aldeído desidrogenase, é modificado e permanece no interior das células devido à carga negativa que passa a carregar. Como a fluorescência do substrato fica retida no citoplasma das células viáveis, pode ser detectada por meio do laser verde (FL1) em

um citômetro de fluxo. A quantidade de fluorescência emitida é diretamente proporcional à atividade da enzima ALDH nas células.

Após incubação das células com o substrato a 37°C por período entre 30 e 60 minutos, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e realizada imunofenotipagem com anticorpos para identificação de CD38, CD34 e CD45.

As células foram incubadas por 15 minutos em gelo, centrifugadas, o sobrenadante descartado e então ressuspensas com o tampão do *kit*. A aquisição no citômetro foi feita imediatamente.

A aquisição foi padronizada (600.000 células na janela denominada R1 [FIGURA 5]) e a mesma estratégia foi utilizada para todas as amostras. Foram considerados nas aquisições os parâmetros de granulosidade (SSC), tamanho (FSC) e fluorescência emitida pelo Aldefluor e pelos marcadores mencionados acima.

O controle da reação foi realizado utilizando-se um inibidor da enzima aldeído desidrogenase denominado dimetilaminobenzoaldeído (DEAB). O controle negativo foi utilizado em todos os testes realizados. As análises foram feitas no Software FlowJo_V10.

A quantificação das enzimas aldeído desidrogenase foi realizada, na maioria das vezes, com as amostras coletadas nos três momentos: pós-coleta, pós-processamento e “lixo”.

Para as correlações foram utilizadas as amostras pós-processamento que foram analisadas em quatro grupos diferentes (TABELA 1):

Tabela 1: Nomenclatura utilizada para as análises das células ALDH^{br}

Nomenclatura utilizada	Correspondência
Total sem gate / nº de células	Número de células ALDH ^{br} totais na amostra.
Total sem gate / frequência	Frequência de células ALDH ^{br} totais na amostra
CD38 / nº de células	Número de células ALDH ^{br} CD45 ^{dim} CD38+CD34+ na amostra.
CD38 / frequência	Frequência das células ALDH ^{br} CD45 ^{dim} CD38+CD34+ na amostra.

4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico, ou ensaio de formação de colônias hematopoéticas foi realizado utilizando o meio semi-sólido Methocult[®] H4034 (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). O preparo da amostra foi realizado em cabine de fluxo laminar para evitar a contaminação da cultura. Após o preparo, as células foram plaqueadas na concentração de 2×10^4 células/poço, em placas de 6 poços, e incubadas por 14 dias em incubadora de CO₂, a 37°C e umidade maior ou igual a 95%. Para o ajuste da concentração inicial de $2,0 \times 10^5$

CN/mL, foi utilizado plasma após centrifugação proveniente da mesma amostra. Após incubação, as culturas foram identificadas e contadas. Foram observadas a formação de colônias vermelhas - colônias eritróides - BFU-E e CFU-E, colônias brancas - colônias granulocíticas e monocíticas - CFU-GM, e colônias mistas, de multi linhagens - CFU-GEMM.

A contagem e identificação das colônias foram realizadas no 14º dia de incubação. Os ensaios de formação de colônias foram realizados em duplicada com a amostra do concentrado celular obtido após o processamento da unidade de sangue de cordão umbilical e placentário.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34+ VIÁVEIS

A quantificação de células CD34+ viáveis foi realizada por meio de citometria de fluxo conforme o protocolo de plataforma única da *International Society for Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (GRATAMA *et al.*, 2003).

A amostra para o teste foi retirada do concentrado celular após o processamento automatizado e o resultado foi calculado considerando-se o volume do concentrado celular e expresso em números absolutos de células CD34+ x 10⁶.

4.7 INFORMAÇÕES DA DOAÇÃO E DO RECÉM-NASCIDO

As informações sobre a mãe doadora, a coleta e o recém-nascido foram retiradas dos Formulários de Triage Clínica e Formulário de Coleta de SCUP do Cetebio. Os formulários foram preenchidos pelos enfermeiros e enviados à pesquisadora, juntamente com a bolsa coletada e o TCLE assinado.

4.8 CONTAGEM DAS CÉLULAS NUCLEADAS

A contagem das células nucleadas foi realizada por meio de método automatizado pelo equipamento Sysmex XN-1000 (Roche, Basel, Switzerland). Este dado foi utilizado para o

cálculo do TCN da bolsa, que foi realizado multiplicando-se o valor do WBC, adicionado ao NRBC, pelo volume. O resultado foi expresso em células x 10^8 .

4.9 CÁLCULO DA RECUPERAÇÃO

O cálculo da recuperação da bolsa foi realizado dividindo-se a concentração celular final (TCN final) pela concentração celular inicial (TCN inicial). Através do valor encontrado (percentual) foi possível conhecer a quantidade de células nucleadas perdidas durante o procedimento.

4.10 LEVANTAMENTO DOS CUSTOS

O levantamento de custos dos procedimentos utilizados foi realizado pelo setor responsável da Fundação Hemominas por meio do método de custeio ABC, método baseado na atividade. Essa metodologia tem o objetivo de verificar os custos através de uma atividade e não dos produtos fabricados. Ao utilizar o método ABC foi possível incluir os custos indiretos no valor a ser cobrado (ABRANTES; MARIOTO, 2008).

Para realizar o levantamento, os procedimentos foram mapeados e todos os insumos, equipamentos e recursos humanos necessários para o desenvolvimento das atividades listados e analisados.

Foram realizados os levantamentos de custos para os testes de ensaio clonogênico e quantificação de enzimas ALDH por citometria de fluxo.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A hipótese de normalidade de distribuição das variáveis foi verificada pelo teste de Shapiro Wilk. As variáveis numéricas contínuas foram apresentadas em termos de mediana, 1º e 3º quartil, porque não apresentaram distribuição normal gaussiana.

Na verificação da suposição de correlação linear entre variáveis numéricas, aplicou-se o coeficiente de correlação de Spearman. O coeficiente de determinação foi obtido para melhor interpretar a medida de associação linear entre as variáveis testadas.

A magnitude do coeficiente (r) pode variar entre -1 (correlação perfeita negativa) e +1 (correlação perfeita positiva), passando pelo valor 0 (ausência de correlação). E pode ser classificada da seguinte forma: forte correlação se $r > 0,7$; correlação moderada se r está entre 0,4 e 0,7; e correlação fraca se $r < 0,4$ (SIQUEIRA, 2010).

Gráficos de dispersão foram obtidos para expressar a disposição dos dados entre os pares de variáveis analisadas.

As análises foram realizadas no software SPSS, versão 18. O nível de significância foi de 0,05, indicando significância estatística quando o p-valor era inferior a esse valor.

4.12 ASPECTOS ÉTICOS

A coleta de amostras foi realizada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico para essa pesquisa (apêndice D).

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Hemominas e aprovado em outubro de 2015 (CAAE: 48453315.0.0000.5118).

Os pesquisadores não possuem qualquer relação com nenhuma empresa citada no trabalho e não existem conflitos de interesse.

5. RESULTADOS

5.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas 40 amostras que receberam numeração sequencial, denominada de “Nome da Amostra”. Idade gestacional, em semanas e em dias, peso e sexo do recém-nascido (RN) foram registrados para caracterização das unidades (TABELA 2).

Tabela 2. Caracterização das amostras de SCUP quanto a idade gestacional, peso do RN, sexo do RN e idade materna

SCUP	Nome da amostra	Idade Gestacional	Idade gestacional em dias	Peso RN (gramas)	Sexo RN	Idade Materna em anos
B349216900138	1	39S 05D	278	2895	F	39
B349216900156	2	40S 04D	284	4075	F	29
B349216900172	3	41S 03D	290	3815	M	28
B349216900176	4	41S 0D	287	3960	F	22
B349216900188	5	41S 01D	288	3440	M	20
B349216900192	6	40S 01D	281	3950	M	19
B349216900194	7	41S 0D	287	3380	M	22
B349216900198	8	40S 03D	283	3390	F	17
B349216900208	9	35S 04D	249	2610	F	17
B349216900210	10	41S 0D	287	2810	M	18
B349216900213	11	39S 06D	279	4085	M	25
B349216900218	12	38S 05D	271	4420	M	23
B349216900220	13	41S 0D	287	3260	M	17
B349216900225	14	40S 03D	283	3360	F	29
B349216900227	15	40S 02D	282	4500	F	29
B349216900228	16	39S 0D	273	3395	M	24
B349216900231	17	38S 05D	271	3480	F	29
B439216900238	18	39S 06D	279	4000	M	38
B349216900239	19	39S 03D	276	3310	F	31
B349216900240	20	40S 0D	280	4100	F	42
B349216900245	21	41S 01D	288	3425	F	19
B349217100002	22	40S 01D	281	3775	M	19
B349217900005	23	40S 0D	280	3210	F	21
B349217900006	24	41S 01D	288	3800	F	32
B349217900007	25	39S	273	3440	M	28

continua

continuação

SCUP	Nome da amostra	Idade Gestacional	Idade gestacional em dias	Peso RN (gramas)	Sexo RN	Idade Materna em anos
B349217900008	26	41S01D	288	3455	F	31
B349217900009	27	39S05D	278	3755	M	19
B349217900018	28	41S01D	288	3920	F	29
B349217900025	29	38S 03D	269	3480	M	24
B349117900026	30	38S 5D	271	2940	M	36
B349217900028	31	40S 2D	282	2885	F	20
B349117900033	32	40S04D	284	3515	F	16
B349217900036	33	38S06D	272	3415	F	36
B439217000003	34	41S	287	3890	F	Não informado
B349217000005	35	41S01D	288	3770	M	Não informado
B349217000007	36	37S6D	265	3100	M	Não informado
B349217000015	37	40S6D	286	3860	M	30
B349217000016	38	40S01D	281	3050	F	Não informado
B349217000018	39	40S	280	3785	M	32
B349217000074	40	39S04D	277	2900	F	22

conclusão

A média da idade gestacional foi 280,03 dias (correspondente a 40 semanas), sendo a maior 288 dias (41 semanas e 1 dia) e menor 265 dias (37 semanas e 6 dias). O peso médio dos recém-nascidos foi 3540,13 gramas, sendo o mais pesado 4500 gramas e o mais leve 2810 gramas. Dos quarenta RN, 21 (52,5%) eram do sexo feminino e 19 (47,5%) do sexo masculino.

A média de idade das mães no momento do parto foi 25,88 anos. A mãe com idade mais elevada tinha 39 anos e a mais nova, 16 anos. As idades de 4 mães não foram informadas. Apesar do TCLE ter sido assinado, o campo permanecia em branco no Formulário de Triagem. Portanto, as idades destas quatro mães foram desconsideradas para não interferir na média.

5.2 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico identificou colônias CFU/BFU-E (eritrócitos), CFU-G/M (granulócitos, monócitos e macrófagos) e CFU-GEMM (eritrócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos) (FIGURAS 2, 3, 4).

Figura 2: Colônia CFU-GEMM. Aumento 4X

Fonte: Arquivo Cetebio

Figura 3: CFU/BFU – E. Aumento 4X

Fonte: Arquivo Cetebio

Figura 4: CFU – G/M. Aumento 4X

Fonte: Arquivo Cetebio

O teste foi realizado nas 40 amostras válidas. Três foram desconsiderados devido a contaminação microbiológica e 1 foi desconsiderado devido ao número excessivo de colônias

na placa. A grande quantidade de colônias impossibilitou contagem precisa de colônias. Acredita-se que ocorreu algum erro durante a diluição das amostras e o preparo do teste.

O resultado foi calculado multiplicando-se o número total de colônias (CFU/BFU-E + CFU-G/M + CFU-GEMM) por 100.000 (número de células plaqueadas) e dividindo-se pela concentração final desejada (2×10^4). Multiplicou-se o resultado pela concentração final da bolsa (TCN da unidade). Esse valor representa o número total de unidades formadoras de colônias presentes no SCUP processado e criopreservado.

Os resultados de cada amostra encontram-se nos apêndices.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ALDH^{br}

A quantificação de células ALDH^{br} foi realizada em 39 unidades de SCUP. No entanto, o resultado das duas primeiras unidades não foi considerado porque o teste e a lise das hemácias ainda não estava padronizado.

As figuras 5 e 6 mostram o controle negativo, que identificou 98% das células não marcadas nas amostras controle.

Figura 5: ALDH – SCUP - A e B

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das janelas (ou do inglês *gating*). Em **A**, os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade. Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do Aldefluor e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra às células ALDH^{br}.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

Figura 6: Controle negativo ALDH – SCUP

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das *gates*. Em **A**, os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade.

Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do Aldefluor e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra onde deveriam estar as células ALDH^{br}, indicando a eficácia do controle negativo.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

Nas figuras 7, 8, 9 e 10 é possível verificar a estratégia de análise por meio da imagem dos gráficos.

A quantificação de células ALDH^{br} do “lixo” não foi realizada em 13 das 39 amostras por diversos motivos: volume insuficiente de material, celularidade muito baixa da amostra do lixo, celularidade inicial baixa da bolsa ou devido ao custo do teste. Após alguns testes, os pesquisadores concluíram que a presença de células aldeído desidrogenase no lixo era mais frequente em amostras com celularidade inicial alta. A partir deste momento, optou-se por realizar o teste na amostra do lixo somente destas unidades.

As figuras 7, 8, 9 e 10 mostram exatamente a diferença relatada. A figura 7 mostra a análise da amostra pós-processamento do SCUP B349216900198, que tinha o TNC igual a 30,71. Já a figura 8 mostra a análise do lixo do mesmo SCUP. A celularidade inicial do SCUP era muito alta, o que pode justificar a presença de células ALDH^{br} na amostra lixo. O mesmo não acontece com as amostras do SCUP B349216900218. A figura 9 representa a análise da amostra pós-processamento enquanto a figura 10 a amostra do lixo. O TNC deste cordão era 7,83.

Figura 7: Estratégia de análise - Amostra 198 – Pós-processamento

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das *gates*. Em **A** os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade. Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do Aldefluor e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra onde estavam as células ALDH^{br}. Em **C** os eixos apresentam a marcação das células CD45 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD45^{dim}. Em **D** os eixos apresentam a marcação das células CD38 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD38+. Em **E** os eixos apresentam a marcação das células CD34 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD34+. O gráfico **F** mostra as células ALDH^{br}, CD45^{dim}, CD38+, CD34+.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

Figura 8: Estratégia de análise - Amostra 198 – “Lixo”

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das *gates*. Em **A** os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade. Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do Aldefluor e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra onde estavam as células ALDH^{br}. Em **C** os eixos apresentam a marcação das células CD45 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD45^{dim}. Em **D** os eixos apresentam a marcação das células CD38 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD38+. Em **E** os eixos apresentam a marcação das células CD34 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD34+. O gráfico **F** mostra as células ALDH^{br}, CD45^{dim}, CD38+, CD34+.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

Figura 9: Estratégia de análise - Amostra 218 – Pós-processamento

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das *gates*. Em **A** os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade. Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do AldefluorTM e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra onde estavam as células ALDH^{br}. Em **C** os eixos apresentam a marcação das células CD45 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD45^{dim}. Em **D** os eixos apresentam a marcação das células CD38 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD38+. Em **E** os eixos apresentam a marcação das células CD34 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD34+. O gráfico **F** mostra as células ALDH^{br}, CD45^{dim}, CD38+, CD34+.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

Figura 10: Estratégia de análise - Amostra 218 – “Lixo”

Os gráficos mostram a estratégia de marcação das *gates*. Em **A** os eixos apresentam o parâmetro FSC na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta mostra a janela feita para isolar as células com menor granulosidade. Em **B**, o eixo das abscissas mostra a marcação do AldefluorTM e das ordenadas o parâmetro SSC. A linha preta mostra onde estavam as células ALDH^{br}. Em **C** os eixos apresentam a marcação das células CD45 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD45^{dim}. Em **D** os eixos apresentam a marcação das células CD38 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD38+. Em **E** os eixos apresentam a marcação das células CD34 na abscissa e SSC na ordenada. A linha preta separa as células CD34+. O gráfico **F** mostra as células ALDH^{br}, CD45^{dim}, CD38+, CD34+.

Fonte: Representação gráfica gerada pelo Software FlowJo

O resultado da quantificação de células ALDH^{br} de cada amostra, incluindo a imunofenotipagem, está expresso em tabelas localizadas nos apêndices da dissertação.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD34+

Do total de 40 amostras válidas, o teste foi realizado em 38 (trinta e oito) unidades e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação de células CD34+ viáveis

SCUP	Nome da amostra	CD34+ x 10 ⁶
B349216900138	1	2,54
B349216900156	2	4,89
B349216900172	3	2,72
B349216900176	4	2,60
B349216900188	5	0,71
B349216900192	6	Não realizado
B349216900194	7	2,86
B349216900198	8	20,43
B349216900208	9	2,29
B349216900210	10	3,09
B349216900213	11	3,83
B349216900218	12	2,01
B349216900220	13	1,33
B349216900225	14	0,55
B349216900227	15	3,19
B349216900228	16	15,65
B349216900231	17	2,96
B439216900238	18	Não realizado
B349216900239	19	4,83
B349216900240	20	5,83
B349216900245	21	2,17
B349217100002	22	2,11
B349217900005	23	2,34
B349217900006	24	1,87
B349217900007	25	1,21
B349217900008	26	2,26
B349217900009	27	1,61
B349217900018	28	2,03
B349217900025	29	1,35
B349117900026	30	3,24
B349217900028	31	1,21
B349117900033	32	5,83
B349217900036	33	1,01
B439217000003	34	2,68
B349217000005	35	2,08
B349217000007	36	0,91
B349217000015	37	6,11
B349217000016	38	0,59
B349217000018	39	1,89
B349217000074	40	0,86

A maior dose de CD34+ viável encontrada foi 20,43 células CD34+ x 10⁶ e a menor 0,55 células CD34+ x 10⁶.

5.5 ANÁLISE DESCRITIVA DA QUANTIFICAÇÃO DE CFU, NÚMERO DE CÉLULAS ALDH^{br} NAS DIFERENTES FRAÇÕES CELULARES E CÉLULAS CD34+ E TCN

Neste aspecto foram avaliadas 39 unidades. O número mediano de CFU total das amostras foi de 1.364.175 com primeiro e terceiro quartis iguais a 1.052.675 e 2.232.000 respectivamente. As demais variáveis e os seus respectivos valores medianos, primeiro e terceiro quartil também se encontram na Tabela 4.

Tabela 4: Número mediano de CFU, ALDH^{br}, CD34+ e TCN

Variáveis	(n=39)
Número CFU total de bolsa	1.364.175 (1.052.675-2.232.000)
ALDH ^{br} (amostra final CD38+/CD45 ^{dim} /CD34+ - n° células)	872(468-1.234)
ALDH ^{br} (amostra final sem <i>gate</i> - n° células)	1.790(1.073-2.664,5)
ALDH ^{br} (amostra final CD38+/CD45 ^{dim} /CD34+ - frequência)	26,7(14,80-42,85)
ALDH ^{br} (amostra final sem <i>gate</i> – frequência)	0,14(0,069-0,225)
TCN	10.660(8.220-14.880)
CD34+	2,29(1,48-3,22)

Mediana (1º Quartil - 3º Quartil).

5.5.1 Quantificação de células ALDH^{br} no TCN e da subpopulação ALDH^{br} CD38+CD45^{dim}CD34+ na população ALDH^{br}

Na Tabela 5, encontram-se os dados da Porcentagem do número de Células ALDH CD45^{dim}CD38+CD34+ no Número de Células ALDH Amostra total sem *gate* (Porcentagem 1) e a Porcentagem do Número de Células ALDH Amostra total sem *gate* no TCN da unidade (Porcentagem 2).

Tabela 5: Valores descritivos das Porcentagens1 (ALDH CD38+CD45^{dim}CD34+ em ALDH^{br}) e 2 (ALDH^{br} em TCN)

Variáveis	Descritiva(n=37)
Porcentagem 1	46,25(±21,03)
Porcentagem 2	13,97x10 ⁻³ (±9,86x10 ⁻³)

Média(±desvio padrão)

Nas Figuras 11 e 12 é possível verificar a distribuição das porcentagens 1 e 2 respectivamente:

Figura 11: Distribuição das células $ALDH^{br} CD45^{dim} CD38+CD34+$ no Número de Células $ALDH^{br}$

Fonte: Paula Passos

Figura 12: Distribuição do Número de Células $ALDH^{br}$ no TCN da unidade

Fonte: Paula Passos

5.6 ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES

5.6.1 Correlação entre o número de CFU e a quantidade de células ALDH^{br} nas diferentes subpopulações

A Tabela 6 apresenta os valores do coeficiente de correlação de Spearman entre o número de CFU total de bolsa e os diferentes grupos de ALDH. Como o p-valor foi inferior a 0,05 para CD38/nº células, Sem *gate*/nº células e Sem *gate*/frequência, pode-se concluir que houve correlação significativa positiva moderada para cada uma dessas classes do ALDH, quando comparadas com o número de CFU total bolsa. O percentual de variação explicada por cada uma dessas variáveis ALDH em relação ao número de CFU total bolsa foi de 19,7%, 34,3% e 27,6% respectivamente. As Figuras 13 a 16 ilustram a correlação desses pares de variáveis mencionados.

Nas tabelas e figuras o termo CD45^{dim}CD38+CD34+ foi substituído para CD38 para ficar visualmente mais claro.

Tabela 6: Análise de Correlação de Spearman CFU e ALDH.

Nº CFU total bolsa	ALDH amostra final (n=33)			
	CD38/ nº células	Total sem <i>gate</i> / nº células	CD38/ frequência	Total sem <i>gate</i> / frequência
Correlação (r)	0,444	0,586	0,077	0,525
Determinação(r²)	0,197	0,343	0,006	0,276
p-valor	0,010*	<0,001*	0,669	0,002*

*p-valor<0,05

Figura 13: Correlação entre os valores de ALDH CD38/nº células e Número CFU total bolsa.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 14: Correlação entre os valores de ALDH sem *gate*/nº células e Número CFU total bolsa.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 15: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/frequências e Número CFU total bolsa.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 16: Correlação entre os valores de ALDH sem *gate*/frequências e Número CFU total bolsa.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

5.6.2 Correlação entre a quantidade de células ALDH^{br} nas diferentes subpopulações e o TCN

A Tabela 7 apresenta os valores do coeficiente de correlação de Spearman entre o TCN e os diferentes grupos de ALDH. Como o p-valor foi inferior a 0,05 para CD45^{dim}CD38+CD34+/nº células, Total sem *gate*/nº células e Total sem *gate*/frequência, pode-se concluir que houve correlação significativa positiva fraca para cada uma dessas classes do ALDH, quando comparadas com o TCN. O percentual de variação explicada por cada uma dessas variáveis ALDH em relação ao número de TCN foi de 13,8%, 11,2% e 11,6% respectivamente. As figuras 17 a 20 esboçam a correlação desses pares de variáveis mencionados.

Nas tabelas e gráficos o termo CD45^{dim}CD38+CD34+ foi substituído para CD38 para ficar visualmente mais claro.

Tabela 7: Análise de Correlação de Spearman TCN e ALDH.

TCN	ALDH amostra final (n=37)			
	CD38/ nº células	Total sem <i>gate</i> / nº células	CD38/ frequência	Total sem <i>gate</i> / frequência
Correlação (r)	0,371	0,335	0,032	0,340
Determinação (r²)	0,138	0,112	0,001	0,116
p-valor	0,024*	0,043*	0,853	0,040*

Figura 17: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/nº células e TCN.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa fraca entre as variáveis
 Fonte: Paula Passos

Figura 18: Correlação entre os valores de ALDH sem *gate*/nº células e TCN.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa fraca entre as variáveis
 Fonte: Paula Passos

Figura 19: Correlação entre os valores de ALDH CD38+/frequência e TCN.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 20: Correlação entre os valores de ALDH sem *gate*/frequência e TCN.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa fraca entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

5.6.3 Correlação entre a quantidade de células CD34+, a quantificação de células ALDH^{br} nas diferentes subpopulações, o número de CFU e o TCN

A Tabela 8 apresenta os valores do coeficiente de correlação de Spearman entre os valores do número de células CD34+ e o número de CFU, TCN e os diferentes grupos de ALDH. O p-valor foi inferior a 0,05 para CD45^{dim}CD38+CD34+/nº células, Total sem *gate*/nº células, Total sem *gate*/frequência, CFU e TCN. Então, pode-se concluir que houve correlação significativa positiva fraca entre CD34 e ALDH CD45^{dim}CD38+CD34+/nº células; moderada entre CD34 e Total sem *gate*/nº células, Total sem *gate*/frequência e TCN; e correlação forte com CFU. O percentual de variação explicada em relação ao número de CD34 com CD45^{dim}CD38+CD34+ /nº células, Total sem *gate*/nº células, Total sem *gate*/frequência, CFU e TCN foi de 11,2%, 30%, 31,4%, 60,9% e 37,5%, respectivamente. Os gráficos 21 a 26 esboçam a correlação desses pares de variáveis analisados.

Nas tabelas e gráficos o termo CD45^{dim}CD38+CD34+ foi substituído para CD38 para ficar visualmente mais claro.

Tabela 8: Análise de Correlação de Spearman CD34+, ALDH, CFU e TCN

CD34+	ALDH amostra final (n=35)					
	CD38/ nº células	Total sem <i>gate</i> / nº células	CD38/ frequência	Total sem <i>gate</i> / Frequência	CFU (n=33)	TCN (n=37)
Correlação (r)	0,335	0,548	0,142	0,560	0,780	0,612
Determinação (r²)	0,112	0,300	0,020	0,314	0,609	0,375
p-valor	0,049*	0,001*	0,416	<0,001*	<0,001*	<0,001*

Figura 21: Correlação entre os valores de células CD34+ e número de CFU total bolsa.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa forte entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 22: Correlação entre os valores de células CD34+ e TCN.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 23: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH CD38+/nº células.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa fraca entre as variáveis
 Fonte: Paula Passos

Figura 24: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH Total sem *gate*/nº células.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis
 Fonte: Paula Passos

Figura 25: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH CD38+/frequência.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 26: Correlação entre os valores de células CD34+ e ALDH sem *gate*/frequência.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Detectou-se uma correlação significativa moderada entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

5.6.4 Correlação entre a Idade Materna, a quantificação de células CD34++, o TCN pré-processamento e a recuperação

A Tabela 9 apresenta os valores do coeficiente de correlação de Spearman entre os valores de idade materna e os valores de CD34+ e TCN, e os valores de TCN unidade pré-processamento com Recuperação. O p-valor foi superior a 0,05 para todos esses pares comparados. Então, pode-se concluir que não houve correlação significativa entre esses pares. Os gráficos 27 a 29 esboçam a dispersão desses pares de variáveis analisados.

Tabela 9: Análise de Correlação de Spearman da Idade materna com TCN e CD34+; e do TCN unidade pré-processamento com a recuperação.

	Idade materna		TCN Unidade pré-processamento
	CD34 (n=36)	TCN (n=34)	Recuperação (n=39)
Correlação (r)	0,078	-0,130	-0,031
Determinação (r^2)	0,006	0,017	0,001
p-valor	0,660	0,449	0,850

Figura 27: Correlação entre os valores de células CD34+ e Idade materna.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 28: Correlação entre os valores do TCN e a Idade materna.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

Figura 29: Correlação entre os valores do TCN pré-processamento e a Recuperação.

Os pontos representam os valores obtidos para cada amostra e a reta representa a linha de tendência da correlação. Não foi encontrada correlação entre as variáveis

Fonte: Paula Passos

5.7 LEVANTAMENTO DE CUSTOS

5.7.1 Ensaio Clonogênico – CFU

A figura 30 mostra o resumo da análise do custo de um teste de ensaio clonogênico. No apêndice C é possível ver a planilha completa. O valor total de um teste foi de R\$679,40.

Figura 30: Resumo do levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico

QUADRO RESUMO DO LEVANTAMENTO DE CUSTOS	
DESCRIÇÃO	VALOR APURADO
RECURSOS HUMANOS	R\$ 55,50
EQUIPAMENTOS - DEPRECIAÇÃO	R\$ 20,77
MATERIAIS	R\$ 286,17
OUTROS GASTOS	R\$ 102,91
RATEIO DE CUSTOS ADMINISTRATIVOS HEMOMINAS - Aprox. 32% do valor total do exame (cálculo com base nos custos da HEMOMINAS de 2017)	R\$ 214,06
CUSTO TOTAL APURADO	R\$ 679,40

Fonte: Fundação Hemominas

5.7.2 ALDH

A figura 31 retrata o resumo da análise do custo de quantificação de células ALDH^{br}. No apêndice C é possível ver a planilha completa. O valor total de um teste foi de R\$610,58.

Figura 31: Resumo do levantamento de Custos – Teste para quantificação de células ALDH^{br}

QUADRO RESUMO DO LEVANTAMENTO DE CUSTOS	
DESCRIÇÃO	VALOR APURADO
RECURSOS HUMANOS	R\$ 162,08
EQUIPAMENTOS - DEPRECIAÇÃO	R\$ 5,96
MATERIAIS	R\$ 162,70
OUTROS GASTOS	R\$ 87,47
RATEIO DE CUSTOS ADMINISTRATIVOS DA HEMOMINAS - Aprox. 32% do valor total do exame (cálculo com base nos custos da HEMOMINAS de 2017)	R\$ 192,37
CUSTO TOTAL APURADO	R\$ 610,58

Fonte: Fundação Hemominas

6. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi relacionar o número de células ALDH^{br} com a capacidade proliferativa das células progenitoras hematopoéticas originadas de sangue de cordão umbilical e placentário.

Na descrição das amostras, a média da idade gestacional de 280,03 dias ou 40 semanas retrata o perfil da Maternidade Sofia Feldman, que prioriza o parto normal e é referência para o parto humanizado em todo o Estado de Minas Gerais. O sexo e o peso do RN foram importantes para a caracterização das amostras e a idade materna foi relacionada ao TCN da bolsa e a quantificação de células CD34+.

6.1 CORRELAÇÕES PARA AVALIAR SE A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ALDH^{br} PODE SER CONSIDERADO UM TESTE DE POTÊNCIA

Várias correlações foram feitas com objetivo de testar se a quantificação de células ALDH^{br} pode ser considerada teste de potência.

A quantificação de células ALDH^{br} foi apresentada em dois seguimentos: um considerando o total de células ALDH^{br} na amostra total e o outro considerando o total de células ALDH^{br} na subpopulação CD45^{dim}CD38+CD34+. Além disso, foram apresentadas em dois formatos: número total de células e frequência. Para a discussão, os pesquisadores optaram por focar nos resultados obtidos da quantificação de células ALDH^{br} totais, não considerando a subpopulação CD45^{dim}CD38+CD34+. A justificativa se baseia na falta de padronização das estratégias de imunofenotipagem pela comunidade científica e que poderá ser melhor compreendida no item 6.2. É importante ressaltar que os resultados obtidos da subpopulação são importantes e poderão servir como aprendizado para novos estudos.

Há anos o ensaio clonogênico (CFU) e a quantificação de células CD34+ são usados para avaliar as unidades a ser transplantadas. Resultados satisfatórios de enxertia são evidências da qualidade satisfatória desses testes (MORETTI *et al.*, 2002; SHOULARS *et al.*, 2016); LEE *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2015).

Os resultados mostram uma correlação significativa entre a quantificação de células ALDH^{br} totais e o ensaio clonogênico tanto para a frequência como para o número total de células ($p=0,002$ e $p<0,001$ respectivamente).

Os estudos apresentados por Lioznov e colaboradores (2005) mostraram correlação forte entre o ensaio clonogênico e a quantificação de células ALDH^{br}. Resultado semelhante

ao apresentado nesta pesquisa também foi mostrado por Lee *et al.* (2014) que realizaram um estudo com 245 unidades de SCUP para confirmar a correlação ($p < 0,001$). Já Shoulars *et al.* (2016) padronizaram o teste de potência baseado na quantificação de células ALDH^{br}. Para isso, utilizaram 3908 segmentos de cordão e concluíram que o teste de ALDH foi o que teve maior correlação com o ensaio clonogênico ($p < 0,001$; $r = 0,78$), considerado padrão ouro.

Ao comparar a quantificação de células ALDH^{br} com a quantificação de células CD34+, a correlação encontrada foi significativa ($p < 0,001$ para frequência e $p = 0,001$ para número de células). O mesmo foi mostrado por Veeraputhiran *et al.* (2011), que realizaram testes com 108 amostras e encontraram o valor de $p < 0,001$, e de Lioznov *et al.* (2005), que também acharam correlação significativa. Os mesmos pesquisadores não encontraram correlação boa entre o ensaio clonogênico e o CD34+. Esse resultado foi inesperado, mas também foi reportado por Shoulars e colaboradores (2016) que encontraram uma correlação fraca ($r = 0,25$) entre os testes.

A correlação entre a quantificação de células CD34+ e o ensaio clonogênico foi confirmada por Radke *et al.* (2013), Salge-Bartels *et al.* (2009) e Moretti *et al.* (2002). Este último realizou a quantificação de células CD34+ com três métodos distintos e confirmou a correlação forte com o ensaio clonogênico. A correlação encontrada neste estudo também foi forte ($p < 0,001$).

Lioznov e colaboradores (2005) descreveram que a quantificação de células ALDH^{br} é um excelente teste para confirmar a qualidade das CPH e a considera melhor que a quantificação de células CD34+, principalmente para amostras que sofreram algum tipo de estresse como transportes longos e criopreservação, ou seja, situações que ocorrem com todas as unidades de SCUP. Hess *et al.* (2004) também defendem a importância de associar outros testes para quantificação de células CD34+. Segundo eles, nem todas as células CD34+ possuem capacidade proliferativa e por isso há necessidade de teste complementar ou de se utilizar teste alternativo, como a quantificação de células ALDH^{br}.

Outros parâmetros relevantes foram descritos. É o caso de Balber (2011), que cita estudos que indicam a relação das células ALDH^{br} com a rapidez na enxertia e a manutenção em transplantes de CPH. Gentry, *et al.* (2007) mostraram que a presença de células ALDH^{br} permanece mesmo após a criopreservação e o descongelamento. Shoulars *et al.* (2016) verificaram a correlação entre o ALDH pré e pós-congelamento. Apesar de não ser objetivo desse estudo, o resultado encontrado por eles é de grande valia para os BSCUP. Existe a correlação entre a bolsa pré-congelamento e o seguimento pós-congelamento. No entanto, os segmentos tendem a subestimar a quantidade de ALDH na bolsa pós-congelamento. Essa

informação é de conhecimento dos BSCUP e se repete para os demais testes, como CFU e CD34+. Resultados satisfatórios em um segmento significam resultados satisfatórios na bolsa. No entanto, não se pode afirmar que resultados ruins nos segmentos representam que a bolsa não esteja apta para transplante.

Não foi possível avaliar a correlação da quantificação de células ALDH^{br} com a velocidade de enxertia devido ao número de cordões liberados para transplante. Uma estratégia seria realizar um novo estudo utilizando CPH de sangue periférico para transplante autólogo e/ou alogênico.

6.2 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS ALDH^{br}

O parâmetro mais comumente usado na rotina e citado na literatura para a caracterização das CPH é a quantificação de células CD34+. Unidades com células ALDH^{br} e CD34+ possuem características proliferativas e consequentemente são capazes de repopular a medula óssea dos pacientes. A presença de células ALDH^{br} e CD34+ podem ser utilizadas para determinar o estágio de hematopoese das células. Os marcadores permanecem durante a diferenciação da série mielóide enquanto a presença de ALDH diminui na diferenciação da série linfóide (STORMS *et al.*, 2005).

Estudos mostram que a maior parte de células ALDH^{br} são CD34+. No entanto existe uma pequena parcela que é CD34- (PEARCE & BONNET, 2007; LIOZNOV *et al.*, 2005; HESS *et al.*, 2004), subpopulação que não foi identificada neste estudo.

Outro antígeno estudado foi o CD38, que está relacionado com a diferenciação celular, e é expresso em vários tipos celulares. Pearce *et al.* (2005) encontraram diferença estatística entre as células CD38+ e CD38-. Células mais primitivas CD34+ e CD38- apresentaram maior concentração de ALDH, se comparada a células CD34+ e CD38+. CHRIST *et al.* (2007) também encontraram resultado semelhante: a presença de células ALDH^{br} foi aproximadamente 2 vezes maior em células CD34+ e CD38- do que em células CD34+ e CD38+.

Esse é um ponto que merece novos estudos e análises. Durante a execução da pesquisa, acreditava-se que a maior parte das células ALDH^{br} realmente seria CD34+/CD38-, mas não foi o encontrado. Devido aos resultados apresentados, foi necessário alterar a estratégia de análise e trabalhar com a população CD38+.

Apesar de afirmarem que as células ALDH^{br} estão mais presentes na população CD34+CD38-, os pesquisadores Christ *et al.* (2007) também não conseguiram definir

estratégia de imunofenotipagem para as células ALDH. Concluíram que sua presença em unidades de CPH de SCUP era indiscutível. Porém não era possível correlacionar com uma fenotipagem. Outros autores também mostraram a diversidade de marcadores. É o caso de HORDYJEWSKA, POPIOLEK & HORECKA (2015), que utilizaram além do CD34 e do CD38 os antígenos CD90, CD117, CD135, CD95, CD71, CD45RO, CD45RB, CD45RA, AC133, entre outros, sendo que cada um possui uma função específica na célula.

Não foi encontrado qualquer artigo com a mesma estratégia de imunofenotipagem utilizada na pesquisa. Entretanto, isso é considerado normal com a diversidade encontrada nos artigos. Os pesquisadores optaram por utilizar anticorpos para os antígenos considerados por eles mais utilizados e ao longo da pesquisa foram definindo as estratégias de análise. Entre as análises realizadas, a associação entre $CD45^{dim}CD38+CD34+$ foi a que apresentou maior quantidade de células $ALDH^{br}$ e por isso foi utilizada até o final da pesquisa.

As análises estatísticas mostraram que 46,25% das células $ALDH^{br}$ eram $CD45^{dim}CD38+CD34+$. O restante das células apresentou outras características e novos estudos merecem ser realizados para identificar as características imunofenotípicas do maior número de células $ALDH^{br}$ possíveis. HESS *et al.* (2004), por exemplo, encontraram frequência média de 25,5% células $CD34+CD38-$ nas células $ALDH^{br}$, enquanto a frequência média para células somente $CD34+$ subia para 91,0%.

Vale ressaltar que além da imunofenotipagem escolhida, os pesquisadores trabalharam com os dados levando em consideração também o número total de células $ALDH^{br}$.

6.3 FREQUENCIA DAS CÉLULAS $ALDH^{br}$ NAS UNIDADES DE SCUP

A frequência média de células $ALDH^{br}$ encontradas neste estudo foi $13,97 \times 10^{-3}$ ($\pm 9,86 \times 10^{-3}$). Resultado muito baixo se comparado com as frequências encontradas na literatura (TABELA 10). Acredita-se que existe alguma divergência entre os parâmetros utilizados. Dois destes estudos informaram que a frequência de células $ALDH^{br}$ era em relação ao TCN, porém os outros só informaram que era em relação a amostra total. Novas análises serão necessárias para compreender a diferença.

Tabela 10: Frequência de células ALDH^{br} em outros estudos

Autor	Fonte de CPH	Frequência de células ALDH ^{br} (média $\pm$ desvio padrão)
Storms <i>et al.</i> (2008)	SCUP	0,96% $\pm$ 0,5%
Pearce <i>et al.</i> (2005)	SCUP	0,82% $\pm$ 0,39%
Lioznov <i>et al.</i> (2005)	MO e SP após descongelamento	0,16%
Lee <i>et al.</i> (2014)	SCUP	0,16% $\pm$ 0,10%
Gentry <i>et al.</i> (2007)	MO	1,17% $\pm$ 0,77%

6.4 CORRELAÇÃO ENTRE A IDADE MATERNA, O TCN DA UNIDADE E A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS CD34+

Ao contrário do descrito por BIELEC-BEREK *et al.* (2017), nos resultados encontrados não foi possível correlacionar a idade materna e o TCN da amostra ($p=0,449$). BIELEC-BEREK *et al.* (2017) realizaram estudo com 50 participantes em que os resultados apresentaram relação entre a idade materna e o WBC da amostra. A maior média de WBC foi encontrada em mulheres com idade superior a 35 anos, contrariando as expectativas dos autores, uma vez que as referências utilizadas por eles mostravam o contrário. Apesar de os estudos utilizarem parâmetros diferentes, o desta pesquisa utilizou TCN e os autores utilizaram WBC. É possível discuti-los, pois, o valor de TCN é totalmente dependente do valor do WBC.

Os dois estudos não encontraram relação entre a idade materna e o CD34+ ($p=0,660$). BIELEC-BEREK *et al.* (2017) concluíram ainda que o WBC é maior em unidades coletadas de parto normal a unidades coletadas através de cesariana. Essa comparação não foi realizada neste estudo, pois 100% das unidades foram coletadas de parto normal.

6.5 CORRELAÇÃO ENTRE O TCN PRÉ-PROCESSAMENTO E A RECUPERAÇÃO

Apesar de não ser foco deste trabalho, essa relação foi estudada com objetivo de avaliar o método de processamento automatizado utilizado pelo BSCUP do Cetebio / Fundação Hemominas e tentar estabelecer um TCN pré-processamento máximo. Naing *et al.* (2015) afirmam que quanto maior o TNC, menor será a taxa de recuperação. Porém, essa correlação não foi encontrada ($p=0,850$).

Isto pode ser devido a quantidade de amostras utilizadas no estudo e a metodologia utilizada. A recuperação é calculada dividindo-se o TCN pós-processamento pelo TCN pré-

processamento, e multiplicando-se por 100 para obter o resultado em porcentagem. O valor do TCN, principalmente do pós-processamento, é totalmente dependente da homogeneização realizada pelo profissional e uma má homogeneização pode alterar completamente os resultados.

As informações fornecidas por Naing *et al.* (2015) são confirmadas pelo fornecedor do equipamento automatizado (GE Healthcare Little Chalfont, United Kingdom) e devido a isso, esse é um ponto que merece atenção e novos estudos. Estabelecer celularidade inicial máxima é de extrema importância para se aproveitar ao máximo o SCUP coletado e conseguir criopreservar o maior número de células possível pensando na qualidade do produto final e no bem dos possíveis receptores.

6.6 COMPARAÇÃO DO VALOR DOS TESTES

Segundo os cálculos realizados por Setor de Custos da Fundação Hemominas, o valor do teste do ensaio clonogênico é R\$679,40 e da quantificação de células ALDH^{br}, R\$610,58. Apesar de os valores serem muito próximos, é importante pensar no total gasto por mês e por ano. Levando em consideração que o foco desse estudo são os BSCUP públicos do país, qualquer economia, desde que se mantenha a qualidade, é válida.

Os outros resultados já comprovaram a eficácia da quantificação de ALDH para verificar a potência das células (HESS *et al.*, 2009; LIOZNOV *et al.*, 2005; SHOULARS *et al.*, 2016). O estudo financeiro foi importante para verificar a viabilidade da introdução do teste nos bancos públicos do país.

A legislação brasileira, RDC 56 de 16 de dezembro de 2016, exige a realização do ensaio clonogênico ou de teste funcional equivalente. A quantificação do ALDH^{br} pode ser considerada teste funcional e ainda a custo inferior.

7. CONCLUSÕES

- O teste de quantificação de células ALDH é um teste rápido e fácil de ser executado, altamente reprodutível e que pode ser facilmente inserido na rotina dos Bancos de Cordão Umbilical e Placentário do país.
- O custo para realização do ensaio clonogênico e da quantificação de células ALDH^{br} é bem próximo, mas se for considerado o tempo de execução, o AldefluorTM tem enorme vantagem. O resultado no teste é obtido em até 4 horas enquanto o ensaio clonogênico demora 14 dias.
- O teste para quantificação de células ALDH^{br} pode ser considerado teste de potência.
- Sabe-se que a utilização de unidades de SCUP para transplantes de CPH é cada vez menor. Existem outras fontes de CPH e com o aumento do transplante haploidêntico este número diminuiu ainda mais. Utilizar testes que comprovam a qualidade do SCUP e que ajudam a escolher SCUP com maior capacidade de enxertia é fundamental para esse tipo de transplante continuar existindo e justificar o investimento financeiro realizado.

REFERÊNCIAS

AABB. **Technical Manual**. 18th Edition. 2014.

ABTO. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes Janeiro / Dezembro de 2016**. São Paulo. 2017.

ABRANTES, F. M. G; MARIOTO, S. L. Método de Custeio Baseado na Atividade – ABC. **Revista de Ciências Gerenciais**. V. XII, n. 16, 2008.

BALBER, A. E. Concise Review: Aldehyde Dehydrogenase Bright Stem and Progenitor Cell Population from Normal Tissues: Characteristics, Activities, and Emerging Uses in Regenerative Medicine. **Stem Cells**, v. 29, p. 570-575, 2011.

BIELEC-BEREK, B. *et al.* Maternal predictors and quality of umbilical cord blood units. **Cell Tissue Bank**, 2017.

BORDIN, J. O.; LANGHI, J. D. M. COVAS, D. T. **HEMOTERAPIA Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu. 2007.

BOUZAS, L. F. S. Transplante de Medula Óssea em Pediatria e Transplante de Cordão Umbilical. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 33, p. 241-263, 2000.

BRASIL. Portaria Ministerial N 2600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o regulamento técnico do Sistema Nacional de Transplantes. 2009

BRASIL. RDC N 56, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cartilha do Servidor. Brasília, 2009. Disponível em: >http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cartilha_servidor_p1.pdf< Acesso em 29/01/2015. 2009

CHOO, S. Y. The HLA System: Genetics, Immunology, Clinical Testing, and Clinical Implications. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 1, p. 11-23, 2007.

CHRIST, O. *et al.* Improved purification of hematopoietic stem cells based on their elevated aldehyde dehydrogenase activity. **Haematologica**, v. 92, n. 09, p. 1165:1172, 2007.

FALLON, P. *et al.* Mobilized peripheral blood SSClo ALDHbr cells have the phenotypic and functional properties of primitive haematopoietic cells and their number correlates with engraftment following autologous transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 122, p. 99-108, 2003.

GENEUGELIJK, K.; SPIERING, E. Immunogenetic factors in the selection of cord blood units for transplantation: current search strategies and future perspectives. **Cytotherapy**, v. 17, p. 702-710, 2015.

GENTRY, T. *et al.* Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH-bright cell population of cryopreserved, banked UC blood. **Cytotherapy**, v. 9, n. 6, p. 569-576. 2007.

GENTRY, T. *et al.* Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy. **Cytotherapy**, v. 9, n. 3, p. 259-274, 2007.

GLUCKMAN, E. *et al.* Hematopoietic Reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. **The New England Journal of Medicine**, v. 321, n. 17, p. 1174-1989, 1989.

GOODELL, M. A. CD34⁺ or CD34⁻: Does it really matter? **Blood**, v. 94, n. 8, p. 2545-2547, 1999.

GRATAMA, J. W. *et al.* Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34+ hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. **Cytotherapy**, v. 5, n. 1, p. 55-65. 2003.

HAO, Q. L. *et al.* A Functional Comparison of CD34+CD38- Cells in Cord Blood and Bone Marrow. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3745:3753, 1995.

HESS, D. A. *et al.* Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. **Blood**, v. 104, n. 6, p. 1648:1655, 2004.

HORDYJEWSKA, A.; POPIOLEK, L.; HORECKA, A. Characteristics of hematopoietic stem cells and umbilical cord blood. **Cytotechnology**, v. 67, p. 387-396, 2015.

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

JONES, R. J. *et al.* Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. **Blood**, v. 85, n. 10, p. 2742-2746, 1995.

KASTAN, M. B. *et al.* Direct Demonstration of Elevated Aldehyde Dehydrogenase in Human Hematopoietic Progenitor Cells. **Blood**, v. 75, n. 10, p. 1947-1950, 1990.

LEE, H. R. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase-bright cells correlated with the colony-forming unit-granulocyte-macrophage assay of thawed cord blood units. **Transfusion**, v. 54, p. 1871-1875, 2014.

LEE, H. R. *Et al.* Attached segment has higher CD34+ cells and CFU-GM than the main bag after thawing. **Cell Transplantation**, v. 24, p. 305-310, 2015.

LINDEMANS, C.A; BESIEN, K.V. Topping it up: methods to improve cord blood transplantation outcomes by increasing the number of CD34+ cells. **Cytotherapy**, v. 17, p. 723-729, 2015.

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

MIRABELLI, P. *et al.* Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. **BMC Physiology**, v. 8, n. 13, 2008.

MOREB, J. S. Aldehyde Dehydrogenase as a Marker for Stem Cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 4, p. 237-246, 2008.

MORETTI, S. *et al.* Comparison of single and dual platform methodologies for the estimation of CD34+ hematopoietic progenitor cells: Correlation with colony assay. **The International Journal of Biological Markers**, v.17, n. 4, p. 259-267, 2002.

NAING, M. W. *et al.* Improving umbilical cord blood processing to increase total nucleated cell count yield and reduce cord impute wastage by managing the consequences of input variation. **Cytotherapy**, v.17, p. 58-67, 2015.

PEARCE, D. J. *et al.* Characterization of Cells with a High Aldehyde Dehydrogenase Activity from Cord Blood and Acute Myeloid Leukemia Samples. **Stem Cells**, v.23, p. 752-760, 2005.

PEARCE, D. J.; BONNET, D. The combined use of Hoechst efflux ability and aldehyde dehydrogenase activity to identify murine and human hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, v. 35, p. 1437-1446, 2007.

RADKE, T. F. *et al.* The Assessment of Parameters Affecting the Quality of Cord Blood by the Appliance of the Annexin V Staining Method and Correlation with CFU Assays. **Stem Cells International**, 2013.

RUBINSTEIN, P. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Proc Natl Acad Sci**, v. 22, p. 10119-22, 1995.

SALGE-BARTELS, U. *et al.* Evaluation of Quality Parameters for Cord Blood Donations. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 36, p.317-324. 2009.

SHOULARS, K. *et al.* Development and validation of a rapid, aldehyde dehydrogenase bright-based cord blood potency assay. **Blood**, v. 127, n. 19, p. 2346-2354, 2016.

SIQUEIRA, A. L.; TIBURCIO, J. D. **Estatística na área da saúde: conceitos, metodologia, aplicações e prática computacional**. 1. ed. Belo Horizonte: Editora Coopmed, 2011.

SULLIVAN, M. J. Banking on cord blood stem cells. **Nat Rev Cancer**, v. 8, p. 555-563, 2008.

STEMCELL. **Atlas of Hematopoietic Colonies from Cord Blood**. Versão 2.0. 2010.

STEMCELL. **Aldehyde Dehydrogenase – Based Cell Detection Kit**. Versão 1.1.0. 2011.

STEMCELL. **Technical Bulletin. Identification of viable stem and progenitor cells with Aldefluor.** Versão 1.0.1. 2009.

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

STORMS, R. W. *et al.* Distinct hematopoietic progenitor compartments are delineated by the expression of aldehyde dehydrogenase and CD34. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 95-102, 2005.

VEERAPUTHIRAN, M. *et al.* Aldehyde dehydrogenase as an alternative to enumeration of total and viable CD34+ cells in autologous hematopoietic progenitor cell transplantation. **Cytotherapy**, v. 13, p. 1256-1258, 2011.

ZHONG, X. Y. *et al.* Umbilical cord blood stem cells: what to expect. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1205, p. 17-22, 2010.

APÊNDICE A – RESULTADO DO ENSAIO CLONOGÊNICO

Tabela suplementar A: Resultado do Ensaio Clonogênico

SCUP		CFU/ BFU-E	CFU - G/M	CFU- GEMM	Resultado (CFU/10e5CN plaqueadas)	Análise CFU	
	TCN unidade (vol final*NBC)/100	Média	Média	Média	Média	TCN x 10e5 (bolsa final)	Número CFU total bolsa
1	8,73	10	12	7	145	8730	1265850
2	11,18	9,5	10	4	117,5	11180	1313650
3	8,52	14,5	13	1	142,5	8520	1214100
4	13,48	1	14,5	8,5	120	13480	1617600
5	8,22	8,5	5,5	2,5	82,5	8220	678150
6	9,72	7,5	10	2	97,5	9720	947700
7	13,93	3,5	6,5	5,5	77,5	13930	1079575
8	30,71	2	32,5	3	187,5	30710	5758125
9	5,56	41	27,5	2,5	355	5560	1973800
10	10,46	18	17,5	3	192,5	10460	2013550
11	19,21	8,5	17,5	7	165	19210	3169650
12	7,83	10	13	6,5	147,5	7830	1154925
13	10,66	8	10,5	1	97,5	10660	1039350
14	5,91	Placa contaminada				5910	0
15	13,41	6	18,5	3	137,5	13410	1843875
16	26,47	11	28	11	250	26470	6617500
17	14,88	0,5	26,5	3	150	14880	2232000
18	15,2	5	22,5	7	172,5	15200	2622000
19	8,22	9	25	8	210	8220	1726200
20	12,54	9,5	29	7,5	230	12540	2884200
21	16,6	12	32,5	2,5	235	16600	3901000
22	10,57	2,5	29,5	2	170	10570	1796900
23	17,41	10,5	9,5	1,5	107,5	17410	1871575
24	9,67	9,5	9	2	102,5	9670	991175
25	10,27	7	10,5	3	102,5	10270	1052675
26	10,71	10	9,5	1,2	103,5	10710	1108485
27	7,19	9	24	4,5	187,5	7190	1348125
28	11,81	Placa contaminada				11810	0
29	12,69	8,5	10	3	107,5	12690	1364175
30	7,66	Inúmeras colônias. Impossível contar				7660	0
31	9,72	4,5	14	3	107,5	9720	1044900
32	23,73	1,5	29,5	5	180	23730	4271400
33	8,05	0,5	20,5	1,5	112,5	8050	905625
34	17,55	1	12,5	0	67,5	17550	1184625
35	14,01	9,5	19	0,5	145	14010	2031450

continua

APÊNDICE B – QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ALDH^{br}

Tabela suplementar B1 – Quantificação de ALDH^{br} com imunofenotipagem CD45^{dim}CD38⁺CD34⁺

Nome da amostra	ALDH amostra final		ALDH amostra PRE		ALDH lixo	
	Número de células	Frequência	Número de células	Frequência	Número de células	Frequência
3	872	39.5	494	24.2	7	21.2
4	1376	31.6	529	18.9	11	17.7
5	440	8.56	226	8.22	11	8.27
6	496	11.5	565	28.4	NR	NR
7	2190	25.6	1023	16.1	25	7.86
8	3554	25.6	2212	25.9	269	15.9
9	732	1.6	10.7	205	NR	NR
10	151	14.8	487	20	NR	NR
11	370	15.5	18	22.5	0	0
12	1095	25.3	669	16.6	0	0
13	902	14.8	792	12	NR	NR
14	557	7.17	420	4.93	NR	NR
15	2127	14.7	904	9.02	16	15.0
16	935	42.6	250	27.6	16	11.4
17	592	22.4	955	17.6	24	9.34
18	1452	11.6	258	9.34	0	0
19	755	43.1	61	32.3	106	40.9
20	1198	48,7	1164	44,9	NR	NR
21	1270	13.3	1154	13.4	70	7.01
22	1435	33.3	1123	10.8	21	51.2
23	1051	43.2	345	21.4	19	3.34
24	542	42.5	169	29.8	NR	NR
25	882	39.6	344	17.0	NR	NR
26	1108	50.5	1162	42.4	NR	NR
27	717	39,5	320	20.3	NR	NR
28	334	23,6	476	6,51	3	18,8
29	545	54,8	631	36,1	32	25,2
30	273	52,7	20	19,8	0	0
31	88	26,6	65	21,7	4	12,1
32	638	30,5	190	22,2	14	14,9
33	206	26,7	53	3,93	NR	NR
34	145	12,9	30	2,18	NR	NR
35	1177	35,1	459	10,9	NR	NR
36	936	55,6	855	41,7	160	44,2
37	2534	44,5	1918	45,1	360	44
38	258	18,1	202	2,75	25	13,6
39	1927	44,2	2244	40,3	92	21,9

NR = não realizado

Tabela suplementar B2 – Quantificação de ALDH^{br} sem imunofenotipagem

Nome da amostra	ALDH amostra final		ALDH amostra PRE		ALDH lixo	
	Número de células	Frequência	Número de células	Frequência	Número de células	Frequência
3	1552	0,15	851	0,044	14	1,12E-03
4	1884	0,13	955	0,026	24	1,71E-03
5	871	0,035	423	0,013	34	2,88E-03
6	2419	0,18	1294	0,056	NR	NR
7	9337	0,66	2984	0,18	39	2,20E-03
8	7890	0,58	4615	0,12	606	0,015
9	3132	0,14	461	0,018	NR	NR
10	2231	0,23	2997	0,15	NR	NR
11	2444	0,16	83	7,44E-03	0	0
12	2632	0,22	1273	0,051	6	3,25E-03
13	1477	0,11	1286	0,074	NR	NR
14	813	0,041	645	0,037	NR	NR
15	3183	0,24	1249	0,16	80	4,95E-03
16	3090	0,15	788	0,03	53	2,57E-03
17	2571	0,22	2108	0,13	109	4,67E-03
18	2697	0,23	1777	0,069	0	0
19	951	0,14	148	0,021	202	0,029
20	1870	0,27	1879	0,27	NR	NR
21	2755	0,32	3610	0,34	308	0,011
22	2077	0,15	1525	0,059	226	0,015
23	1448	0,094	694	0,023	63	2,20E-03
24	836	0,041	340	0,011	NR	NR
25	1084	0,098	433	9,75E-03	NR	NR
26	1790	0,19	1718	0,094	NR	NR
27	2117	0,11	1437	0,064	NR	NR
28	927	0,045	848	0,027	17	7,23E-04
29	1340	0,092	1082	0,074	131	7,23E-03
30	1781	0,073	117	0,00724	38	2,23E-03
31	230	6,24E-03	408	6,50E-03	85	3,70E-03
32	1425	0,046	1198	0,031	205	8,32E-03
33	1023	0,038	307	9,89E-03	NR	NR
34	753	0,023	331	7,09E-03	NR	NR
35	1606	0,095	575	0,02	NR	NR
36	1522	0,13	1412	0,1	528	1,50E-02
37	5680	0,6	4992	0,46	1495	6,70E-02
38	1062	0,065	833	0,034	195	8,40E-03
39	3173	0,28	5212	0,39	402	1,40E-02

NR = não realizado

APÊNDICE C – LEVANTAMENTO DE CUSTOS

Figura Suplementar C1 – Levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico 1

LEVANTAMENTO DO SETOR DE CUSTOS					CCD: FPOP-A.GFC.CTS-03 VERSÃO 02 - MARÇO/2016
SETOR EXECUTANTE DO PRODUTO/SERVIÇO:	Cetebio/BMO e BSCUP							
NOME DO PRODUTO/SERVIÇO:	Realização do ensaio clonogênico in vitro (CFU) em unidades de células progenitoras hematopoéticas.							
DATA INICIAL DO LEVANTAMENTO:	23/01/2018							
RECURSOS HUMANOS								
ESPECIALIDADE	CARGA HORÁRIA MENSAL	VENCIMENTO – Salário	GIEF's	VALOR/HORA	PERCENTUAL ÔNUS (30%) – CUSTOS ADMINISTRATIVOS	TOTAL CUSTO/HORA	TEMPO TOTAL DESTINADO AO SERVIÇO	TOTAL CUSTO PARA A REALIZAÇÃO DO SERVIÇO
Médico (Pós Grad./Stricto Sensu/Res. Médica II – Nível VI)	96 horas	R\$ 10.886,92	R\$ 1.012,31	R\$ 123,95	R\$ 37,19	R\$ 161,14	10 min	R\$ 26,86
Farmacêutico Bioquímico ou Biólogo ou Biomédico (Profissional de Nível Superior)	160 horas	R\$ 3.464,43	R\$ 1.331,99	R\$ 29,98	R\$ 8,99	R\$ 38,97	30 min	R\$ 19,49
Técnico de Patologia Clínica	120 horas	R\$ 865,79	R\$ 824,80	R\$ 14,09	R\$ 4,23	R\$ 18,31	30 min	R\$ 9,16
TOTAL								R\$ 55,50
FONTE: Tabela salarial disponibilizada em http://www.sindpublicosmg.org.br/sindpublico/legislacao#tabela-salarial – Lei n° 21.726/2015 – Vigência: 1º outubro de 2015/ 1º janeiro de 2016/ 1º abril de 2016/ 1º Julho de 2016 (aumento salarial). GIEFS – cálculo da média de pagamentos realizados de jan. a dez./16 – tabela publicada na intranet.								

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C2 – Levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico 2

EQUIPAMENTOS								
TIPO	PATRIMÔNIO	ITEM	QUANT.	MÉDIA DE VIDA ÚTIL*	VALOR DO BEM	DEPRECIAÇÃO MENSAL DO ITEM	TEMPO MÉDIO DE UTILIZAÇÃO	CUSTO MÉDIO DE UTILIZAÇÃO**
P	90045970-0	Incubadora de CO2	1	10 ANOS	R\$ 20.000,00	R\$ 166,67	24 horas/dia	R\$ 5,56
P	90023498-8 ou 90023499-7 ou 90010095-8	Capela de fluxo laminar	1	10 ANOS	R\$ 14.818,00	R\$ 340,14	30 min	R\$ 0,55
P	90044555-6 ou 90010092-3	Pipeta de 100 µL	1	10 ANOS	R\$ 1.048,66	R\$ 75,85	30 min	R\$ 0,12
P	90045556-4 ou 5490430-7	Pipeta de 1000 µl	1	10 ANOS	R\$ 269,20	R\$ 69,35	30 min	R\$ 0,11
P	90045902-6	Refrigerador	1	10 ANOS	R\$ 20.622,79	R\$ 216,02	24 hs/ dia	R\$ 7,20
P	90010501-1	Freezer -30°C	1	10 ANOS	R\$ 26.000,00	R\$ 216,67	24 hs/ dia	R\$ 7,22
TOTAL								R\$ 20,77
TIPO: P – Próprio C – Comodato CD – Cessão de Uso L – Locado								
FONTE: Pesquisa realizada através do SIAD e arquivo extraído do site http://www.armazem.mg.gov.br – 20/12/2016								
* Tempo médio de vida útil de acordo com a Instrução Normativa SRF n° 162, de 31 de dezembro de 1938								
** Cálculo realizado: valor mensal pelos dias úteis (22) dividido pelas horas de funcionamento do setor (14), multiplicado pelo tempo total da utilização								
OBS.: Nas células destacadas em amarelo, na depreciação mensal do item, foram considerados os valores de manutenção preventiva/corretiva, de acordo com cada contrato								

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C3 – Levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico 3

MATERIAIS ESPECÍFICOS E AUXILIARES (Fracionáveis e não fracionáveis)									
DADOS DOS MATERIAIS						UTILIZAÇÃO DOS MATERIAIS			
CÓDIGO SIAD	AQUISIÇÃO	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	QUANTIDADE	UNIDADE DE MEDIDA	VALOR	MEDIDA	CONVERSÃO	QUANTIDADE UTILIZADA	VALOR TOTAL
540129	CS	Tubo tipo eppendorf 1,5 mL	1000	Unidade	R\$ 161,50	Unidade	1000	2	R\$ 0,32
538957	CS	Tubo criogênico 2,0 MI	1	Unidade	R\$ 0,81	Unidade	1	2	R\$ 1,62
540919	CS	Criotubo de 5,0 mL	1000	Unidade	R\$ 161,50	Unidade	1000	1	R\$ 0,16
318183	CS	Agulha de aspiração	100	Unidade	R\$ 19,79	Unidade	100	1	R\$ 0,20
458937	CS	Seringa 3,0 MI	1	Unidade	R\$ 0,11	Unidade	1	1	R\$ 0,11
492698	CS	Placa para cultura com 6 poços (SmartDisk)	50	Unidade	R\$ 5.544,02	Unidade	50	1	R\$ 110,88
1238957	CS	Ponteira com filtro 10-100 µl	100	Unidade	R\$ 31,55	Unidade	100	1	R\$ 0,32
1185691	CS	Ponteira com filtro 100-1000 µL	1000	Unidade	R\$ 299,65	Unidade	1000	2	R\$ 0,60
157171 ou 157163 ou 157139	CS	Luvas de procedimento (P.M.G)	1	Par	R\$ 0,24	Par	1	1	R\$ 0,24

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C4 – Levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico 4

125326	CS	Luva plástica	1	Par	R\$ 1,00	Par	1	1	R\$ 1,00
125245	CS	Máscara	1	Unidade	R\$ 0,07	Unidade	1	2	R\$ 0,14
229164	CS	Toque	100	Unidade	R\$ 9,03	Unidade	100	2	R\$ 0,18
521507	CS	Meio de cultura (100 ml) 1 frasco faz 33 testes	1	unidade	R\$ 5.590,15	Unidade	33	1	R\$ 169,40
76481	CS	Folha de papel	1	Unidade	R\$ 0,25	Unidade	1	4	R\$ 1,00
TOTAL									R\$ 286,17
AQUISIÇÃO: CS – Compra SIAD CPP – Compra c/ Pronto Pagamento D – Doação									
FONTE: Consulta realizada através do site www.compras.mg.gov.br / SIAD – 20/12/2016 – Valores dos itens de compra com pronto pagamento informados pelo setor responsável									

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C5 – Levantamento de Custos – Ensaio Clonogênico 5

OUTROS GASTOS				
Itens	Nº DO CONTRATO (CASO HOUVER)	DESCRIÇÃO	UTILIZAÇÃO*	VALOR TOTAL
1	S/Nº	Exame de hemograma realizado no CETEBIO	2 exames	R\$ 56,87
2	S/Nº	Impressão de formulários	3 impressões	R\$ 0,15
3	S/Nº	Rateio água, luz, telefone	Rateio água, luz, telefone	R\$ 45,89
TOTAL				R\$ 102,91
FONTE: Levantamento de custeio realizado separadamente (hemograma)				
* Indicar a quantidade de utilização de acordo com o tipo de gasto (Ex.: Diárias – Utilização: 5 diárias)				
QUADRO RESUMO DO LEVANTAMENTO DE CUSTOS				
DESCRIÇÃO			VALOR APURADO	
RECURSOS HUMANOS			R\$ 55,50	
EQUIPAMENTOS - DEPRECIAÇÃO			R\$ 20,77	
MATERIAIS			R\$ 286,17	
OUTROS GASTOS			R\$ 102,91	
RATEIO DE CUSTOS ADMINISTRATIVOS HEMOMINAS - Aprox. 32% do valor total do exame (cálculo com base nos custos da HEMOMINAS de 2017)			R\$ 214,06	
CUSTO TOTAL APURADO			R\$ 679,40	

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C6 – Levantamento de Custos – ALDH 1

LEVANTAMENTO DO SETOR DE CUSTOS				CCD:
						FPOP-A.GFC.CTS-03 VERSÃO 02 - MARÇO/2016		
SETOR EXECUTANTE DO PRODUTO/SERVIÇO:		Cetebio/BMO e BSCUP						
NOME DO PRODUTO/SERVIÇO:		Realização do ensaio de quantificação de células ALDH por citometria de fluxo						
DATA INICIAL DO LEVANTAMENTO:		19/12/2017						
RECURSOS HUMANOS								
ESPECIALIDADE	CARGA HORARIA MENSAL	VENCIMENTO - Salário	GIEF's	VALOR/HORA	OUTRAS DESPESAS COM PESSOAL (MÉDIA DE 30%)	TOTAL CUSTO/HORA	TEMPO TOTAL DESTINADO AO SERVIÇO	TOTAL CUSTO PARA A REALIZAÇÃO DO
Médico (Pós Grad./Stricto Sensu)	96 horas	R\$ 10.886,92	R\$ 1.012,31	R\$ 123,95	R\$ 37,19	R\$ 161,14	10 min	R\$ 26,86
Farmacêutico Bioquímico ou Biólogo ou Biomédico (Profissional de Nível Superior)	160 horas	R\$ 3.464,43	R\$ 1.331,99	R\$ 29,98	R\$ 8,99	R\$ 38,97	3 horas	R\$ 116,91
Técnico de Patologia Clínica	120 horas	R\$ 865,79	R\$ 824,80	R\$ 14,09	R\$ 4,23	R\$ 18,31	1 hora	R\$ 18,31
TOTAL								R\$ 162,08
FONTE: Tabela salarial disponibilizada em http://www.sindpublicosmg.org.br/sindpublico/legislacao/tabela-salarial - Lei nº 21.726/2015 - Vigência: 1º outubro de 2015/ 1º janeiro de 2016/ 1º abril de 2016/ 1º Julho de 2016 (aumento salarial). GIEES - cálculo da média de pagamentos realizados de jan. a dez./17 - tabela publicada na intranet.								

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C7 – Levantamento de Custos – ALDH 2

EQUIPAMENTOS							
PATRIMÔNIO	ITEM	QUANT.	MÉDIA DE VIDA ÚTIL*	VALOR DO BEM	DEPRECIÇÃO MENSAL DO ITEM	TEMPO MÉDIO DE UTILIZAÇÃO	CUSTO MÉDIO DE UTILIZAÇÃO**
90045970-0	Incubadora de CO2	1	10 ANOS	R\$ 20.000,00	R\$ 166,67	24 hs/ dia	R\$ 0,00
90044554-8 ou 90010090-7	Pipeta 10 uL	1	10 ANOS	R\$ 1.048,66	R\$ 8,74	30 min	R\$ 0,00
90044555-6 ou 90010092-3	Pipeta de 100 µL	1	10 ANOS	R\$ 1.048,66	R\$ 8,74	30 min	R\$ 0,00
90045556-4 ou 5490430-7	Pipeta de 1000 µl	1	10 ANOS	R\$ 269,20	R\$ 2,24	30 min	R\$ 0,004
90045902-6	Refrigerador	1	10 ANOS	R\$ 20.622,79	R\$ 171,86	24 hs/ dia	R\$ 0,00
90049104-3	Vortex	1	10 ANOS	R\$ 1.100,00	R\$ 9,17	20 minutos	R\$ 0,00
10969	Citômetro de fluxo	1	10 ANOS	R\$ 330.000,00	R\$ 2.750,00	40 minutos	R\$ 5,952
90010501-1	Freezer -30°C	1	10 ANOS	R\$ 26.000,00	R\$ 216,67	24 hs/ dia	R\$ 0,00
TOTAL							R\$ 5,96
P – Próprio C – Comodato CD – Cessão de Uso L - Locado							

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C8 – Levantamento de Custos – ALDH 3

MATERIAIS ESPECÍFICOS E AUXILIARES (Fracionáveis e não fracionáveis)								
DADOS DOS MATERIAIS					UTILIZAÇÃO DOS MATERIAIS			
AQUISIÇÃO	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	QUANTIDADE	UNIDADE DE MEDIDA	VALOR	MEDIDA	CONVERSÃO	QUANTIDADE UTILIZADA	VALOR TOTAL
CS	Microtubo 0,2mL	1000	Unidade	R\$ 241,88	Unidade	1000	1	R\$ 0,24
CS	kit para quantificação de células ALDH	1	1Kit	R\$ 6.923,94	testes	50	1	R\$ 138,48
CS	Tubo polipropileno 12 x 75 mm	125	unidade	R\$ 52,76	unidade	125	2	R\$ 0,84
CS	Kit de calibração de três cores para citômetro de fluxo	1	Kit	R\$ 1.454,51	unidade	25	1	R\$ 11,64
CS	Solução isotônica para citômetro de fluxo.	20	litros	R\$ 194,73	ml	20000	500	R\$ 4,87
CS	Tubo para citometria de fluxo 5 ml	125	unidades	R\$ 36,00	unidade	126	2	R\$ 0,57
CS	Ponteira com filtro 10-100 µl	100	Unidade	R\$ 32,33	Unidade	100	3	R\$ 0,97
CS	Ponteira com filtro 100-1000 µL	1000	Unidade	R\$ 226,08	Unidade	1000	9	R\$ 2,03
CS	Ponteira com filtro 5-10 µL	1	Unidade	R\$ 0,03	unidade	1	2	R\$ 0,06
		1	Par		Par			

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C9 – Levantamento de Custos – ALDH 4

CS	µL		Unidade	R\$ 0,03	unidade	1	2	R\$ 0,06
CS	Luvras de procedimento (P,M,G)	1	Par	R\$ 0,27	Par	1	1	R\$ 0,27
CS	Luva plástica	100	Unidade	R\$ 9,96	Par	100	2	R\$ 0,20
CS	Máscara	1	Unidade	R\$ 0,13	Unidade	1	2	R\$ 0,25
CS	Touca	100	Unidade	R\$ 8,12	Unidade	100	2	R\$ 0,16
CS	Solução para lise de hemácias para citômetro de fluxo	5	litros	R\$ 1.319,47	ml	5000	5	R\$ 1,32
TOTAL								R\$ 161,91
CS – Compra SIAD			CPP – Compra c/ Pronto Pagamento			D - Doação		
a realizada através do site www.compras.mg.gov.br / SIAD - jan/2018 - Valor do item 1435876 informado pelo Almojarifado, uma vez que o mesmo não foi localizado no SIAD (verificaram a TR de 2015).								

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C10 – Levantamento de Custos – ALDH 5

MATERIAIS COMPONENTES DE SOLUÇÕES/REAGENTES									
DADOS DOS MATERIAIS						UTILIZAÇÃO DOS MATERIAIS			
CÓDIGO SIAD	AQUISIÇÃO	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	QUANTIDADE	UNIDADE DE MEDIDA	VALOR	MEDIDA	CONVERSÃO	QUANTIDADE UTILIZADA	VALOR TOTAL
1183354	CS	PBS	50	unidade (comprimido)	R\$ 322,19	unidade	50	3	R\$ 19,33
1431358	CS	BSA	50	gr	R\$ 1.670,65	grama	50	1	R\$ 33,41
-	-	Água	200	ml	R\$ 0,00	ml	200	200	R\$ 0,00
NOME DA SOLUÇÃO/ REAGENTE:			QUANTIDADE	UNIDADE DE MEDIDA	VALOR	MEDIDA	CONVERSÃO	QUANTIDADE UTILIZADA	VALOR TOTAL
Solução de PBS/BSA			200	ml	R\$ 52,74	ml	200	3	R\$ 0,79
AQUISIÇÃO:		CS – Compra SIAD			CPP – Compra c/ Pronto Pagamento			D - Doação	
FONTE: Consulta realizada através do site www.compras.mg.gov.br / SIAD - 19/12/2016									
OUTROS GASTOS									
Itens	Nº DO CONTRATO (CASO EXISTIR)	DESCRIÇÃO				UTILIZAÇÃO*		VALOR TOTAL	
1	S/N*	Exame de hemograma realizado no CETEBIO				2 exames		R\$ 56,87	
2	S/N*	Impressão de formulários				3 impressões		R\$ 0,15	
3	S/N*	Rateio água, luz, telefone (valor atribuído ao CD 34 utilizado neste levantamento, devido à similaridade dos equipamentos e da técnica, uma vez que não há dado estatístico deste exame para distribuição de rateio)				Rateio água, luz, telefone		R\$ 30,45	
TOTAL									R\$ 87,47
FONTE: Levantamento de custeio realizado separadamente (hemograma)									

Fonte: Fundação Hemominas

Figura Suplementar C11 – Levantamento de Custos – ALDH 6

QUADRO RESUMO DO LEVANTAMENTO DE CUSTOS	
DESCRIÇÃO	VALOR APURADO
RECURSOS HUMANOS	R\$ 162,08
EQUIPAMENTOS - DEPRECIÇÃO	R\$ 5,96
MATERIAIS	R\$ 162,70
OUTROS GASTOS	R\$ 87,47
RATEIO DE CUSTOS ADMINISTRATIVOS DA HEMOMINAS - Aprox. 32% do valor total do exame (cálculo com base nos custos da HEMOMINAS de 2017)	R\$ 192,37
CUSTO TOTAL APURADO	R\$ 610,58

Fonte: Fundação Hemominas

APÊNDICE D– TCLE UTILIZADO NA PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DA ENZIMA ALDEÍDO DESIDROGENASE (ALDH), A CAPACIDADE PROLIFERATIVA IN VITRO E O COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS DAS CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.

Pesquisadores responsáveis: Paula Renata Machado Passos e Eduardo Magalhães Rego.

Você está sendo convidada a participar deste projeto de pesquisa que faz parte do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio / Fundação Hemominas e será desenvolvido por uma aluna que está fazendo mestrado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O objetivo da pesquisa é melhorar a qualidade dos transplantes no Brasil conhecendo melhor as células tronco hematopoéticas, que são as células mãe, isto é, as células que dão origem a outras células do sangue.

A sua participação é voluntária como doadora do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) do seu filho. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessada em participar, solicitaremos que assine este documento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Nos últimos anos você tem ouvido falar muito sobre as células tronco e sobre quanto estas células são promissoras no tratamento das mais diversas doenças. Entretanto, o conhecimento sobre as células tronco, de uma maneira geral, está em um estágio básico e ainda temos muito o que aprender.

O Sangue do cordão umbilical do seu filho é rico em células tronco e por isso queremos estudar melhor essas células. Já foi observado que este tipo de células pode apresentar diferentes características variando de pessoa para pessoa e, por

isso, queremos estudá-las. Pretendemos comparar dois testes de controle de qualidade para saber se um teste é similar ao outro. Se isso for comprovado, será possível melhorar e agilizar a liberação de células do cordão umbilical para o transplante de células tronco.

Como será feita esta pesquisa?

Se você concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo de consentimento, amostras do sangue de cordão umbilical e placentário do seu filho serão retiradas da bolsa doada e analisadas.

As amostras serão retiradas no Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio da bolsa já coletada e em nenhum momento será necessário coletar novas amostras de sangue de você ou do seu filho.

O volume necessário para a pesquisa pode variar de acordo com as características de cada sangue. A quantidade de células presentes, por exemplo, é um ponto que interfere na quantidade necessária. Em alguns casos a bolsa com o sangue dará continuidade ao processo e armazenada e em outros casos, ela precisará ser descartada.

Com estas amostras realizaremos alguns testes que nos ajudarão a compreender as características das células tronco e como essas características podem impactar os transplantes.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

Se você estiver de acordo, as células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no Cetebio, para análises futuras, com finalidade científica. Para que isso ocorra, é necessário que você marque o quadradinho autorizando a conservação deste material.

Caso você não estiver de acordo com a conservação do excedente das células coletadas, basta nos avisar verbalmente e marcar o quadradinho não autorizando a guarda deste material. Nestes casos, o excedente de células será descartado ao término deste estudo.

Quanto tempo durará a pesquisa?

A pesquisa será concluída em até três anos. Neste período coletaremos amostras, realizaremos testes e avaliaremos os dados obtidos.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Não existem riscos físicos para você ou para o seu filho. As amostras para a pesquisa serão retiradas da bolsa de sangue de cordão umbilical e placentário já coletada.

A autorização para a participação na pesquisa não significa que a bolsa coletada participará dela. Após a coleta, o sangue de cordão umbilical do seu filho será encaminhado para o laboratório. Chegando ao laboratório ele será avaliado em dois pontos: o volume e a quantidade de células presentes. Caso a bolsa não esteja nos critérios pré-estabelecidos, ela será descartada e não será utilizada.

Todas as informações referentes a sua doação serão arquivadas até o término da pesquisa ou até todas as suas amostras serem utilizadas (caso seja autorizada o armazenamento das células para pesquisas futuras). Após a coleta, as enfermeiras enviarão a bolsa coletada e os formulários para o BSCUP/ Cetebio. A bolsa coletada e os formulários receberão uma numeração única e a partir desse momento somente este número será utilizado durante a pesquisa. Existe um risco, ainda que pequeno, de que os dados fornecidos por você sejam divulgados. Todas as medidas necessárias para que isso não ocorra serão tomadas, como, por exemplo, arquivamento das informações em prontuários dentro de sala de arquivo com acesso controlado.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar de nosso estudo ou a qualquer momento desejar retirar o seu consentimento e deixar de participar, garantimos que isso não trará, em hipótese alguma, qualquer tipo de prejuízo para você ou para o seu filho.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum tipo de pagamento ou compensação pela doação. O verdadeiro benefício será o de auxiliar-nos a entender melhor sobre as células tronco presentes no sangue de cordão umbilical e placentário.

Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira absolutamente sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Asseguramos a você o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga qualquer prejuízo para você ou para seu filho.

Garantimos que você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos pesquisadores.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Paula Renata Machado Passos pelo telefone (31) 3268-0511 ou pelo e-mail paula.passos@hemominas.mg.gov.br

Eu, _____,
RG _____, internada no Hospital _____
_____ declaro que li as informações desse documento, fui devidamente orientada pela equipe do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Cetebio quanto aos objetivos dessa pesquisa e autorizo a retirada de amostras da bolsa de sangue de cordão umbilical e placentário do meu filho para a realização deste estudo. Estou ciente que as amostras serão utilizadas na pesquisa que irá comparar testes de controle de qualidade e tem o objetivo de aprimorar os transplantes realizados. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado pode ou não causar o descarte da bolsa coletada.

Tendo em vista todas as considerações acima, declaro que tive oportunidade de fazer perguntas, esclarecer todas as minhas dúvidas e que aceito participar dessa pesquisa.

☐ Autorizo o armazenamento das células remanescentes para a utilização em pesquisas futuras.

☐ Não autorizo o armazenamento das células remanescentes para a utilização em pesquisas futuras.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 20____

Assinatura da mãe – RG

Enfermeiro do Cetebio– MASP

Paula Renata Machado Passos – Responsável pela pesquisa