

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**ALOISIO LUIZ BENEDETTI**

**EXPANSÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS-  
TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS DE SANGUE  
DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO**

**FLORIANÓPOLIS**

**2014**



Aloisio Luiz Benedetti

**EXPANSÃO *EX VIVO* DE CÉLULAS-  
TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS DE SANGUE  
DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC - como requisito final para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia, área de concentração “Análises Clínicas”.  
Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva

Florianópolis  
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da  
UFSC.

Benedetti, Aloisio Luiz

Expansão ex vivo de células-tronco/progenitoras  
hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e  
placentário / Aloisio Luiz Benedetti ; orientador, Márcio  
Alvarez da Silva - Florianópolis, SC, 2014.  
194 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Hematologia. 3. Sangue de cordão  
umbilical e placentário. 4. Células-tronco/progenitoras  
hematopoiéticas. 5. Expansão ex vivo. I. Silva, Márcio  
Alvarez da . II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“Expansão ex vivo de células-tronco/progenitoras  
hematopoiéticas de sangue de cordão umbilical e  
placentário”**

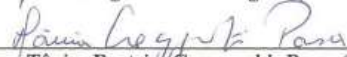
**POR**

**Aloisio Luiz Benedetti**

Tese julgada e aprovada em sua  
forma final pelo(a) Orientador(a) e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:


**Banca Examinadora:**

  
Prof. Dr. Marco Augusto Siffamiglio (FIOCRUZ – Membro  
Titular)

  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro  
Titular)

  
Profa. Dra. Cidônia de Loudes Vituri (UFSC - Membro Titular)

  
Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti (UFSC – Membro Titular)

  
Prof. Dr. Celso Spada (UFSC – Membro Titular)

  
Prof. Dr. Márcio Alvarez (UFSC – Orientador)

  
Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC

Florianópolis, 25 de fevereiro de 2014.



Dedico este trabalho às minhas duas famílias. À minha esposa e filhos e aos meus pais, meus irmãos e irmãs. Vocês são uma clara manifestação do amor de Deus por mim e por cada um de nós.





## AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e todos os aspectos inerentes a mesma, por meio dos quais manifesta seu amor e misericórdia infinitos.

Ao Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, pela oportunidade que me propiciou, pela orientação e apoio, pelo incentivo, compreensão e serenidade durante a realização deste trabalho.

Às mães/doadoras, que em um momento de importância indescritível em suas vidas, carregado de tanta emoção e ansiedade, tiveram a paciência para escutar as explicações sobre a pesquisa e a generosidade para contribuir com ela. Obrigado, também, pela oportunidade, ainda que breve, de partilhar deste momento tão singular de suas vidas. “Só mãe mesmo...”

Às equipes do Centro Obstétrico do HU pela disponibilidade, boa vontade para colaborar com a pesquisa e pelos momentos de convívio compartilhados.

À Profa. Dra. Andréa e aos Professores Doutores Giordano e Ricardo pelas contribuições e pelo companheirismo demonstrados.

A todos do LACERT, os que ainda estão, os que saíram e os que estão retornando, pelas contribuições teóricas e práticas, pela amizade, companheirismo e incentivo ao longo desta jornada, em especial a Diana que compartilhou comigo longas horas na maternidade e no laboratório. Nada somos e nada fazemos sozinhos, muito obrigado.

Por uma circunstância especial que a Talita vive, não posso deixar de fazer uma referência a ela, afinal de contas, as mães foram uma constante presença durante esta pesquisa. Talita, neste momento que estou escrevendo você está, de modo figurado, às portas da maternidade. Talvez o sentido literal dessa expressão aconteça durante a defesa desta tese e então, você começará um doutorado eterno. Obrigado pelas discussões e parabéns.

Aos servidores da UFSC que, nas diferentes funções, realizam inúmeras trabalhos, muitos deles anônimos, para que tantos outros possam ser concretizados. Em especial agradeço ao pessoal do LAMEB I, pela contribuição na citometria de fluxo e à Simone, pela dedicação na limpeza das salas e laboratórios.

À Fernanda Guidarini, pela disponibilidade e presteza em ajudar nas referências.

À FIOCRUZ / PR, pela valiosa colaboração na análise da citometria de fluxo.

Aos colegas e amigos do Hospital de Guarnição de Florianópolis, pela amizade de sempre, pela colaboração em tantos aspectos direta ou indiretamente envolvidos neste trabalho.

Aos amigos Danilo, Lena, Lali, Cátia, Beto, Margot, Joanin, Giovana, aos amigos familiares, aos amigos vizinhos, aos amigos na Fé, presentes na minha vida de um ou outro modo, com maior ou menor frequência, mas certamente presentes de Deus que fazem muita diferença na minha vida e, conseqüentemente, nessa caminhada.

Aos meus pais e irmãos, pelos ensinamentos com palavras e acima de tudo pelo exemplo que são, pelo amor incondicional, sempre presentes em minha vida formam a base desta caminhada e qualquer outra que eu tenha realizado ou que venha fazer.

À minha esposa Tânia e aos filhos Luiza, Victor e Arthur, vocês são muito mais do que qualquer um poderia esperar. Como poderia agradecer a tanto? A resposta só pode ser dada no nosso dia-a-dia, o que quer que eu escreva será sempre muito pouco. Amo vocês.

A fé e a razão (*fides et ratio*) constituem como que as duas asas pelas quais o espírito humano se eleva para a contemplação da verdade. Foi Deus quem colocou no coração do homem o desejo de conhecer a verdade e, em última análise, de O conhecer a Ele, para que, conhecendo-O e amando-O, possa chegar também à verdade plena sobre si próprio.”

(Papa João Paulo II, 1998)



## RESUMO

As Células-tronco progenitoras hematopoiéticas (CTPHs) do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) tem sido utilizadas no tratamento de diversas doenças hematológicas neoplásicas ou não. O emprego de CTPHs do SCUP apresenta como principais vantagens a facilidade de obtenção, a ausência de riscos para a mãe e o(a) doador(a), disponibilidade de uso imediato pelo armazenamento de unidades testadas e tipadas para antígeno leucocitário humano (HLA), menor frequência e gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a não exigência de total paridade na tipagem HLA. Como principais limitações estão o número reduzido de CTPHs que o SCUP pode prover para um transplante em função do volume limitado e a demora na pega do enxerto. Por sua vez, o sucesso do transplante de CTPHs é dependente da dose celular transplantada por kg de peso corporal do receptor, o que praticamente restringe a utilização do SCUP a pessoas com peso corporal até 50 kg. Para suplantar essa limitação têm sido utilizadas estratégias que envolvem o estabelecimento de critérios para a seleção e armazenamento das unidades de SCUP, transplante de mais de uma unidade de SCUP e a expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP. A cultura das CTPHs sem células do microambiente hematopoiético priva as CTPHs das interações celulares e moleculares que ocorrem no mesmo. O presente trabalho tem por objetivo avaliar a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP, utilizando a co-cultura com células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas da membrana coriônica (MC) e do viló de placentas humanas para suporte da hematopoiese em ambiente 2D e 3D. Para isso as CTMs foram caracterizadas morfológicamente e imunofenotipicamente (CD73, CD90, CD105, CD34 e CD45) e analisadas quanto à expressão gênica quantitativa das citocinas de interesse hematopoiético SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1, nas passagens P1, P5 e P10. No SCUP foi realizado hemograma, contagem e separação de células CD34<sup>+</sup> e subpopulações e avaliado o potencial clonogênico. Foram investigadas correlações entre os fatores materno-fetais e parâmetros do SCUP, taxas de expansão *ex vivo* e entre os próprios parâmetros do SCUP. Para expansão *ex vivo* foram realizadas co-culturas com CTMs da MC em P1 e do viló em P5, em ambiente 2D e co-culturas com CTMs do viló em P5, em ambiente 3D constituído de uma matriz de colágeno I e 6-sulfato de condroitina. Os resultados demonstraram que as CTMs da MC e do viló apresentam características morfológicas e imunofenotípicas típicas de CTMs e expressam as citocinas de interesse hematopoiético, nas três passagens

analisadas. As CTMs da MC em P1 e do vilo em P5 apresentaram o melhor perfil de expressão de citocinas e foram selecionadas para os experimentos de expansão *ex vivo*. A análise das correlações entre os diferentes fatores e parâmetros avaliados sugere a seleção de unidades de SCUP oriundas de doações com idade gestacional acima de 39,5 semanas, contagens de células nucleadas totais (CNT) acima de  $13,05 \times 10^6$  células por mL, percentagem de eritroblastos (NRBC) maior de 2,875% e com contagem de células CD34<sup>+</sup> superiores a  $23,73 \times 10^3$  células por mL, para obtenção de amostras de melhor conteúdo hematopoiético e mais apropriadas para a expansão *ex vivo*. O suporte das CTMs foi crucial para a expansão *ex vivo* das CTPHs. As CTMs do vilo em P5 promoveram melhores taxas de expansão das CTPHs que as da MC em P1, em ambiente 2D e foram selecionadas para a expansão em ambiente 3D. A expansão das CTPHs com CTMs do vilo em ambiente 2D demonstrou melhores taxas de expansão que no ambiente 3D. Com base nos resultados conclui-se que a melhor condição para expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP, compreende a co-cultura de CTPHs oriundas de doações com idade gestacional acima de 39,5 semanas, contagens de CNT acima de  $13,05 \times 10^6$  por mL, percentagem de NRBC igual ou maior de 2,875% e com contagem de células CD34<sup>+</sup> superiores a  $23,73 \times 10^3$  células por mL, em ambiente 2D e com suporte de CTMs do vilo em P5.

**Palavras-chave:** Sangue de cordão umbilical e placentário. Células-tronco/progenitoras hematopoiéticas. Placenta. Membrana coriônica. Vilo. Células-tronco mesenquimais. Citocinas. Hemograma. CD34<sup>+</sup>. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Potencial clonogênico. Expansão *ex vivo*. Co-cultura.

## ABSTRACT

Umbilical cord blood (UCB) has been used as an alternative source of hematopoietic stem progenitor cells (HSPC) in HSPC transplantation to treat many hematological diseases. As a HSPC source, UCB has many practical advantages such as: easy procurement with no risks for donors and mothers, immediate availability if stored fully tested and human leucocyte antigen (HLA) typed, and a toleration of some degree of HLA mismatch. On the other hand, its major limitation is the low cell dose delivered. It is known that cell dose is the most important factor for engraftment. As a result, delayed neutrophil and platelet recovery are linked to UCB transplantation. Some strategies to overcome its main limitation include establishing criteria for the selection and storage units of UCB, transplanting more than one unit of UCB, and *ex vivo* expansion of CBHSPC (cord blood-derived hematopoietic stem progenitor cells). CBHSPC *ex vivo* expansion in 2D or 3D culture systems without cells from hematopoietic microenvironment deprived them of cell-to-cell contact and molecular interactions during hematopoiesis *in vivo*. This study is focused on *ex vivo* expansion of CBHSPC in a culture system with stromal support provided by MSC (mesenchymal stem cells) from human placental chorionic membrane (cMSC) and villi (vMSC). This approach includes cultures in 2D and 3D systems. The 3D cultures were performed on scaffold of cross-linked bovine collagen type I and chondroitin-6-sulfate. MSC morphology and phenotype (surface antigens CD73, CD90, CD105, CD34 and CD45) from both tissues were analyzed at three passages (P1, P5 and P10). In addition, real time PCR was performed to quantify gene expression of hematopoietic cytokines (SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 and SDF1) by MSC. Procedures in cord blood included CBC (complete blood count), CD34<sup>+</sup> cells count and its subpopulations, CD34<sup>+</sup> cell isolation, and clonogenic potential evaluation. Associations of maternal and fetal factors with UCB parameters and its clonogenic potential data as well as *ex vivo* expansion rates were addressed. cMSC from P1 (cMSCP1) and vMSC from P5 (vMSCP5) were used in co-cultures for *ex vivo* expansion of CBHSPC. Results - cMSC and vMSC from all passages showed morphological and phenotypic features typically of MSC as well as expressed all hematopoietic cytokines evaluated in this study; cMSCP1 and vMSCP5 showed the best cytokines expression profile and were selected for further experiments. Analysis regarding associations among all results suggest that UCB from gestational age greater than 39,5 weeks, with nucleated cells count above  $13,05 \times 10^6$  cells per mL,

nucleated red blood cells (NRBC) percentage greater than 2,875% and CD34<sup>+</sup> cell counts greater than 23,73 x 10<sup>3</sup> cells per mL are the best UCB samples for *ex vivo* expansion and hematopoietic content. MSC presence was crucial for CBHSPC *ex vivo* expansion in both 2D and 3D cultures; vMSCP5 promoted greater expansion rates than cMSCP1 in 2D co-cultures. vMSCP5 was selected for 3D expansion cultures. When comparing expansion rates between 2D and 3D co-cultures (both with vMSCP5), 2D co-cultures promoted greater expansion rates than 3D co-cultures.

**Keywords:** Umbilical cord blood. Hematopoietic stem progenitors cells. Placenta. Chorionic membrane. Villo. Mesenchymal stem cells. Cytokines. Complete blood count. Co-culture. CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>. Clonogenic potential. *Ex vivo* expansion.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da placenta humana a termo.....	53
Figura 2 – Obtenção da membrana coriônica e do vilão.....	63
Figura 3 – Representação esquemática da programação do equipamento de PCR em tempo real.....	70
Figura 4 – Representação esquemática da MRD Integra® .....	80
Figura 5 – CTMs isoladas da membrana coriônica em P1, P5 e P10.....	82
Figura 6 – CTMs isoladas do vilão em P1, P5 e P10.....	82
Figura 7 – Caracterização imunofenotípica das CTMs obtidas da membrana coriônica: histogramas representativos do perfil imunofenotípico das amostras em P1, P5 e P10, analisadas por citometria de fluxo.....	83
Figura 8 – Caracterização imunofenotípica das CTMs obtidas do vilão: histogramas representativos do perfil imunofenotípico das amostras em P1, P5 e P10, analisadas por citometria de fluxo.....	83
Figura 9 – Expressão do GAPDH pelas CTMs da membrana coriônica e do vilão em P1, P5 e P10.....	86
Figura 10 – Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético, pelas CTMs da membrana coriônica em P1, P5 e P10.....	90
Figura 11 – Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs do vilão em P1, P5 e P10.....	90
Figura 12 – Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético entre as CTMs obtidas do vilão em P5 e da membrana coriônica em P1.....	91
Figura 13 – Expressão gênica da IL6 nas diferentes passagens na MC e no vilão, obtida pela relação Ct IL6 / Ct GAPDH.....	93

Figura 14 – Expressão gênica da TPO nas diferentes passagens na MC e no vilo, obtida pela relação Ct TPO / Ct GAPDH.....	93
Figura 15 – Citometria de fluxo do SCUP marcado com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC. Imagem representativa das análises realizadas, seguindo a estratégia de janelas restritivas da ISHAGE/ISCT, com software Flowing.....	98
Figura 16 – Correlação entre o número de progenitores CD34 <sup>+</sup> /mL de SCUP, obtido por citometria de fluxo e o obtido pelo sistema de seleção positiva com partículas magnéticas.....	101
Figura 17 – Ensaio de formação de colônias com CTPHs do SCUP...102	
Figura 18 – Correlação entre a idade gestacional (semanas) e o número de colônias GEMM /10 <sup>3</sup> células CD34 <sup>+</sup> do SCUP.....	115
Figura 19 – Correlação entre a idade gestacional (semanas) e a proporção de colônias GEMM (%)......	116
Figura 20 – Número de UFC-GEMM /10 <sup>3</sup> células CD34 <sup>+</sup> do SCUP, segundo a idade gestacional menor ou maior que 39,5 semanas.....	115
Figura 21 – Proporção de UFC-GEMM do SCUP, segundo a idade gestacional menor ou maior que 39,5 semanas.....	116
Figura 22 – Correlação entre o número de leucócitos (x 10 <sup>6</sup> /mL) do SCUP e a proporção de colônias UFC-GEMM (%)......	118
Figura 23 – Proporção de UFC-GEMM do SCUP, segundo a contagem de leucócitos menor ou maior de 13,05 x 10 <sup>6</sup> /mL.....	118
Figura 24 – Correlação entre o percentual de NRBC do SCUP e o percentual de células CD34 <sup>+</sup> do SCUP.....	120
Figura 25 – Percentagem de células CD34 <sup>+</sup> do SCUP, segundo a percentagem de NRBC menor ou maior que 2,87%.....	120
Figura 26 – Correlação entre o número de células CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP e o número de BFU-E x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP.....	122

Figura 27 – Correlação entre o número de células CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP e o número de UFC-GM x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP.....	123
Figura 28 – Correlação entre o número de células CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP e o número de UFC-total x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP.....	124
Figura 29 – Número de BFU-E x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP, segundo o número de células CD34 <sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10 <sup>3</sup> /mL.....	122
Figura 30 – Número de UFC-GM x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP, segundo o número de células CD34 <sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10 <sup>3</sup> /mL.....	123
Figura 31 – Número de UFC-total x 10 <sup>3</sup> /mL do SCUP, segundo o número de células CD34 <sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10 <sup>3</sup> /mL.....	124
Figura 32 – Citometria de fluxo das CTMs do co-cultivo com células CD34 <sup>+</sup> , após tratamento com tripsina e marcação com anti-CD45-FITC.....	126
Figura 33 – Estratégia para a citometria de fluxo das células do sobrenadante das culturas e co-culturas de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs da MC e do vilo. As células foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC.....	127
Figura 34 – Contagem das CNT no meio sobrenadante e expansão das mesmas, em número de vezes, após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	130
Figura 35 – Co-cultura de CTPHs do SCUP com CTMs da MC em P1 e do vilo em P5, após 7 dias de co-cultivo.....	130
Figura 36 – Imagem representativa da citometria de fluxo com valores percentuais médios das subpopulações celulares CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> , pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	132
Figura 37 – Contagem das células CD34 <sup>+</sup> e subpopulações (CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> ), pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	133

Figura 38 – Expansão das células CD34 <sup>+</sup> e subpopulações (CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> ), em número de x à inicialmente cultivada, avaliadas por citometria de fluxo após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	133
Figura 39 – Percentual de células CD34 <sup>+</sup> inviáveis, avaliada após a cultura das mesmas por 7 dias, na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	134
Figura 40 – Contagem de colônias BFU-E e expansão dos progenitores eritróides do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	137
Figura 41 – Contagem de UFC-GM e expansão dos progenitores GM do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	138
Figura 42 – Contagem de UFC-GEMM e expansão dos progenitores GEMM do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	139
Figura 43 – Contagem do total de UFC e expansão dos progenitores hematopoiéticos do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	140
Figura 44 – Proporção dos diferentes tipos de colônias obtidas no ensaio de formação de colônias com células CD34 <sup>+</sup> pré e pós cultivo destas por 7 dias na presença (co-cultivo) ou não de CTMs.....	140
Figura 45 – Contagem das CNT no meio sobrenadante e expansão das mesmas, em número de vezes, após co-cultivo de células CD34 <sup>+</sup> , por 8 dias, com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	145
Figura 46 – Imagem representativa da citometria de fluxo com valores percentuais médios das subpopulações celulares CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>-</sup> pré e pós co-cultivo de células CD34 <sup>+</sup> , por 8 dias, com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	146

Figura 47 – Contagem de células CD34 <sup>+</sup> e das subpopulações CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>-</sup> , por citometria de fluxo pré e pós cultivo de células CD34 <sup>+</sup> , por 8 dias, com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	146
Figura 48 – Expansão das células CD34 <sup>+</sup> e subpopulações (CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> e CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> ), em número de x à inicialmente cultivada, avaliada por citometria de fluxo após 8 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	147
Figura 49 – Percentual de células CD34 <sup>+</sup> inviáveis, avaliada por citometria de fluxo, após a cultura das mesmas por 8 dias com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	148
Figura 50 – Contagem de colônias BFU-E e expansão dos progenitores eritróides do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de Colônias.....	150
Figura 51 – Contagem de UFC-GM e expansão dos progenitores GM do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias.....	151
Figura 52 – Contagem de UFC-GEMM e expansão de progenitores GEMM do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias.....	152
Figura 53 – Contagem do total de UFC pré e pós cultura e expansão dos progenitores hematopoiéticos do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias.....	153
Figura 54 – Proporção dos diferentes tipos de colônias obtidas no ensaio de formação de colônias com células CD34 <sup>+</sup> pré e pós co-cultivo com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D.....	154



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Transplantes de CTPHs realizados no mundo quanto ao tipo de doador e patologia, abrangendo 72 países nos cinco continentes, no período de 2006 a 2008.....	37
Tabela 2 – Anticorpos e isotipos controles utilizados na citometria de fluxo das CTMs.....	68
Tabela 3 – Iniciadores para quantificar expressão gênica de citocinas hematopoiéticas pelas CTMs.....	71
Tabela 4 – Anticorpos e isotipos controles utilizados na citometria de fluxo do SCUP, MNC e células da seleção positiva para CD34 pré e pós expansão <i>ex vivo</i> .....	73
Tabela 5 – Características materno-fetais e obstétricas referentes às doações de placenta e SCUP.....	81
Tabela 6 – Dados referentes à citometria de fluxo das CTMs da membrana coriônica e do viló, para os marcadores de superfície.....	84
Tabela 7 – Dados referentes à eficiência e linearidade de cada par de iniciadores.....	86
Tabela 8 – Valores, em número de vezes, da expressão gênica de citocinas pelas CTMs obtidas da MC e do viló, nas diferentes passagens, calculados pelo método de Pfaffl.....	89
Tabela 9 – Valores da expressão gênica de citocinas pelas CTMs obtidas da MC e do viló, nas diferentes passagens, calculados pela relação entre o Ct do gene normalizador (GAPDH) e o Ct do gene alvo (citocina)....	94
Tabela 10 – Parâmetros do hemograma e respectivos valores no SCUP.....	95
Tabela 11 – Parâmetros e respectivos valores de referência para o hemograma no SCUP, obtidos na literatura.....	96

Tabela 12 – Quantificação das células CD34 <sup>+</sup> no SCUP e nas MNC do GD antes e após proceder a seleção positiva para progenitores CD34.....	98
Tabela 13 – Viabilidade, pureza e taxa de recuperação das MNC separadas por GD e das CD34 <sup>+</sup> obtidas por seleção positiva.....	100
Tabela 14 – UFCs por 10 <sup>3</sup> células CD34 <sup>+</sup> e por mL do SCUP.....	103
Tabela 15 – Correlações entre os fatores materno-fetais e os parâmetros do SCUP e entre os próprios parâmetros hematológicos, que apresentaram significância estatística.....	107
Tabela 16 – Correlações entre os fatores materno-fetais e os parâmetros do SCUP e entre os próprios parâmetros hematológicos, que não apresentaram significância estatística.....	109
Tabela 17 – Parâmetros do SCUP com diferenças significantes entre os grupos quando os mesmos foram categorizados segundo a média ou mediana do fator preditor.....	114
Tabela 18 – Dados da contagem de CNT e da citometria de fluxo da co-cultura de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs da MC em P1 e do viló em P5.....	128
Tabela 19 – Dados dos ensaios de formação de colônias (número e proporção de cada tipo) com as células CD34 <sup>+</sup> pré e pós co-cultivo destas com CTMs da MC em P1 e do viló em P5.....	135
Tabela 20 – Dados da contagem de CNT e citometria de fluxo da co-cultura de células CD34 <sup>+</sup> com CTMs do viló em P5, em ambiente 2D e 3D.....	143
Tabela 21 – Dados dos ensaios de formação de colônias (número e proporção de cada tipo) com as células CD34 <sup>+</sup> pré e após o co-cultivo destas com CTMs do viló em P5, em ambiente 2D e 3D.....	149



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
7-AAD	7-amino-actinomicina D
ACD	Ácido cítrico-citrato-dextrose
APC	Alofocianina
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BFU-E	Unidade formadora de colônias do <i>burst</i> eritróide
BSCUP	Banco de sangue de cordão umbilical e placentário
BMDW	<i>Bone Marrow Donors Worldwide</i>
cDNA	Ácido desóxirribonucleico complementar
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research</i>
CNT	Células nucleadas totais
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CTPHs	Células-tronco/progenitoras hematopoéticas
CTR	Controle(s)
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
E	Eritrócitos
EDTA <sub>3</sub>	Ácido etilendiaminotetraacético tripotássico
Ef	Eficiência
ELISA	Enzima imunoensaio
EPO	Eritropoietina
EUA	Estados unidos da América
Exp A	Expansão absoluta
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flt3-L	Ligante do Flt3
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GD	Gradiente de densidade
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
Gran	Granulócitos
Hgb	Hemoglobina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
Id Gest	Idade gestacional
IL16	Interleucina 16
IL3	Interleucina 3

IL6	Interleucina 6
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Cancer
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engeneering</i>
L	Leucócitos totais
LACERT	Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular
Linf	Linfócitos
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC	Membrana coriônica
MEC	Matriz extracelular
MNC	Células mononucleares
Mon	Monócitos
MRD	Matriz de regeneração dérmica
NMDP	<i>The National Marrow Donors Program</i>
NRBC	Eritroblastos
NRT	<i>No reverse transcriptase</i>
NT	<i>No template</i>
P1	Passagem 1
P5	Passagem 5
P10	Passagem 10
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP Cy5.5	Complexo proteico clorofila-peridina
Plt	Plaquetas
PS	Penicilina e estreptomicina
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RN	Recém-nascido
RNA:	Ácido ribonucleico
SBF	Soro bovino fetal
SCF	Fator de célula-tronco
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
SDF1	Fator estromal 1
TA	Temperatura ambiente
TM	<i>T melting</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TPO	Trombopoietina
UFC-E	Unidade formadora de colônias eritróides
UFC-G	Unidade formadora de colônias de granulócitos

UFC-GEMM	Unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos
UFC-GM	Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos
UFC-M	Unidade formadora de colônias de macrófagos
UFC-E	Unidade formadora de colônias eritróides
USCUP	Unidade de sangue de cordão umbilical e placentário
VCM	Volume corpuscular médio
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>35</b>
3.1	HISTÓRICO E APLICAÇÕES DO TRANSPLANTE DE CTPHs .....	36
3.2	FONTES DE CTPHs PARA TRANSPLANTE .....	40
3.3	ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR AS LIMITAÇÕES NO USO DO SCUP COMO FONTE DE CTPHs.....	45
3.3.1	Fatores materno-fetais e obstétricos e o conteúdo do SCUP: contribuição para a seleção de unidades de SCUP a serem armazenadas .....	45
3.3.2	Transplante de mais de uma unidade de SCUP .....	46
3.3.3	Expansão <i>ex vivo</i> de CTPHs do SCUP .....	48
3.3.3.1	Cultura com adição exógena de citocinas.....	48
3.3.3.2	Co-cultura com CTMs em ambiente 2D.....	52
3.3.3.3	Co-cultura com CTMs em ambiente 3D.....	57
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>61</b>
4.1	APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA .....	61
4.2	DOADORES .....	61
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	61
4.4	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	62
4.4.1	CTMs de Placenta: membrana coriônica e vilos.....	62
4.4.2	Sangue de cordão umbilical e placentário .....	64
4.4.3	CTPHs do sangue de cordão umbilical e placentário .....	65
4.4.4	Síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA).....	65
4.5	ANÁLISE DAS AMOSTRAS .....	66
4.5.1	Caracterização das CTMs da membrana coriônica e do vilos.....	66
4.5.1.1	Caracterização morfológica.....	67
4.5.1.2	Caracterização imunofenotípica .....	67
4.5.2	Avaliação da expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs .....	68
4.5.3	Hemograma do SCUP .....	71
4.5.4	Percentual e número absoluto de células CD34 <sup>+</sup> no SCUP e MNC.....	72

4.5.5	Avaliação da pureza e taxa de recuperação das células MNC CD34 <sup>+</sup> obtidas do SCUP .....	74
4.5.6	Avaliação do potencial clonogênico das CTPHs do SCUP.....	74
4.5.7	Avaliação da associação entre fatores materno-fetais e obstétricos e parâmetros laboratoriais qualitativos do SCUP e entre os dados do conteúdo do SCUP .....	76
4.5.8	Expansão <i>ex vivo</i> de CTPHs do SCUP.....	76
4.5.8.1	Expansão em ambiente 2D.....	77
4.5.8.2	Expansão em ambiente 3D.....	78
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	80
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS MATERNO-FETAIS E OBSTÉTRICAS REFERENTES ÀS DOAÇÕES .....	81
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs DA MEMBRANA CORIÔNICA E DO VILO.....	82
5.2.1	Caracterização morfológica .....	82
5.2.2	Caracterização imunofenotípica.....	83
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS DE INTERESSE HEMATOPOÉTICO PELAS CTMs DA MEMBRANA CORIÔNICA E DO VILO .....	85
5.4	HEMATOLOGIA DO SCUP .....	94
5.4.1	Hemograma do SCUP.....	95
5.4.2	Número absoluto e relativo de células CD34 <sup>+</sup> no SCUP..	96
5.4.3	Viabilidade, pureza e taxa de recuperação das células MNCs e CTPHs .....	98
5.4.4	Potencial clonogênico das CTPHs do SCUP .....	101
5.5	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES MATERNO-FETAIS E PARÂMETROS LABORATORIAIS QUALITATIVOS DO SCUP E ENTRE OS DADOS DO CONTEÚDO DO SCUP.....	104
5.6	EXPANSÃO <i>EX VIVO</i> DE CTPHS DO SCUP .....	125
5.6.1	Expansão em ambiente 2D.....	125
5.6.2	Expansão em ambiente 3D.....	141
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>155</b>
6.1	CONCLUSÕES .....	155
6.2	RECOMENDAÇÕES .....	156
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>159</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>191</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas (CTPHs) é a única terapia celular com células-tronco largamente utilizada e plenamente estabelecida na clínica como tal, contando com mais de quatro décadas de existência (NARDI; ALFONSO, 2006; STORB, 2012).

Entretanto, o encontro de um doador que atenda plenamente às condições para o transplante representa um dos maiores fatores limitantes no uso desta terapia que pode ser empregada em um amplo espectro de doenças hematológicas ou não. Atualmente, 70% de todos os pacientes que necessitam de um doador de CTPHs não obtém sucesso nessa busca entre os seus aparentados (INCA, 2013).

Portanto, o emprego a mais de duas décadas do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) como fonte de CTPHs para transplantes veio contribuir consideravelmente para a superação desta limitação (GLUCKMAN *et al.*, 2011; NMDP, 2010).

O SCUP apresenta importantes vantagens como fonte de CTPHs, tais como a facilidade de obtenção, a ausência de riscos para o doador, a menor estringência na paridade do antígeno leucocitário humano (HLA) e a disponibilidade de uso imediato de unidades totalmente testadas e HLA tipadas. Por outro lado, possui como principais desvantagens a demora na pega do enxerto e uma taxa maior de insucessos, ambas decorrentes, em parte, da sua maior limitação, a baixa dose celular obtida em função do seu volume limitado. Tal aspecto restringe não somente o uso desta fonte de CTPHs como também acarreta considerável desperdício no armazenamento final das unidades inicialmente coletadas (NCBP, 2010; NHS, 2012).

Sabendo-se que a dose celular é o principal fator de risco associado com a demora e/ou falha na pega do enxerto, é lógico inferir que aumentando-se esta dose, reduz-se o tempo para reconstituição de neutrófilos e plaquetas, assim como a possibilidade de falha na pega do mesmo (GLUCKMAN, E *et al.*, 2011). Soma-se a isso, que tais doses são difíceis de serem alcançadas, sobretudo para pacientes acima de 45kg (ROBINSON *et al.*, 2011). Portanto, a pesquisa e desenvolvimento de estratégias que possam contribuir para atingir a dose celular necessária, como o estabelecimento de critérios para a seleção e o armazenamento das unidades de SCUP (SOLVES *et al.*, 2004) ou a expansão *ex vivo* de CTPHs do mesmo são de relevância para o sucesso do transplante (EMOND *et al.*, 2012).

Por outro lado, o índice de descarte de unidades de SCUP coletadas por não atenderem aos critérios para o armazenamento poderia ser consideravelmente reduzido com a mudança no enfoque para o estabelecimento dos mesmos, principalmente em função da possibilidade de expansão *ex vivo* de unidades que não atingiram os critérios atualmente vigentes em cada serviço (QUEROL *et al.*, 2009). Esse estudo, utilizando os dados do banco de SCUP de Barcelona como modelo, refere que a redução no critério do número total de células nucleadas por unidade de SCUP de  $9 \times 10^8$  para  $5 \times 10^8$  células para atender pacientes até 55kg, reduziria de 45% para 14% o percentual de unidades descartadas. Para atender estes critérios, seria necessária uma expansão *ex vivo*, em termos matemáticos, de apenas duas vezes (CSASZAR *et al.*, 2013). Esse exemplo ilustra a importância econômica e clínica que pode representar o sucesso na expansão *ex vivo* de CTPHs.

A hematopoiese *in vivo* envolve processos complexos como a autorrenovação, proliferação e diferenciação das CTPHs, que são regulados, em grande parte pelo microambiente onde elas residem. Um componente essencial do microambiente hematopoiético são as células de suporte presentes no mesmo como as células-tronco mesenquimais (CTMs) (CALVI; LINK, 2014). O emprego de CTMs para a expansão *ex vivo* de CTPHs demonstrou contribuir para tal objetivo preservando e expandindo progenitores hematopoiéticos mais primitivos, possivelmente pela reconstituição de parte desse microambiente (WAGNER *et al.*, 2007). As CTMs têm sido as células mais comumente empregadas sendo obtidas de diferentes fontes, dentre elas a placenta e dentro desta de diferentes locais (SONCINI *et al.*, 2007). A placenta como fonte de CTMs apresenta diversas vantagens especialmente, a facilidade de obtenção, a ausência de riscos para a doadora, a abundância de material e a raridade ou inexistência de conflitos éticos (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

Sabe-se que as citocinas desempenham um papel importante na hematopoiese atuando na proliferação, diferenciação e autorrenovação das CTPHs (BALLMAIER; GERMESHAUSEN, 2009; GILLILAND; GRIFFIN, 2002; LEARY *et al.*, 1992; METCALF, 2008; OGAWA, MINETARO *et al.*, 1991), entretanto as pesquisas quanto à produção de citocinas pelas CTMs da placenta não têm se direcionado para o conjunto de citocinas de interesse hematopoiético. Além disso, algumas delas não são claras quanto a obtenção das CTMs, especialmente quando se referem a membrana coriônica (MC) e ao vilão (CAVALLO *et al.*, 2011; HAYASHI *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2009, 2010;



KANEMATSU *et al.*, 2011; OSTANIN *et al.*, 2011; POLONI *et al.*, 2012; ROELEN *et al.*, 2009).

Tomados em conjunto, os estudos não contemplam a expressão de citocinas de interesse hematopoiético na MC e no viló, especialmente as que atuam nos estágios precoces da hematopoiese como o fator de célula tronco (SCF), o ligante do Flt3 (Flt3-L), a trombopoietina (TPO) e a interleucina 6 (IL6) (LEVAC *et al.*, 2005; MURRAY, L. J. *et al.*, 1999), no *homing* das CTPHs, como o fator estromal 1 (SDF1) (DAR *et al.*, 2006), ou potencializando estas, como a interleucina 16 (IL16) (ROFANI *et al.*, 2009). Somente um trabalho foi localizado avaliando a IL16 e não deixa claro se para obter as CTMs do viló foi removida ou não a MC (ABUMAREE *et al.*, 2013).

As CTMs da MC e do viló apresentam características que podem ser importantes em relação à hematopoiese. A análise da ultraestrutura das CTMs da MC revelou que as mesmas são primitivas e metabolicamente quiescentes (PASQUINELLI *et al.*, 2007). Além disso, formam colônias lembrando as células-tronco embrionárias (CAVALLO *et al.*, 2011). Por sua vez, tem sido proposta a existência de nichos hematopoiéticos na região das vilosidades (DZIERZAK; ROBIN, 2010; ROBIN *et al.*, 2009). Adicionalmente, progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> foram encontrados na MC e no viló durante todo o período gestacional, sendo a MC mais rica nestes progenitores durante as primeiras 5 semanas (BÁRCENA *et al.*, 2011). Somam-se as estes trabalhos pesquisas anteriores realizadas em animais em que a placenta demonstrou ser um órgão hematopoiético (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2008).

Diante dessa abordagem e considerando que: 1) somente 30% dos pacientes que necessitam de transplante de CTPHs encontram um doador aparentado; 2) o SCUP apresenta diversas vantagens como fonte de CTPHs; 3) o maior fator limitante no seu uso é imposto pelo número de CTPHs obtidas por unidade doada; 4) estratégias como o transplante de mais de uma unidade, embora tenham contribuído, envolvem aspectos econômicos e clínicos que não permitiram solucionar tal limitação; 5) a drenagem raríssimamente justificável de potenciais doadores de SCUP para bancos privados, que agrava ainda mais a deficiência de unidades de SCUP, já comprometida pelo descarte das que não atingem os critérios necessários para armazenamento, fazem da expansão *ex vivo* de CTPHs uma abordagem de importância econômica e clínica.

Face o exposto acima, este trabalho visou avaliar a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP em co-cultivo com CTMs da MC e do viló em

ambiente bidimensional (2D) e tridimensional (3D), assim como investigar a associação entre fatores materno-fetais e parâmetros qualitativos do SCUP que pudessem contribuir para a seleção de amostras com uma melhor taxa de expansão ou conteúdo hematopoiético para transplantes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a expansão *ex vivo* de células tronco/progenitoras hematopoiéticas obtidas de sangue de cordão umbilical e placentário de neonatos a termo, em sistema de co-cultivo bidimensional e tridimensional com células-tronco mesenquimais.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Caracterizar morfológica e fenotipicamente as CTM obtidas do viló e da membrana coriônica;

Investigar a expressão gênica das citocinas hematopoiéticas (SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1) em células-tronco mesenquimais obtidas da membrana coriônica e do viló de placentas humanas, nas passagens P1, P5 e P10, por PCR em tempo real (qPCR);

Comparar a expressão das citocinas hematopoiéticas (SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1) pelas CTMs do viló e da membrana coriônica;

Correlacionar os fatores materno-fetais com parâmetros hematológicos qualitativos do SCUP ou estes com os próprios dados do SCUP que possam contribuir para seleção de amostras mais adequadas para expansão e transplante das mesmas;

Avaliar a expansão *ex vivo* de CTPHs obtidas de SCUP de neonatos a termo, em sistema de co-cultivo 2D com CTMs obtidas do viló e da membrana coriônica;

Avaliar a expansão *ex vivo* de CTPHs obtidas de SCUP de neonatos a termo, em sistema de co-cultivo 3D com membrana de colágeno bovino (Integra®), com as CTMs obtidas do viló e da membrana coriônica.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

O anseio pelo incremento na longevidade tem acompanhado o ser humano ao longo de milhares de anos (HAYFLICK, 1996), entretanto na contraposição deste intuito tem enfrentado inúmeras patologias das quais muitas delas podem ser tratadas por meio de transplantes de órgãos, tecidos ou células.

No ano de 2010 foram registrados 643.956 transplantes no mundo (MATESANZ, 2011) dos quais, 44.471(6,91%) foram realizados no Brasil (ABTO, 2010).

Uma parcela destes transplantes tem sido realizada utilizando células-tronco/progenitoras hematopoiéticas. O transplante de CTPHs se caracteriza pelo enxerto de CTPHs obtidas de um doador compatível em um receptor buscando, na maioria das vezes, corrigir um defeito qualitativo ou quantitativo na medula óssea (PASQUINI, 2005). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2013a), anualmente são realizados mais de 50.000 transplantes utilizando CTPHs para doenças hematológicas neoplásicas ou não. Estas poderiam ser curadas em mais de 90% dos casos se diagnosticadas precocemente e houvesse um doador que atendesse plenamente as necessidades para o transplante (WHO, 2013a).

Para o transplante o doador de CTPHs pode ser o próprio receptor (transplante autólogo) ou outro indivíduo (transplante alogênico) aparentado (se for gêmeo idêntico, dito singênico) ou não (PASQUINI, 2005). Entretanto, para o transplante alogênico há dificuldade na obtenção de doadores compatíveis, pois entre os aparentados, onde há maior probabilidade de localizá-los, a cobertura é de 30% das necessidades sendo que para os outros 70% é necessário identificar um doador não aparentado. Nestes as chances de sucesso na obtenção, dependendo da etnia, são de 1 em 500 mil (WHO, 2013a). No Brasil, a chance de encontrar um doador não aparentado é uma em 100 mil (INCA, 2013). Estes aspectos são agravados pela contínua redução na taxa de fecundidade e pelo aumento no índice de envelhecimento da população (FUCHS *et al.*, 2013).

A taxa de fecundidade que era de 5,8 filhos por mulher no Brasil em 1970 (IBGE, 2005), um ano após o primeiro transplante de medula óssea (TMO) alogênico no mundo, reduziu para 1,9 filhos em 2010 (IBGE, 2011), diminuindo assim a possibilidade de encontrar um doador aparentado. Por outro lado o índice de envelhecimento (número de pessoas com 65 anos ou mais para cada 100 pessoas de zero a 14 anos)

passou de 7,5% para 19,8% no período de 1970 a 2000 (IBGE, 2007), aumentando a possibilidade de ocorrer restrições clínicas para a doação.

A cobertura de doadores de CTPHs para transplantes alogênicos não-aparentados no mundo envolve em 40% dos casos um doador estrangeiro (WHO, 2013b). No Brasil a estatística é semelhante. A cobertura de doadores é de aproximadamente 70% dos casos de transplantes que envolvem doadores não aparentados, sendo 60% oriunda de doadores brasileiros e 40% de doadores estrangeiros (INCA, 2013). Entretanto, 30% dos pacientes que não encontram um doador aparentado também, até o momento, não conseguem um não aparentado, demonstrando a necessidade do incremento do banco de doadores de CTPHs.

As dificuldades no encontro de um doador compatível passaram então a ser amenizadas quando, há pouco mais de duas décadas, o SCUP se tornou uma nova alternativa para os pacientes que aguardavam nas filas de espera por um transplante de CTPHs (GLUCKMAN, E *et al.*, 1989).

### **3.1 HISTÓRICO E APLICAÇÕES DO TRANSPLANTE DE CTPHs**

Nas últimas décadas o transplante de CTPHs tem sido utilizado no tratamento de mais de 70 doenças como leucemias, linfomas, imunodeficiências, talassemias, anemia aplástica severa, alguns tumores sólidos como, por exemplo, o câncer de mama e o de células germinativas, doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide e Crohn, diabetes tipo I, doenças oftalmológicas como a degeneração macular relacionada à idade e doenças metabólicas hereditárias (GRATWOHL *et al.*, 2010; HALLER *et al.*, 2008, 2013; HOMMES *et al.*, 2011; PASQUINI, 2005; PRASAD; KURTZBERG, 2009; PRASAD *et al.*, 2008; WULFFRAAT *et al.*, 2003; YODOI *et al.*, 2007). Entre essas aplicações, as doenças linfoproliferativas e as leucemias representam os grupos de doenças mais frequentemente tratados pelo transplante de CTPHs autólogo e alogênico respectivamente (GRATWOHL *et al.*, 2013).

**Tabela 1.** Transplantes de CTPHs realizados no mundo quanto ao tipo de doador e patologia, abrangendo 72 países nos cinco continentes, no período de 2006 a 2008.

	AUTÓLOGO		ALOGÊNICO		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
<b>LEUCEMIAS</b>	4648	3,2	47677	32,5	52325	35,7
<b>DLP</b>	67391	46,0	9844	6,7	77235	52,7
<b>DNN</b>	705	0,5	7821	5,3	8526	5,8
<b>TS</b>	7659	5,2	399	0,2	8058	5,4
<b>OUTRAS</b>	179	0,1	485	0,3	664	0,4
<b>TOTAL</b>	80582	55,0	66226	45,0	146808	100

DLP= desordens linfoproliferativas; DNN= doenças não neoplásicas; TS= tumores sólidos. N= número de transplantes realizados. Os valores percentuais são relativos ao total de transplantes realizados. Adaptada de (GRATWOHL *et al.*, 2013).

A estimativa mundial do número de casos novos e de mortes por leucemias, linfomas e mieloma múltiplo para 2008 (últimos dados disponibilizados) era de 877.610 casos e 551.115 mortes, (WHO, 2008). As estimativas brasileiras para o ano de 2012 e válidas para 2013, são de 21.020 casos novos de leucemias e linfomas (INCA, 2011). Para muitos desses casos novos a esperança de cura reside no transplante de CTPHs.

O emprego de CTPHs teve início com o TMO, sendo que os primeiros foram realizados em 1956 pelo médico imunologista e pesquisador norte-americano Edward Donnall Thomas e sua equipe, incluindo pacientes com leucemias mielóide e linfóide crônicas, câncer de pulmão e ovário e mieloma múltiplo (THOMAS *et al.*, 1957). Entretanto, o primeiro TMO, nos moldes que é realizado hoje e que obteve sucesso, foi procedido em 1969 pelo mesmo pesquisador e sua equipe na cidade de *Seattle* (BUCKNER *et al.*, 1970), utilizando CTPHs de um doador aparentado em um paciente com leucemia granulocítica crônica (leucemia mielóide crônica). Alguns dos primeiros pacientes transplantados por este pesquisador na década de 70 permaneciam vivos até 2012 (STORB, 2012).

Desde o primeiro transplante de CTPHs, mais de um milhão de pacientes se beneficiaram deste tipo de tratamento (STORB, 2012) e

mais de 21 milhões de doadores estão cadastrados nos bancos em todo o mundo (BMDW, 2013). Registros específicos do ano de 2010, abrangendo 44 países, relataram 51.613 transplantes utilizando CTPHs (ABTO, 2010; BENTLEY; HANSON, 2011; MATESANZ, 2011), dos quais 1.581 (3,06%) foram realizados no Brasil (ABTO, 2010).

No Brasil, o primeiro transplante utilizando CTPHs foi um TMO realizado pelo médico hematologista Ricardo Pasquini, em 1979, na cidade de Curitiba (FERREIRA *et al.*, 1985). Dados abrangendo o período de outubro de 2002 a dezembro de 2012 relatam 15.545 TMOs (ABTO, 2012). Por sua vez, o registro de doadores em nosso país conta com mais de 2,9 milhões de cadastros sendo o terceiro maior banco de doadores do mundo, após os Estados Unidos da América (EUA) e a Alemanha (BMDW, 2013).

Os ensaios desenvolvidos *in vitro* em 1974 (KNUDTZON, 1974) demonstrando a formação de colônias de granulócitos nas culturas de células nucleadas do SCUP, foram a primeira evidência da presença de precursores hematopoiéticos no mesmo. Posteriormente, a demonstração, por meio do ensaio de formação de colônias/ensaios clonogênicos, que o SCUP possuía CTPHs suficientes para reconstituir a hematopoiese (BROXMEYER *et al.*, 1989), foi decisivo para a utilização do mesmo em transplantes (GLUCKMAN, E *et al.*, 2011). Assim, o primeiro transplante utilizando CTPHs do SCUP foi realizado em 6 de outubro de 1988, pela médica hematologista francesa Eliane Gluckman e sua equipe, em uma criança com anemia de Fanconi, na cidade de Paris (GLUCKMAN, E *et al.*, 1989). Neste transplante foram utilizadas CTPHs do SCUP de uma irmã com fenotipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) idêntica.

A partir de então, começaram a surgir os Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) para o armazenamento de unidades deste material. Atualmente, existem no mundo mais de 300 BSCUP públicos nos quais encontram-se armazenadas mais de 620 mil unidades de SCUP (BMDW, 2013).

Entretanto, mais de uma década transcorreu-se após o primeiro transplante até a instalação do primeiro BSCUP no Brasil, em 2001 no Instituto Nacional do Câncer (INCA) e do primeiro transplante em 2004 (BOUZAS, 2010). Até 5 julho de 2013, 15.345 unidades de SCUP estavam armazenadas nos 12 BSCUP públicos que se encontram em atividade na Rede Brasilcord (INCA, 2013).

Anualmente mais de 2000 transplantes com CTPHs de SCUP são realizados no mundo (WHO, 2013a) e, desde o primeiro até o ano de 2011, mais de 20 mil foram realizados (PASQUINI; WANG, 2012). No



Brasil, até julho de 2013 foram realizados 163 transplantes (INCA, 2013). Assim, a utilização de SCUP vem contribuindo para o crescimento do transplante de CTPHs como opção terapêutica.

Dados mundiais demonstram que o número de transplantes de CTPHs aumentou 10% no período de 2006 a 2008 (GRATWOHL *et al.*, 2013). O aumento relativo foi maior no transplante alogênico (17%) do que no autólogo (5%), sendo que no primeiro os maiores incrementos foram no tratamento de leucemias (20%) e doenças não neoplásicas (26%) e no segundo foi no tratamento das doenças linfoproliferativas (8%). A maior redução (15%) foi observada no uso do tratamento autólogo para as leucemias em geral, enquanto que no transplante alogênico a maior redução (17%) foi para o tratamento da leucemia mielóide crônica (GRATWOHL *et al.*, 2013).

Dados de 2006, compreendendo 71 países, demonstraram que o linfoma não-Hodgkin foi a patologia tratada com maior frequência (19,4%) pelo transplante de CTPHs e, quanto ao tipo de transplante, a de maior frequência (27,5%) pelo autólogo enquanto que a leucemia mielóide aguda foi a de maior frequência pelo alogênico, representando 32,7% destes transplantes (GRATWOHL *et al.*, 2010). A mesma pesquisa relata as falhas da medula óssea e o neuroblastoma como as condições clínicas tratadas com maior frequência pelo transplante de CTPHs dentro dos grupos de doenças não neoplásicas e tumores sólidos respectivamente.

Segundo o Centro para a Pesquisa Internacional de Transplante de Sangue e Medula (CIBMTR) (PASQUINI; WANG, 2012), o mieloma múltiplo, o linfoma não-Hodgkin e a leucemia mielóide aguda foram as doenças (em ordem decrescente) com maior número de transplantes de CTPHs durante o ano de 2010 nos EUA, com predomínio do autólogo nas duas primeiras e o do alogênico na terceira.

No Brasil, no período 2006 a 2008, o crescimento no número de transplantes de CTPHs foi de 5,2% (ABTO, 2012). Dados de 2012 referem 1.753 transplantes, sendo 1.123 (64,1%) autólogos e 630 (35,9%) alogênicos e, dos primeiros, 72 (4,1%) foram realizados no Estado de Santa Catarina (ABTO, 2012).

O crescimento no número de transplantes vem sendo acompanhado por mudanças nas fontes de onde as CTPHs podem ser obtidas. Por mais de 40 anos o TMO foi utilizado como sinônimo do transplante de CTPHs em função da medula óssea ser classicamente a fonte das mesmas (NIH, 2011). No entanto dados do Programa Nacional de Doadores de Medula Óssea (NMDP) dos Estados Unidos da América (EUA) referentes ao biênio 2008-2009, mostraram que o SCUP foi a

fonte de CTPHs para 46% dos transplantes não aparentados em pacientes menores de 21 anos, sendo que para os outros 54% foram utilizados a medula óssea ou o sangue periférico (PASQUINI; WANG, 2012). Além disso, o SCUP foi utilizado em 11% dos pacientes maiores de 21 anos no mesmo período e em 20% de todos os transplantes não aparentados em 2011, sendo outros 20% a medula óssea e 60% o sangue periférico (FUCHS *et al.*, 2013).

### 3.2 FONTES DE CTPHs PARA TRANSPLANTE

Como descrito anteriormente têm ocorrido modificações na frequência de uso das diferentes fontes de CTPHs (medula óssea, sangue periférico e SCUP) em transplantes, em parte devido às características particulares de cada fonte e das próprias CTPHs nelas contidas.

A célula-tronco hematopoiética pode ser definida como uma célula isolada da medula óssea, do sangue periférico ou do SCUP, com capacidade de se autorrenovar e diferenciar em todas as células sanguíneas especializadas, que pode se mobilizar da medula para o sangue, assim como pode se submeter a apoptose (NARDI, NANCE BAYER; ALFONSO, 2006; NIH, 2011). Embora as CTPHs da MO, sangue periférico e do SCUP sejam definidas como células tronco adultas, diferenças têm sido observadas entre as mesmas (KANJI *et al.*, 2011).

Doulatov e colaboradores (2010), investigaram diferentes subpopulações de CTPHs na medula óssea e SCUP humanos (DOULATOV *et al.*, 2010). A subpopulação do progenitor mielóide comum ( $CD34^+CD38^+Thy-1^-CD45RA^-Flt3^+CD7^-CD10^-$ ) do SCUP possui potencial de proliferação em recultivos seriados *in vitro*, o que não ocorre com a mesma subpopulação da medula óssea. Além disso, os progenitores de granulócitos e monócitos ( $CD34^+CD38^+Thy-1^-CD45RA^+Flt3^+CD7^-CD10^-$ ) do SCUP apresentavam elevado potencial para células linfóides T em comparação com as da medula óssea, assim como o potencial de proliferação dos progenitores multipotentes linfóides ( $CD34^+CD38^+Thy-1^{neg/low}CD45RA^-Flt3^+CD7^-CD10^+$ ) do SCUP foi maior que nos da medula óssea. A constatação da existência dos progenitores multipotentes linfóides  $CD7^+$  ( $CD34^+CD38^+Thy-1^{neg/low}CD45RA^+Flt3^+CD7^+CD10^+$ ) somente no SCUP foi outro dado desta pesquisa. Outra informação de relevância para o estudo das CTPHs advinda da mesma pesquisa, foi que a segregação mielóide / linfóide não é tão rígida quanto entendida até então, uma vez que

progenitores multipotentes linfoides ( $CD34^+CD38^-Thy-1^{neg/low}CD45RA^-Flt3^+CD7^-CD10^+$  ou  $CD7^+$ ) apresentaram o potencial de gerar células da linhagem mielóide como os monócitos ( $CD14^+CD11b^+$ ), macrófagos ( $CD14^+CD11c^+CD1a^-$ ) e as células dendríticas mielóides ( $CD14^+CD11c^+CD1a^+$ ).

Diferenças no comprimento do telômero entre CTPHs do SCUP, da medula óssea e do sangue periférico foram observadas, sendo mais longo nas primeiras que nas da medula óssea (VAZIRI *et al.*, 1994) e do sangue periférico (HILLS *et al.*, 2009), evidenciando uma vida média proliferativa maior e, conseqüentemente, maior potencial de sustento da hematopoiese pelas CTPHs do SCUP. Ambas as pesquisas demonstraram que os precursores mais jovens possuem telômero mais longo que precursores mais diferenciados. Além disso, quando comparada à capacidade de autorrenovação, células  $CD34^+CD38^-$  do SCUP geraram maior número de células, após cultura inicial, com capacidade de reiniciar culturas de longo prazo, que as da medula óssea e do sangue periférico (THEUNISSEN; VERFAILLIE, 2005).

A capacidade de proliferação de CTPHs do SCUP e da medula óssea foi avaliada *in vitro* pela cinética da divisão celular (SILVA, CLÁUDIA LOBATO DA *et al.*, 2009). As do SCUP iniciaram a divisão celular mais precocemente (24h), apresentaram maior percentagem de células submetidas a mitoses e maior número de gerações durante a cultura. No segundo dia de cultura 36,6% das células do SCUP estavam na segunda geração enquanto 7% das da medula óssea haviam alcançado tal condição. No décimo dia de cultura todas as CTPHs do SCUP haviam se submetido às divisões celulares e 56% delas estavam na nona geração. Por sua vez, menos de 5% das CTPHs da medula óssea haviam atingido a oitava geração.

Outras pesquisas demonstraram diferenças no percentual de células  $CD34^+$  quiescentes (SCUP 97,5% e medula óssea 88,6%) (TRAYCOFF *et al.*, 1994), na expressão de genes como o Gata-2 e jun-B, relacionados à inibição da diferenciação, os quais foram expressos 3,5 vezes e 5,3 vezes mais no SCUP que na medula óssea (NG *et al.*, 2004) e na resposta a fatores de crescimento, sendo mais intensa pelas CTPHs do SCUP que pelas da medula óssea (WEEKX *et al.*, 1998).

Além das diferenças próprias das CTPHs de cada fonte, outros aspectos envolvendo a facilidade, riscos e agilidade na obtenção das CTPHs, custos, grau de estringência na paridade do HLA, dose celular que pode ser obtida, possibilidade de transmissão de doenças, possibilidade de segundo transplante, constroem o espectro de características de cada fonte. Estas características juntamente com

aspectos relacionados ao receptor, como a existência de doador aparentado HLA-idêntico, tipo e estatus da patologia, urgência do transplante, idade e peso do mesmo, contribuem para a escolha da fonte de CTPHs (NCBP, 2010; PELOSI *et al.*, 2012).

O emprego de CTPHs do SCUP apresenta diversas vantagens em relação à ao sangue periférico e a medula óssea como: facilidade de obtenção, pois demanda apenas uma punção no cordão umbilical antes ou após a dequitação da placenta, enquanto que para a coleta de medula óssea há necessidade de procedimento invasivo (punção na crista ilíaca) sob anestesia geral, com permanência de 12 a 24 h em hospital e habitualmente 4 a 5 dias adicionais de repouso, além de estar sujeito aos efeitos colaterais do procedimento anestésico e ao desconforto no local da punção (NHS, 2012). Por sua vez, a coleta a partir do sangue periférico exige a submissão do doador ao procedimento de leucoaférese, com mobilização prévia das CTPHs da medula para o sangue periférico mediante uso de fármacos como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), geralmente por 4 dias, seguido da coleta no quinto dia (NHS, 2012). Como efeitos colaterais comuns têm-se a cefaleia, cansaço, dor muscular e óssea, os quais cessam com o término do tratamento. Em consequência, a obtenção de CTPHs a partir do SCUP acarreta menor custo e com ausência de risco para a mãe e doador quando coletado após dequitação da placenta (NCBP, 2010).

Outra vantagem do SCUP refere-se a menor possibilidade de transmissão de infecções virais latentes, especialmente a citomegalovirose que apresenta frequência maior que 50% em doadores adultos e menor que 1% no SCUP (NCBP, 2010). Além disso, o armazenamento de unidades de SCUP totalmente testadas e HLA tipadas, permite a disponibilização do mesmo para uso, após a verificação da compatibilidade, em poucos dias ou em até 24 h em casos de emergência, o que pode representar uma redução de um até mais de dois meses na espera para o transplante. Isso tudo, sem a exigência de novos exames para averiguar o estado clínico do doador e da rigorosa coordenação na logística doação e transplante, como ocorre no caso da medula óssea e em menor grau com o sangue periférico (NCBP, 2010; PETROPOULOU; ROCHA, VANDERSON, 2011).

A menor frequência e gravidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a não exigência de total paridade na tipagem HLA, admitindo tolerância para disparidade de até 3/6 genes, representam outras vantagens para o emprego do SCUP como fonte de CTPH em transplantes (BARKER, 2002; WAGNER, 2002; BARKER *et*

*al.*, 2010; DELANEY; BALLEEN, 2010; GLUCKMAN *et al.*, 2011; ROCHA; LOCATELLI, 2008; ROCHA, 2001).

Não tem sido observadas diferenças estatisticamente significantes na incidência de DECH aguda e crônica entre pacientes que receberam transplantes de SCUP ou da medula óssea, ainda que houvesse grande disparidade no HLA doador/receptor (3/6) com o SCUP e paridade total (6/6) para aqueles que receberam medula óssea (BARKER, 2001). Nesta pesquisa os pacientes que receberam CTPHs da medula óssea foram distribuídos em dois grupos com base no uso do metotrexato (MO-MTX) ou depleção de células T. Cada grupo que recebeu medula óssea foi pareado com pacientes que receberam CTPHs do SCUP. A frequência de DECH aguda e crônica para os pacientes que receberam SCUP foi de 45% e 36% e para os que receberam medula óssea foi de 35% em ambos os grupos (MO-MTX ou depleção de células T). Quanto a frequência da DECH crônica, após 1 ano, foi de aproximadamente 6% com o SCUP e 20% e 13% com a medula óssea nos grupos MO-MTX ou depleção de células T respectivamente.

Outra pesquisa com pacientes que realizaram transplante de CTPHs na Universidade de *Minnesota*-EUA, no período de 1993 a 2004 obteve frequências da DECH crônica de 17% e 25%, para SCUP e medula óssea, respectivamente, sendo que a maioria dos transplantes de SCUP (62%) foram realizadas com paridade 4/6 do HLA, *versus* a maioria dos de medula óssea (67%) com paridade 6/6 (ARORA *et al.*, 2007).

Foi realizada uma análise retrospectiva da frequência de DECH aguda e crônica com dados de 216 centros de transplantes do mundo envolvendo 880 transplantes para pacientes com leucemia mielóide aguda e 645 para leucemia linfóide aguda, realizados nos anos de 2002 a 2006, utilizando CTPHs do SCUP, da medula óssea e do sangue periférico (EAPEN *et al.*, 2010). As frequências obtidas foram de 30,2%, 40,9% e 49,3% para a DECH aguda e 24,2%, 32,4% e 49,5% para a DECH crônica, para transplantes com o SCUP, a medula óssea e o sangue periférico respectivamente.

O estado de células virgens no repertório de células T do SCUP demonstra a falta de estimulação antigênica das mesmas, sendo esta a principal diferença com o repertório de células T no adulto, sendo esta uma possível explicação para a menor frequência e gravidade da DECH nos transplantes onde é utilizado o SCUP como fonte de CTPHs. (GARDERET *et al.*, 1998; ORAN; SHPALL, 2012).

Se por um lado o uso do SCUP como fonte de CTPHs apresenta vantagens como as acima descritas, por outro incorre em desvantagens

como impossibilidade de uma segunda coleta e a possibilidade de transmitir alguma doença genética ainda não manifestada ou detectada (NCBP, 2010). Além disso, o transplante com CTPHs do SCUP tem demonstrado tempo mais prolongado para a pega do enxerto (quando a contagem absoluta de neutrófilos alcança 500 / $\mu$ L e se mantém por 3 dias consecutivos e das plaquetas alcança 20 mil / $\mu$ L e se mantém por 7 dias, sem transfusões) e maior índice de falhas na pega do mesmo, definida pela não recuperação dos neutrófilos até 42 dias após o transplante (GLUCKMAN *et al.*, 2004; LAUGHLIN *et al.*, 2004).

O tempo para pega do enxerto com SCUP foi maior do que com a medula óssea e com esta foi maior do que com o sangue periférico (EAPEN *et al.*, 2010). Esta pesquisa constatou tempos médios para a recuperação dos neutrófilos e plaquetas de 14 e 19 dias, 19 e 28 dias e 24 e 52 dias para os transplantes com CTPHs do sangue periférico, medula óssea e SCUP respectivamente. Por sua vez o índice de falhas na pega do enxerto foi de 4%, 8% e 20% para os transplantes com CTPHs do sangue periférico (paridade total), da medula óssea (paridade total) e do SCUP (paridade 4-6/6).

Outro aspecto negativo do SCUP como fonte de CTPHs refere-se ao número reduzido de CTPHs em decorrência do volume limitado (WAGNER *et al.*, 2002).

A dose celular utilizada por kg de peso do receptor representa um dos mais importantes preditores do tempo para pega do enxerto e sucesso na reconstituição hematopoiética do transplantado, tornando-se, conseqüentemente, o principal fator limitante no emprego do SCUP como fonte de CTPHs em transplantes (GLUCKMAN *et al.*, 1997; SCARADAVOU *et al.*, 2013; WAGNER, *et al.*, 2002).

De forma geral a dose celular mínima recomendada por kg de peso do receptor é de  $3,7 \times 10^7$  células nucleadas e  $2 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup> (BARKER *et al.*, 2010; RUBINSTEIN *et al.*, 1998; WAGNER *et al.*, 2002). Entretanto, foi demonstrado que a dose celular necessária é dependente do grau de paridade entre o HLA do doador e receptor, devendo ser maior do que  $2,5 \times 10^7$  células nucleadas quando a paridade do HLA for 5/6 e, maior do que  $5,0 \times 10^7$  células nucleadas quando a paridade do HLA for 4/6 (BARKER *et al.*, 2010). O mesmo estudo não relata a dose mínima recomendada quando a paridade do HLA é 6/6, concluindo que os melhores resultados no transplante foram obtidos nesta condição independente da dose celular infundida. Contudo, tais doses são difíceis de serem alcançadas, principalmente para pacientes acima de 45kg (ROBINSON *et al.*, 2011). Tanto que se fosse estender o uso das unidades de SCUP armazenadas no banco de SCUP de

Barcelona para pacientes com peso corporal de 55kg, com base numa dose de  $2,5 \times 10^7$  células por kg de peso do receptor, 45% das unidades coletadas naquele banco não poderiam ser utilizadas (QUEROL, SERGIO *et al.*, 2009).

Por conseguinte, superar a limitação do número de CTPHs no SCUP tornou-se o objetivo de considerável parcela das pesquisas relacionadas ao mesmo. Assim, na busca por doses celulares adequadas tem se utilizado de estratégias que envolvem desde o estabelecimento de critérios para a seleção e armazenamento das unidades de SCUP (WEN *et al.*, 2012), transplante duplo de unidades de SCUP (BRUNSTEIN, CLAUDIO G *et al.*, 2011) e a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP empregando diferentes condições e metodologias (RODRÍGUEZ-PARDO; VERNOT, 2013; YAO *et al.*, 2004).

### **3.3 ESTRATÉGIAS PARA SUPERAR AS LIMITAÇÕES NO USO DO SCUP COMO FONTE DE CTPHs**

#### **3.3.1 Fatores materno-fetais e obstétricos e o conteúdo do SCUP: contribuição para a seleção de unidades de SCUP a serem armazenadas**

A correlação entre fatores materno-fetais e obstétricos e o conteúdo das unidades de SCUP tem sido investigada visando a seleção e o armazenamento de unidades do mesmo que possam apresentar melhores condições para o sucesso dos transplantes (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013; HIETT *et al.*, 1995).

Nesse sentido, pesquisas têm demonstrado que a idade gestacional, o peso da placenta e o peso do recém-nascido (RN) influenciam positivamente o número total de células nucleadas por unidade de SCUP, enquanto que o total de células CD34<sup>+</sup> teve correlação positiva com o peso do RN e o peso materno (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013; SOLVES *et al.*, 2005). Nestas pesquisas, o peso do RN foi o preditor com maior significância estatística para o total de células nucleadas e de células CD34<sup>+</sup>. Por sua vez o volume total de SCUP obtido é influenciado positivamente pelo peso do RN, peso da placenta e idade gestacional (JONES *et al.*, 2003). Neonatos maiores provêm maior volume e, conseqüentemente, maior número de células (SOLVES *et al.*, 2005)

Fatores obstétricos como o tipo de parto, cesárea ou vaginal (SANTOS *et al.*, 2011), tempo de trabalho de parto, indução ou não e comprimento do cordão também influenciaram o volume de SCUP

obtido e o total de células nucleadas, (JONES *et al.*, 2003). O número total de células nucleadas foi significativamente maior quando o parto foi do tipo cesariana. O comprimento do cordão umbilical igual ou superior a 30 cm, o tempo de trabalho de parto acima 15 h e a indução do parto, foram associados com a obtenção de maior volume de SCUP.

Além do total de células nucleadas e de células CD34<sup>+</sup>, o potencial clonogênico é outro parâmetro do próprio SCUP que tem sido utilizado como preditor para a pega do enxerto de CTPHs do mesmo (PAGE *et al.*, 2011). Os resultados desta pesquisa demonstraram que o número total de unidades formadoras de colônias (UFC) foi o fator preditor mais potente pré e, especialmente, pós-congelamento para a pega de transplante alogênico não aparentado, superando inclusive o total de células nucleadas ou de células CD34<sup>+</sup>. Além disso, em outra pesquisa o potencial clonogênico, medido pelo total de UFC, se correlacionou positivamente com o peso do RN (SOLVES *et al.*, 2004).

Embora fatores materno-fetais possam contribuir para a seleção e armazenamento de unidades de SCUP que resultem em maiores possibilidades de sucesso quando transplantadas, *per si*, não possuem potencial para atender as necessidades decorrentes da dose celular baixa do SCUP (ALLAN *et al.*, 2013).

Estas limitações levaram a busca de alternativas como o transplante de mais de uma unidade de SCUP para os pacientes em que a dose celular não era alcançada com apenas uma unidade (AVERY; BARKER, 2010).

### 3.3.2 Transplante de mais de uma unidade de SCUP

O transplante de mais de uma unidade de SCUP tem sido empregado e a primeira pesquisa com resultados desse procedimento foi publicada em 2005 (BARKER *et al.*, 2005).

O fato de haver melhora no tempo de pega do enxerto e após esta, apenas uma progênie persistir, sugere que a CTPHs da unidade que não pegou o enxerto potencializaram a pega do enxerto da outra unidade de SCUP (GLUCKMAN, 2011). Entretanto, os resultados da literatura são discordantes quanto ao fator que determina qual unidade terá predominância. Um número maior de células CD3<sup>+</sup> foi associado com a unidade predominante enquanto que fatores como total de células nucleadas ou de CD34<sup>+</sup>, HLA, sexo do doador e grupo sanguíneo não demonstraram associação com a predominância de uma progênie (BARKER *et al.*, 2005). No entanto, estudo posterior realizado pelo mesmo grupo não encontrou associação com o número de células CD3<sup>+</sup>



(BRUNSTEIN *et al.*, 2007). O número total de colônias, o total de células nucleadas, o total de células CD34<sup>+</sup> e o total de células CD3<sup>+</sup> foram investigados recentemente e não foi encontrada qualquer associação com a dominância (SONG *et al.*, 2013).

Embora o transplante de duas unidades de SCUP tenha possibilitado o seu uso em pacientes adultos (SCARADAVOU *et al.*, 2013), esta prática apresenta algumas desvantagens em relação ao transplante de uma unidade. O risco de desenvolver a DECH foi maior em diversos estudos; 61% *versus* 41% (BRUNSTEIN *et al.*, 2007); 58% *versus* 39% (MACMILLAN *et al.*, 2009); e, 18% *versus* 14% (SCARADAVOU *et al.*, 2013).

Outra desvantagem do transplante de duas unidades é o custo. O transplante duplo custa por dia de sobrevida, medido nos primeiros 100 dias, 2.082 dólares enquanto que o transplante de uma unidade custa 1.156, sem considerar os valores relacionados às próprias unidades a serem transplantadas (MAJHAIL *et al.*, 2009).

Além disso, a demora no tempo para reconstituição dos neutrófilos continua elevada nos transplantes de duas unidades de SCUP quando comparada com o transplante de CTPHs do sangue periférico (SCARADAVOU *et al.*, 2013). Esta pesquisa recente, incluindo mais de 300 transplantes duplos realizados no mundo, demonstrou que a reconstituição de neutrófilos ocorreu 20 dias após o transplante e a de plaquetas após 55 dias. Quando utilizadas CTPHs do sangue periférico esses períodos de reconstituição foram de 11 dias para os neutrófilos e 13 dias para as plaquetas (ROBINSON *et al.*, 2011).

Estas limitações clínicas e econômicas do transplante de duas unidades, juntamente com os fatores limitantes relacionados ao transplante de SCUP primeiramente abordados, tem estimulado a pesquisa da expansão *ex vivo* das CTPHs do mesmo. Para isso, diferentes abordagens metodológicas tem sido utilizadas como as culturas em meio líquido suplementadas com quelantes de cobre (PELED, TONI *et al.*, 2004), ligantes do notch1 (DELANEY *et al.*, 2010), citocinas (YAO *et al.*, 2004) e co-culturas com células do microambiente hematopoiético em ambiente 2D (ZHANG *et al.*, 2006) e 3D (YUAN *et al.*, 2013).

### 3.3.3 Expansão ex vivo de CTPHs do SCUP

#### 3.3.3.1 Cultura com adição exógena de citocinas

A cultura em meio líquido para promover a expansão de CTPHs tem utilizado a suplementação exógena com diversas citocinas hematopoiéticas como o SCF, o Flt3-L, a TPO, a interleucina 3 (IL3), a IL6, a IL16, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e G-CSF (ANDRADE *et al.*, 2010; NORKIN *et al.*, 2013; ROFANI *et al.*, 2009; YAO *et al.*, 2004). O SCF, a TPO e o Flt3-L, citocinas que atuam nos estágios mais precoces da hematopoiese, têm sido as mais frequentemente utilizadas (ANDRADE *et al.*, 2010; NORKIN *et al.*, 2013).

Embora o mecanismo de ação do SCF não seja bem conhecido, esta citocina tem demonstrado estimular a autorrenovação de CTPHs, tanto que a adição de anticorpos monoclonais anti-SCF inibe completamente a proliferação de células CD34<sup>+</sup> mediada pelo mesmo (FAN, J. *et al.*, 2012). O receptor do SCF, CD117 ou C-Kit, é um receptor do tipo proteína tirosina quinase e a sinalização pelo mesmo envolve a proliferação e diferenciação nos tecidos onde está presente, como o hematopoiético (QIU *et al.*, 1988). O SCF reduz o tempo de permanência na fase G0 acelerando a entrada de progenitores hematopoiéticos no ciclo celular (LEARY *et al.*, 1992). Além disso, a intensidade do estímulo pelo SCF pode modular a capacidade de reconstituição hematopoiética de longo prazo, direcionando maior proporção de CTPHs quiescentes para autorrenovação quando o estímulo dado foi mais intenso (300 ng/mL), ou induzia a diferenciação quando estímulo foi menos intenso (10 ng/mL) (KENT *et al.*, 2008). Estes testes foram realizados *in vitro* e certificados *in vivo* com experimento de reconstituição hematopoiética pelo transplante em animais irradiados.

Experimentos realizados *in vivo* injetando anticorpo monoclonal anti-c-kit em camundongos, demonstraram que a inibição desta sinalização gerava pancitopenia severa (OGAWA *et al.*, 1991). Outro papel que o SCF pode estar envolvido é na migração das CTPHs para a sua localização final, visto que o mesmo é expresso nos diferentes sítios durante o desenvolvimento como o saco vitelino, fígado fetal e medula óssea (BROUDY, 1997).

A TPO (MATSUNAGA *et al.*, 1998), o Flt3-L (HANNUM *et al.*, 1994; MATSUNAGA *et al.*, 1998) e a IL6 (MATSUNAGA *et al.*, 1998) são outras citocinas que podem modular a autorrenovação e a

proliferação de CTPHs. Uma das vias de sinalização envolve a GP130 (HIRANO, TOSHIO *et al.*, 1998; KENT *et al.*, 2008; OHTANI *et al.*, 2000).

Células CD34<sup>+</sup> quando cultivadas em presença de TPO apresentaram hiperexpressão dos genes HOXB4, CBF $\beta$ , Runx1, Nfe-2, Gata-2, Fli-1, CD41b, CD42b, e CD61 e esta resposta, que se reflete na funcionalidade da TPO, parece estar associada à expressão do antígeno CD34<sup>+</sup> visto que a amplificação mediada pela mesma não ocorre quando utilizadas células CD34<sup>-</sup> (MANFREDINI *et al.*, 2005). Por sua vez, o gene OXB4 demonstrou ser um regulador chave na autorrenovação de CTPHs induzida pela TPO (KIRITO *et al.*, 2003) e a sua superexpressão inicia-se na transição de CD34<sup>-</sup> para CD34<sup>+</sup> (MANFREDINI *et al.*, 2005).

Em termos clínicos, indivíduos com mutações no receptor da TPO (c-Mpl) desenvolvem trombocitopenia amegacariocítica congênita (BALLMAIER; GERMESHAUSEN, 2009). Ocorre trombocitopenia precoce na infância, com redução não somente na linhagem megacariocítica mas progressivamente desenvolvem hipoplasia medular a qual culmina com pancitopenia e aplasia medular. Estes dados podem significar a participação da TPO na manutenção das demais linhagens sanguíneas.

O Flt3-L demonstrou estimular o crescimento tanto de progenitores hematopoiéticos primitivos como dos mais diferenciados, porém o seu estímulo que isoladamente é fraco, torna-se potente em sinergismo com outras citocinas ou fatores de crescimento como o SCF, a IL6, a IL3, o GM-CSF e G-CSF (RUSTEN *et al.*, 1996). O Flt3-L está envolvido também na manutenção do estado indiferenciado de progenitores hematopoiéticos (SOLANILLA *et al.*, 2000). A neutralização do Flt3-L em co-culturas de células CD34<sup>+</sup> com células endoteliais, as quais produzem e secretam esta citocina (SOLANILLA *et al.*, 2000), acelerou a diferenciação dos progenitores hematopoiéticos.

O receptor do FLT3 é do tipo tirosina quinase sendo expresso em progenitores hematopoiéticos primitivos (ROSNET *et al.*, 1996), o que é condizente com o seu papel como regulador nos estágios precoces da hematopoiese (GILLILAND; GRIFFIN, 2002)

O transplante da medula óssea de camundongos com deficiência de sinalização da IL6, por deficiência da gp130 levou ao retardo na pega do transplante com leucopenia, trombocitopenia e anemia nos animais transplantados em comparação com os controles, observado nas quatro primeiras semanas após o transplante (KROY *et al.*, 2012). A análise das populações leucocitárias neste período evidenciou severa redução

nas populações de linfócitos T e B. Estes dados revelam a importância da sinalização pela IL6 via GP130 para a pega do transplante e hematopoiese.

Quando utilizada para expansão *ex vivo* de CTPHs CD133<sup>+</sup> de SCUP, a IL6 isoladamente não demonstrou este potencial, porém o evidenciou de forma sinérgica com SCF, TPO, Flt3 e IL3 (BORDEAUX-REGO *et al.*, 2010). Esta mesma pesquisa em experimentos com diferentes combinações de citocinas e incluindo ou não a IL6 e a IL3, sugere um papel para a primeira mais direcionado para a manutenção do estado indiferenciado enquanto que a segunda estaria mais envolvida na expansão, concluindo que o uso de ambas é a condição que produz os melhores resultados na expansão de progenitores hematopoiéticos CD133<sup>+</sup>.

Camundongos deficientes em IL6 tiveram uma redução de 55% no número de progenitores na medula óssea, medido pelo número de UFC em cultura (KOPF *et al.*, 1995). Além disso, tiveram redução no número de linfócitos T de 30% a 50% e de 3 a 10 vezes na capacidade funcional dos mesmos *in vivo* medida pela resposta contra o vírus da vaccínia.

Por sua vez, a IL16 é outra citocina que demonstrou atividade sinérgica na expansão de CTPHs (ROFANI *et al.*, 2009). Esse estudo avaliou a ação da IL16 na expansão *ex vivo* de CTPHs CD34<sup>+</sup> do SCUP, combinando a sua adição em diferentes concentrações ou a não adição num coquetel de citocinas constituído pelo SCF, TPO, Flt3-L, IL6 e IL3. A IL16 atuou de forma sinérgica com as citocinas do coquetel sendo que sua adição ao mesmo causou um incremento de 1,83 vezes, 1,68 vezes e 1,93 vezes na expansão das células CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> e nas células iniciadoras de culturas de longo prazo respectivamente. A IL16 também gerou um aumento na percentagem de células CD34<sup>+</sup>, além de aprimorar a migração das mesmas para o SDF1 após a expansão *ex vivo* com as citocinas. Este incremento na expansão das diferentes populações e na percentagem de células CD34<sup>+</sup> foi dependente da concentração.

O SDF1 e seu principal receptor, o CXCR4, estão envolvidos no trânsito e *homing* das CTPHs, no recrutamento de leucócitos maduros e na proliferação de progenitores hematopoiéticos e mesenquimais (DAR *et al.*, 2006; KOLLET, O *et al.*, 2002)

A cultura com as citocinas SCF, Flt3-L, TPO e IL3 amplificou o número de células CD34<sup>+</sup> do SCUP em até 317 vezes (QIU *et al.*, 1999). Porém, expansão tão expressiva tem trazido preocupações quanto à degradação no telômero (KELLY, S. S. *et al.*, 2009), embora tenha sido

relatado efeito protetor de citocinas como o Flt3-L, a TPO e o SCF, mantendo o tamanho do mesmo por até 12 semanas em cultura (GAMMAITONI *et al.*, 2004).

Uma variação na abordagem envolvendo a cultura com a suplementação exógena de citocinas, se refere a adição de quelantes do cobre como o tetraetilenopentamina (TEPA) (LIMA *et al.*, 2008), visto que o conteúdo deste elemento químico demonstrou modular a autorrenovação e diferenciação de CTPHs do SCUP (PELED *et al.*, 2002). O tratamento de células CD34<sup>+</sup> do SCUP com TEPA e SCF, TPO Flt3-L e IL6, por três semanas e posterior expansão somente com as citocinas até 11 semanas, proporcionou amplificação no total de células nucleadas, de células CD34<sup>+</sup> e de UFC de 4,6 vezes, 8,5 vezes e 9 vezes, respectivamente, em relação ao controle (ausência do tratamento com TEPA), bem como aumentou a proporção de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> de 2,7% nos controles para 21,4% nas tratadas (PELED *et al.*, 2004).

Todavia, *in vivo*, a autorrenovação, proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas ocorrem em um microambiente onde parte das mesmas encontra-se em estado de quiescência, servindo como um *pool* de reserva, e parte entra no ciclo celular proliferando, envolvendo então, a decisão entre a quiescência ou proliferação e a autorrenovação ou diferenciação, processos finamente controlados pela integração entre fatores intrínsecos e extrínsecos, estes últimos advindos do microambiente onde as mesmas residem (LYMPERI *et al.*, 2010; NARDI; ALFONSO, 2006).

Isso torna a expansão *ex vivo* de CTPHs uma tarefa desafiadora em função de que se faz necessária a manutenção da autorrenovação ao mesmo tempo em que deve-se obter a proliferação e inibir a diferenciação (AGGARWAL *et al.*, 2012). Porém, as culturas em meio líquido com a suplementação exógena de citocinas removem as CTPHs das interações celulares e moleculares que ocorrem no microambiente hematopoiético e que fazem da hematopoiese um sistema complexo e altamente regulado.

Assim, a co-cultura das CTPHs com células do microambiente hematopoiético, em ambiente 2D ou 3D pode contribuir para a recomposição de parte do mesmo. Nesse sentido as células-tronco mesenquimais (CTMs), um dos componentes do microambiente hematopoiético, têm sido estudadas por produzirem e secretarem moléculas da matriz extracelular (MEC) e citocinas (HORWITZ, E. M.; PRATHER, 2009; OSTANIN *et al.*, 2011).

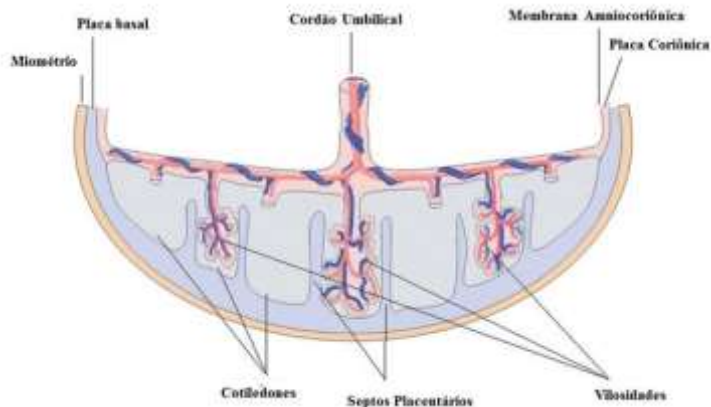
### 3.3.3.2 Co-cultura com CTMs em ambiente 2D

As CTMs são uma população heterogênea de células-tronco que para serem caracterizadas como tal devem atender a critérios como possuírem a propriedade de aderir ao plástico, apresentar morfologia fibroblastóide, terem a capacidade de proliferar e diferenciar *in vitro* para a linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica, expressar pelo menos os antígenos de superfície CD73, CD90 e CD105 e não expressar antígenos de superfície como CD34, CD45, HLA-DR, CD11b ou CD14, CD19 ou CD79 $\alpha$  (DOMINICI *et al.*, 2006). Além destes marcadores de superfície consolidados em consenso para caracterização imunofenotípica das CTMs, outros podem ser utilizados na caracterização e diferenciação das CTMs de outras células, como a expressão de CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49(a, b, c, e), CD51, CD54, CD58, CD61, CD62L, CD71, CD102, CD104, CD106, CD109, CDw119, CD120(a,b), CD121a, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140(a,b), CD146, CD164, CD172a, calponina, desminina, nestina, stro-1, vimentina e  $\alpha$ SMA e a ausência de expressão de marcadores como o CD4, CD15, CD18, CD25, CD31, CD49d, CD50, CD62E, CD62P, CD117, CD133, CD144 e o fator de Von Willebrand (SILVA MEIRELLES; NARDI, 2009)

As CTMs podem ser obtidas de diferentes fontes como a medula óssea (KASTRINAKI *et al.*, 2008), a derme (MUSINA *et al.*, 2005), o tecido adiposo (CAVALLO *et al.*, 2011), a polpa dentária (CHADIPIRALLA *et al.*, 2010), o cordão umbilical (FAN *et al.*, 2011), o SCUP (PETERS *et al.*, 2010) e a placenta (YUAN, W. *et al.*, 2012).

A placenta é uma fonte de CTMs com vantagens sobre as demais por ser um material abundante, que é habitualmente descartado, desprovido de conflitos éticos, de fácil obtenção e que não oferece qualquer risco para a doadora (EVANGELISTA *et al.*, 2008). Estas células podem ser obtidas de diferentes estruturas da placenta como a placa basal, o âmnio, a membrana coriônica (MC) e o viló (DIAZ-PRADO *et al.*, 2011; IGURA *et al.*, 2004; IN 'T ANKER *et al.*, 2004; SONCINI *et al.*, 2007).

Em função da importância das CTMs na expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP e em outras áreas da ciência como a terapia celular elas têm sido investigadas quanto às condições de cultivo, potencial de diferenciação, síntese e secreção de moléculas, assim como a busca por diferenças entre as CTMs de diferentes fontes ou por vezes, entre CTMs obtidas de diferentes regiões de uma mesma fonte (ABUMAREE *et al.*, 2013; KANEMATSU *et al.*, 2011; OSPANIN *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Representação esquemática da placenta humana a termo. Adaptada de Parolini *et al.*, 2008.

A expressão gênica de citocinas pelas CTMs da placenta, após descartar o âmnio e a decídua, foi avaliada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando como medida de comparação o *cycle threshold* (Ct) obtido (ABUMAREE *et al.*, 2013). Neste estudo os autores consideraram expressão negativa quando não obtiveram um valor para o Ct, fraca quando o valor do Ct foi superior a 35 ciclos, moderada quando o Ct foi entre 29 e 35 ciclos e forte quando o Ct foi menor que 29 ciclos. Os resultados demonstraram a expressão forte de IL6 e IL8, fraca de IL5 e IL16 e negativa para IL3, entre outras. A expressão gênica de um amplo espectro de moléculas de adesão incluindo integrinas ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 2b$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 10$ ,  $\alpha 11$ ,  $\alpha E$ ,  $\alpha M$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ), P selectinas e moléculas da superfamília das imunoglobulinas (ICAM1, ICAM2, PECAM, VCAM) também foi demonstrada utilizando a metodologia de PCR em tempo real. O mesmo estudo avaliou a secreção de citocinas no meio de cultura pela metodologia de enzima imunoensaio (ELISA), após 48 h de cultivo. Foi detectada a secreção da IL6 e da IL8.

A análise por ELISA da secreção espontânea de citocinas pelas CTMs da medula óssea, da placenta (não esclarece a região e fonte indicada não pode ser obtida) e do tecido adiposo, após 48 h de cultivo, revelou que as CTMs do último secretam significativamente mais GM-CSF e EPO do que as outras fontes (OSTANIN *et al.*, 2011). No entanto, não houve diferença significativa na secreção de IL6 e G-CSF.

A expressão gênica de SCF bem como do seu receptor (c-kit) também foi demonstrada por PCR de ponto final em CTMs do âmnio e da membrana coriônica (RUS CIUCÁ *et al.*, 2011). CTMs da medula óssea, da decídua, do âmnio e do SCUP secretaram IL6 e IL8 que foi detectado por *microarray* no meio de cultura após 3 a 4 dias de cultivo. Entretanto a secreção de SDF1 foi detectada por *microarray* somente nas CTMs da medula óssea, embora a sua expressão gênica tenha sido detectada por PCR em tempo real nas CTMs de todas as fontes e confirmada por *western blot* nas da decídua e do âmnio (HWANG *et al.*, 2009). A expressão gênica do SDF1 foi maior nas CTMs da medula óssea confirmando o resultado obtido no *microarray*.

Sabe-se que a placenta apresenta baixa imunogenicidade que pode estar relacionada com sua função na tolerância materno-fetal (YUAN *et al.*, 2012). A resposta imunomodulatória de CTMs da placa coriônica, da medula óssea e do tecido adiposo foi avaliada frente à linfócitos T ativados, por 72 h em co-cultura (LEE *et al.*, 2012). As CTMs das três fontes geraram respostas semelhantes, porém com níveis mais elevados de IL2, IL4, IL13 e GM-CSF nas derivadas da placa coriônica. A capacidade imunomoduladora de CTMs da região maternal (decídua) da placenta e da região fetal (âmnio) foi comparada pela inibição da reação mista de linfócitos primária e secundária em co-cultura e pela expressão de citocinas como a IL7 e a IL10 (ROELEN *et al.*, 2009). As CTMs das duas origens demonstraram inibir a reação mista de leucócitos primária e secundária de forma dose-celular dependente, porém foi significativamente maior nas de origem fetal do que com as de origem maternal. Esta diferença foi ainda mais proeminente na secundária que na primária (aproximadamente 90% versus aproximadamente 80%, na primária e aproximadamente 60% versus 30%, na secundária). A dosagem das citocinas revelou produção maior das citocinas IL7 e IL10 pelas CTMs de origem fetal. Além disso, o bloqueio da IL10 com anticorpos demonstrou que esta é a principal mediadora do efeito imunomodulatório das mesmas.

O aumento no percentual de células T reguladoras (Treg) após expansão *ex vivo* de células do SCUP em co-cultura com CTMs da medula óssea, foi sugerida como possível causa para aumento da sobrevivência de camundongos transplantados, em função da redução da DECH (FAN *et al.*, 2013). O percentual de linfócitos CD3 reduziu de 36,5% para 2% e o percentual de células Treg aumentou de 0,3% para 0,9%, por sua vez a intensidade do sinal no *microarray* para IL2 e IL10 aumentou 5,2 vezes e 2,2 vezes respectivamente.



Em função da capacidade de síntese e secreção desta diversidade de moléculas, CTMs de diversas fontes, especialmente as da medula óssea e da placenta e, em menor frequência, as do SCUP e do tecido adiposo, têm sido utilizadas e comparadas quanto à capacidade de suporte para a hematopoiese (LIMA *et al.*, 2012; ROBINSON *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-PARDO; VERNOT, 2013; WAGNER *et al.*, 2007). Estes estudos demonstraram que a eficiência da expansão de progenitores hematopoieticos, especialmente os mais indiferenciados, pode estar associada ao co-cultivo destes com as mesmas.

As CTMs da medula óssea, do SCUP e do tecido adiposo foram utilizadas no co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> para avaliar a habilidade de manutenção de progenitores mais primitivos do SCUP, as células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> (WAGNER *et al.*, 2007). As CTMs da medula óssea e do SCUP demonstraram capacidade superior às do tecido adiposo na manutenção destes progenitores. Além disso, essa habilidade estava associada ao contato direto no co-cultivo, visto que tais diferenças não foram observadas quando as CTPHs foram privadas do contato celular direto pelo uso de uma membrana.

Em outro estudo, CTMs da medula óssea e citocinas (SCF, TPO e Flt3-L) foram utilizadas isoladamente ou em conjunto para avaliar a influência sobre a proliferação, manutenção de progenitores primitivos e o potencial clonogênico de células CD34<sup>+</sup> de SCUP (RODRÍGUEZ-PARDO; VERNOT, 2013). Os resultados demonstraram que quando as citocinas foram utilizadas sem o co-cultivo ocorreu proliferação com concomitante diferenciação. Entretanto quando realizado o co-cultivo sem adição exógena de citocinas ocorreu aumento do percentual de progenitores primitivos CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> com valores de 6,5% e 1% para o co-cultivo ou somente as citocinas exógenas respectivamente. O número e proporção de unidades formadoras de colônias de granulócitos, eritrócitos e megacariócitos (UFC-GEMM) também foi maior na condição de co-cultivo sem a adição exógena de citocinas do que somente com citocinas ou estas em conjunto com o co-cultivo.

As células mononucleares (MNC) de SCUP foram expandidas *ex vivo* em cultura com o uso concomitante de CTMs da medula óssea (co-cultivo) e da suplementação com citocinas exógenas (SCF, TPO e Flt3-L) por 12 dias (FAN, X. *et al.*, 2013). Foi obtida a expansão de 8,6 vezes no total de células nucleadas, 14,1 vezes nas células CD34<sup>+</sup>, 41,1 vezes nas unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (UFC-GM) e 8 vezes nas células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>. Neste estudo foi procedida a expansão sem o uso das citocinas mas, o autor não relata os resultados obtidos.

O grau de enriquecimento inicial (% de pureza) das células CD34<sup>+</sup> cultivadas é outro aspecto que demonstrou influenciar na amplificação destas, após 7 dias de cultura na presença de CTMs da medula óssea com suplementação exógena de citocinas (SCF, TPO, Flt3 e fator de crescimento de fibroblastos básico - bFGF) (ANDRADE *et al.*, 2011). Culturas com purezas iniciais de aproximadamente 90%, 50% e 25%, propiciaram ampliações das células CD34<sup>+</sup> na ordem de 14 vezes, 22 vezes e 31 vezes respectivamente. Por sua vez o uso de MNC, sem qualquer enriquecimento para células CD34<sup>+</sup> não se mostrou produtivo.

Por outro lado, alguns protocolos de expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP para ensaios clínicos tem utilizado o volume total de células mononucleares obtidas na coleta (LIMA *et al.*, 2012; ROBINSON *et al.*, 2011). Esta estratégia visa evitar a perda de CTPHs que pode ocorrer no procedimento de separação das mesmas. Estes protocolos iniciaram utilizando CTMs da medula óssea de doadores aparentados mas em função da demora que esta etapa causava na disponibilização das CTPHs expandidas, passaram a utilizar CTMs obtidas de fonte comercial. O protocolo com as CTMs comerciais foi o mesmo utilizado com as CTMs de familiares e incluía, além do co-cultivo, a suplementação com as citocinas SCF, Flt3-L, TPO e o G-CSF. A expansão foi realizada em duas etapas de 7 dias cada, com volume final de 10 L. Este procedimento propiciou a expansão média de até 30 vezes no número de células CD34<sup>+</sup>. Entretanto, esta expansão ocorreu às expensas dos progenitores mais primitivos. Quando as CTPHs expandidas foram transfundidas juntamente com uma unidade de SCUP não expandida, o tempo para reconstituição dos neutrófilos e das plaquetas foi de 15 dias e 42 dias respectivamente. No entanto, a longo prazo só permanecia a progênie não expandida (LIMA *et al.*, 2012; ROBINSON *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que a via de sinalização do Notch desempenha papel fundamental na diferenciação de CTPHs (DUNCAN *et al.*, 2005). Com base nisso, ligantes do Notch como o delta1, tem sido utilizados para expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP proporcionando a amplificação das mesmas (DELANEY, C. *et al.*, 2010). Células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> foram cultivadas por 7 dias em três condições diferentes: suplementação com as citocinas (SCF, Flt3-L, TPO, IL3, IL6, G-CSF e GM-CSF); suplementação com as mesmas citocinas em co-cultivo com CTMs da medula óssea; e, suplementação com as citocinas e co-cultivo com a linhagem de CTMs OP9 transduzidas com o ligante do Notch (delta1) (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011). Na suplementação

apenas com as citocinas ocorreu uma expansão de aproximadamente 100 vezes no total de células nucleadas, 40 vezes no número de células CD34<sup>+</sup> e uma redução para 0,9 vezes o número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, inicialmente cultivadas. Por sua vez a cultura em presença das citocinas e de CTMs sem o ligante, a expansão foi de aproximadamente 122 vezes no número total de células, 54 vezes no número de células CD34<sup>+</sup> e 2,4 vezes número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>. Entretanto, a condição com citocinas e as CTMs transduzidas com delta1, ocorreu uma redução de 39% no total de células nucleadas em comparação com as citocinas apenas, porém uma expansão em relação ao inicialmente cultivado de 46 vezes para as células CD34<sup>+</sup> e 21 vezes para as células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>.

Desde que as interações celulares na medula óssea ocorrem em um ambiente tridimensional, experimentos envolvendo culturas e co-culturas em estruturas tridimensionais (arcabouços) tem sido desenvolvidas com o objetivo de mimetizar este aspecto do microambiente (CHOI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2003).

### 3.3.3.3 Co-cultura com CTMs em ambiente 3D

A co-cultura em ambiente 3D, estáticas (LEISTEN *et al.*, 2011) ou em perfusão representa outra metodologia, embora com menor frequência, empregada na expansão de CTPHs do SCUP (YUAN. *et al.*, 2013).

A co-cultura de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da medula óssea e da geleia de Wharton em ambiente 3D proporcionado por um arcabouço de colágeno foi utilizada como modelo para mimetizar a hematopoiese num ambiente *in vitro* e comparar a expansão com sistema de co-cultivo em 2D e a cultura sem o suporte das CTMs (LEISTEN *et al.*, 2011). A melhor condição para manutenção e expansão de progenitores primitivos CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, em até 14 dias de cultivo testados, foi obtida no sistema 3D com CTMs da medula óssea, quando comparada com todas as demais condições. Além disso, a cultura em 3D demonstrou o estabelecimento de uma população no meio sobrenadante do arcabouço mais diferenciada, mais rica em progenitores CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e outra interna ao arcabouço, mais rica em progenitores mais indiferenciados.

Outra pesquisa comparou o sistema 3D não estático, com 3D estático e 2D, todos sem o co-cultivo com CTMs, mas suplementados exogenamente com as citocinas SCF, Flt3-L e TPO (YUAN *et al.*, 2013). Os resultados demonstraram eficiência maior na amplificação e proporção de células CD34<sup>+</sup> nos sistemas 3D, seja o não estático (expansão 4,41x e 18,08% de células CD34<sup>+</sup>) ou com o 3D estático

(5,89x e 13,27% de células CD34<sup>+</sup>) em relação ao 2D (0,68x e 0,45% de células CD34<sup>+</sup>).

Além do colágeno, a fibronectina é outro componente da MEC utilizado em sistemas 3D para expansão *ex vivo* de CTPHs (FENG *et al.*, 2008). As células CD34<sup>+</sup> de SCUP foram expandidas em culturas durante 10 dias, em ambiente 2D, 3D com revestimento de fibronectina e 3D sem a fibronectina, todas suplementadas com SCF, Flt3-L, TPO e IL3. A expansão no total de células nucleadas e de células CD34<sup>+</sup>, em ambiente 2D, foi de 75 vezes e 2 vezes, em ambiente 3D sem fibronectina foi de 153 vezes e 11 vezes e no 3D com fibronectina foi de 185 vezes e 100 vezes, respectivamente. Os ensaios clonogênicos demonstraram aumento de 45% na proporção de unidades formadoras de colônias eritróides (UFC-E) e unidade formadora de colônias do *burst* eritróide (BFU-E), redução de 41% nas UFC-GM e manutenção da proporção das UFC-GEMM nas células expandidas em 3D com fibronectina. Nas células expandidas em 2D ocorreu redução de 20%, aumento de 70% e redução de 66% na proporção de UFC-E /BFU-E, UFC-GM e UFC-GEMM respectivamente. O autor não relata os resultados do ensaio clonogênico com células expandidas em 3D sem o revestimento com fibronectina. Além disso, a pesquisa demonstrou que partindo-se de uma semente inicial de 100 e 300 células CD34<sup>+</sup>, após a expansão por 10 dias o total de células obtidas foi suficiente para reconstituir a hematopoiese de camundongos letalmente irradiados, nas mesmas condições que o enxerto de 40.000 células CD34<sup>+</sup> não manipuladas.

Um arcabouço esponjoso bioderivado de osso foi utilizado em um sistema 3D para expansão de progenitores CD34<sup>+</sup> de SCUP em comparação com sistema 2D, ambos com co-cultura de CTMs da medula óssea e sem a adição exógena de citocinas, por um período de duas semanas (TAN *et al.*, 2010). No experimento 3D as CTMs foram induzidas para diferenciação osteogênica por 7 dias antes da co-cultura. O sistema 3D proporcionou uma expansão dos progenitores CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> de 3,8 e 4,4 vezes, enquanto que no sistema 2D houve redução para 0,8 vezes e 0,51 vezes em relação ao inicialmente cultivado respectivamente. Os ensaios clonogênicos demonstraram aumento, principalmente de colônias da linhagem eritróide no sistema 3D e da linhagem mielóide no sistema 2D.

Outra estrutura 3D utilizada na expansão de células CD34<sup>+</sup> de SCUP refere-se a mistura dos polímeros glicidil metacrilato e ácido metacrílico (proporção 4:1 respectivamente) na forma granular, acrescida do suporte com células estromais murinas MS-5

(HIRABAYASHI *et al.*, 2011). Este sistema foi comparado com cultura nas mesmas condições, porém em ambiente 2D. As culturas foram continuadas por 12 semanas com coleta semanal de uma alíquota de cada condição de cultura. No sistema 2D ocorreu uma expansão acelerada das células CD34<sup>+</sup> na primeira semana com ligeiro acréscimo até a segunda e redução gradativa até ausência das mesmas na décima segunda semana. Na cultura em 3D houve expansão acelerada até a terceira semana com redução gradativa nas seguintes, mas mantendo até a décima segunda semana valores aproximados (ligeiramente superiores) ao da primeira semana. Não houve diferença significativa na expansão entre o sistema 2D e 3D até o final de duas semanas, passando a ser significativa na terceira semana e mantendo-se até o final das 12 semanas. Estes resultados evidenciaram uma maior capacidade do sistema 3D em sustentar a sobrevida destes progenitores a longo prazo.

Além das abordagens acima descritas outras metodologias têm sido empregadas com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos com o transplante de CTPHs expandidas *ex vivo*, especialmente no que se refere ao *homing* das mesmas. Sabe-se que o estabelecimento das CTPHs na medula óssea após a infusão venosa das mesmas (*homing*) é um passo fundamental para a reconstituição hematopoiética do indivíduo transplantado (TAVASSOLI; HARDY, C. L., 1990). Além disso, células CD34<sup>+</sup> expandidas *ex vivo* demonstraram menor potencial de pega do enxerto que as não manipuladas e tal comportamento pode ser em decorrência de uma baixa eficiência no *homing* (SZILVASSY *et al.*, 1999; XU, R.; REEMS, J. A., 2001)

Em consequência, algumas metodologias têm sido aplicadas visando aprimorar o *homing* das CTPHs do SCUP, como o uso da PGE2 (prostaglandina E2) em co-culturas, que resultou em melhora do *homing* das mesmas, além de estimular a proliferação (HOGGATT *et al.*, 2009). A nicotinamida é outra substância que demonstrou incrementar o *homing* de células CD34<sup>+</sup> expandidas em cultura com as citocinas TPO, Flt3-L, SCF e IL-6 e ainda contribuiu para inibir a diferenciação das mesmas (PELED *et al.*, 2012). Por sua vez, o tratamento das CTPHs de camundongos com inibidores da dipeptidil peptidase IV CD26 (CD26/DPPIV) como a diprotina-A, aumentou em até 11 vezes a eficiência do *homing* das mesmas nos camundongos transplantados (CHRISTOPHERSON *et al.*, 2004). Além disso, a variação na técnica de transplante pela injeção intraóssea das células a serem transplantadas em vez da infusão endovenosa, é outra metodologia que vem sendo empregada, mas os benefícios dela ainda

são controversos (BRUNSTEIN *et al.*, 2009; CASTELLO *et al.*, 2004; RAMIREZ *et al.*, 2010).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA**

Os procedimentos relativos a esta tese de doutorado foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob os protocolos 311/2008 e 1962/11-CEPSH/PRPG.

### **4.2 DOADORES**

As doadoras dos materiais biológicos foram gestantes internadas no Centro Obstétrico do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, devidamente esclarecidas quanto à natureza e objetivos da pesquisa e, que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Após consulta aos prontuários médicos das gestantes, foram incluídas as doadoras com acompanhamento pré-natal de pelo menos duas consultas, idade entre 18 e 44 anos e período gestacional de 36 a 42 semanas. Estas deveriam ser clinicamente saudáveis e com resultados laboratoriais negativos para rubéola, toxoplasmose, HIV e sífilis, assim como ausência de resultados positivos para outras doenças infectocontagiosas como hepatites, de complicações no transcurso da gestação, de malformações fetais ou de histórico familiar de doenças hereditárias do sistema hematopoiético.

### **4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Amostras de placenta e/ou SCUP foram obtidas após as doadoras assinarem o TCLE e terem sido atendidos os critérios de inclusão no estudo. O processamento das amostras foi realizado imediata e sequencialmente após a obtenção das mesmas. Da placenta foram obtidas amostras da membrana coriônica e do vilo e destas foram isoladas CTMs, as quais foram cultivadas, caracterizadas pela morfologia e por imunofenotipagem. A seguir foi quantificada a expressão gênica nas CTMs do vilo e MC, em diferentes passagens (P1, P5 e P10), das citocinas de interesse hematopoiético SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1. As CTMs que apresentaram o melhor perfil de expressão de citocinas para suporte da hematopoiese foram utilizadas para expansão *ex vivo* de CTPH obtidas do SCUP.

O SCUP foi obtido e analisado e CTPHs foram isoladas do mesmo, avaliadas quanto à pureza e o potencial clonogênico.

Associações entre fatores materno-fetais e obstétricos com o conteúdo qualitativo do SCUP foram analisados. As CTPHs do SCUP foram expandidas em co-cultura com as CTMs, em ambiente 2D e 3D.

#### **4.4 OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

A coleta das amostras biológicas foi procedida tanto de partos vaginais quanto de partos por cesariana e imediatamente após a dequitação ou remoção da placenta respectivamente. Foi solicitado à equipe do Centro Obstétrico que mantivesse o clampeamento distal no cordão umbilical.

##### **4.4.1 CTMs de Placenta: membrana coriônica e vilo**

Uma vez recebida, a placenta era transportada em caixa térmica e sob refrigeração para o Laboratório de Células Tronco e Terapia Celular (LACERT), onde era processada em ambiente estéril. Procedia-se a amputação do cordão umbilical no ponto de inserção do mesmo na placenta e a seguir fazia-se uma incisão em cruz na mesma a partir do ponto de amputação do cordão (MIKI et al., 2010). Após o peeling mecânico do âmnio, um fragmento da membrana coriônica era removido da região próxima à inserção do cordão e de forma a evitar tanto quanto possível a presença de material do vilo (Figura 2). Vasos proeminentes, coágulos e pequenos resíduos de vilo que haviam permanecido foram cuidadosamente dissecados da membrana e a mesma foi lavada várias vezes com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2). A amostra, aproximadamente 2g, foi, então, cortada em pequenos fragmentos e submetida ao tratamento enzimático segundo Soncini, com modificação (SONCINI et al., 2007). A dissociação enzimática foi realizada com dispase II (concentração final de 2,4 U/mL, BD, código 354235), durante 8 min a 37 °C para a remoção da camada trofoblástica. Subsequentemente, procedia-se um pulso de centrifugação (300 x g /15s) para sedimentação dos fragmentos. O sobrenadante foi descartado e os fragmentos sedimentados eram submetidos à digestão enzimática com colagenase IA (concentração final de 93,75 U/mL, Sigma, código c9891) por 1h a 37°C.



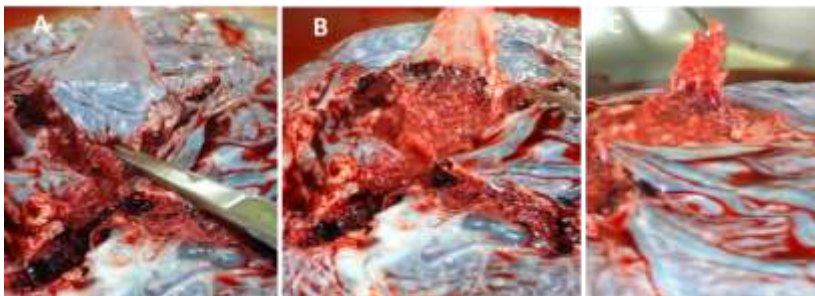


Figura 2. Obtenção da membrana coriônica e do vilão. A-peeling mecânico do âmnio; B-remoção de fragmento da membrana coriônica; C-remoção de fragmento do vilão.

Transcorrida a etapa acima, realizava-se o bloqueio da enzima pela adição de meio de cultura Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, código 12200-036) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF, Vitrocel, lote 02/12) e penicilina/estreptomicina (PS) 100.000U/L (Gibco, código 15140) e incubação por 5 min à temperatura ambiente (TA). A seguir os fragmentos digeridos eram filtrados em malha de 70 $\mu$ m (Cell Strainer BD) e o filtrado centrifugado (300 x g/15 min). O sobrenadante era descartado e o *pellet* formado era ressuspensão em IMDM suplementado com 10% SBF e PS. A etapa de centrifugação era repetida e as células ressuspensas em IMDM suplementado com PS e 10 % SBF e, então, semeadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, código 430372) e mantidas em estufa a 37°C, com umidade superior a 95% e ar atmosférico suplementado com 5% de CO<sub>2</sub>.

Por sua vez, a amostra de vilão (aproximadamente 2 g) era obtida da mesma região onde fora removida a membrana coriônica retirando-se uma fatia da superfície da face fetal da placenta, com espessura não superior a 0,5 cm (Figura 2). O fragmento era lavado exaustivamente em PBS para eliminar tanto quanto possível o sangue, dissociado mecanicamente e submetido à digestão enzimática com pancreatina (Sigma, código P3292) na concentração final de 0,625%, por 30 min. A seguir fazia-se o bloqueio da enzima com IMDM suplementado com PS e 10% SBF, centrifugado (5 min a 250 x g) e todo o *pellet* formado era transferido para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning, código 430372) mantidas em estufa a 37°C, com umidade superior a 95 % e ar atmosférico suplementado com 5 % de CO<sub>2</sub>.

A partir desta etapa, os procedimentos eram comuns às culturas de vilão MC. Após 2 a 3 dias o meio de cultura era substituído e as células não aderentes descartadas. Desse modo as CTMs foram

selecionadas pela adesão ao plástico. O meio de cultivo era, então, trocado a cada 3 ou 4 dias. Quando a monocamada celular alcançava confluência de aproximadamente 70%, esta era removida do plástico pelo tratamento com tripsina/EDTA 0,05 % (Invitrogen, código 25300-062) durante 2 min a 37 °C. A tripsina era, então, bloqueada com IMDM suplementado com 10 % SBF e PS, centrifugadas (250 x g, por 5 min), descartado o sobrenadante e as células ressuspensas em IMDM. A partir desta etapa as CTMs eram utilizadas para repique/expansão para nova passagem, caracterização imunofenotípica, extração do ácido ribonucleico (RNA) para os procedimentos de biologia molecular ou congelamento.

O procedimento de expansão para as passagens seguintes (até passagem 10 - P10) foi realizado repicando-se as células contidas em uma garrafa para duas novas garrafas (passagem 1 - P1). Este processo era repetido até a passagem desejada e em cada uma delas as CTMs eram submetidas à caracterização morfológica e imunofenotípica, ou congelamento. As CTMs assim caracterizadas foram utilizadas na quantificação da expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético e na co-cultura para expansão das CTPHs do SCUP.

#### **4.4.2 Sangue de Cordão Umbilical e placentário**

O SCUP foi coletado após a dequitação da placenta nos partos vaginais ou após remoção da mesma pelo(a) obstetra nos partos por cesariana. Foi procedida a assepsia do cordão umbilical com clorohexidina 0,5% em solução etanólica, mantendo o mesmo clampeado distalmente. A seguir a veia umbilical foi puncionada com agulha 40 x 1,2mm, montada em seringa de 20mL de capacidade e a amostra coletada foi transferida para tubos falcon contendo solução de Acido cítrico, citrato e dextrose (ACD - JP Indústria Farmacêutica, fórmula A) como anticoagulante. Esta alíquota foi utilizada para separação de células mononucleares e subsequentemente para a seleção positiva de CTPHs CD34+. Outra alíquota, com volume de 4mL, foi armazenada em tubo plástico contendo ácido etilendiaminotetraacético tripotássico (EDTAK3 – Vacuplast, GDO20EK) para realizar o hemograma e a citometria de fluxo para CTPHs CD34+. Uma vez realizada a coleta, a amostra foi transportada em caixa térmica e sob refrigeração para o LACERT, onde foi processada.

#### 4.4.3 CTPHs do sangue de cordão umbilical e placentário

Para proceder a seleção positiva dos progenitores CD34<sup>+</sup> por sistema imunomagnético é necessária a separação das MNC do SCUP. Assim, o SCUP coletado como descrito no item 4.4.2, foi diluído 3x com PBS e submetido a um gradiente de densidade com solução de polisucrose e diatrizoato de sódio de densidade igual a  $1.077 \pm 0.001$  g/mL (Histopaque<sup>®</sup>-1077, SIGMA<sup>®</sup>, ST Louis, código 10771), seguindo as instruções contidas na bula do mesmo. A fim de avaliar a pureza e a taxa de recuperação das MNC procedeu-se a contagem absoluta e diferencial (Analisador hematológico Sysmex Xs-1000i) das mesmas.

Por sua vez, a viabilidade das MNC foi avaliada (método de exclusão do azul de Trypan Sigma, T8154) como controle de qualidade do procedimento de separação por gradiente de densidade. Dessa forma, uma viabilidade baixa dos CTPHs ao final da seleção positiva poderia ser rastreada para esclarecer qual etapa estaria causando danos às mesmas. A percentagem de células CD34<sup>+</sup> nas MNC do gradiente de densidade também foi determinada por citometria de fluxo em uma alíquota separada para este fim.

Sequencialmente foi procedida a seleção positiva para CTPHs com o sistema de seleção de células progenitoras CD34 Dynal<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup> Dynal<sup>®</sup>, 113.01D), seguindo-se as instruções do fabricante. As células CD34<sup>+</sup> obtidas foram contadas, avaliadas quanto à viabilidade (método do azul de Trypan) e pureza (citometria de fluxo). Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis. Como controle de uma possível perda de CTPHs foi analisada a fração negativa da separação magnética por citometria de fluxo, quanto à presença de células CD34<sup>+</sup>. As CTPHs assim obtidas foram utilizadas para avaliar o potencial clonogênico do SCUP e para a amplificação *ex vivo*.

#### 4.4.4 Síntese do ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA)

O cDNA das CTMs foi sintetizado seguindo os passos sequenciais de extração do RNA, avaliação da qualidade e quantificação por espectrofotometria, tratamento com DNase e transcrição reversa para cDNA. Ao final da síntese, o cDNA era testado por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real com curva de dissociação para então ser considerado adequado para futuras análises. Nesse teste era utilizado o par de iniciadores para o gene da Gliceraldeído-3-fosfato

desidrogenase (GAPDH) permitindo conferir pelo Ct obtido se este estava adequado à quantidade de RNA utilizada na síntese do mesmo. Por sua vez a curva de dissociação permitia avaliar a qualidade do cDNA pela presença de pico único na temperatura esperada para o produto do GAPDH amplificado.

Para a extração do RNA das CTMs foram adicionados 2mL de reagente trizol (TRIzol<sup>®</sup> Invitrogen, código 15596-026, posteriormente TRIzol<sup>®</sup> Ambion<sup>®</sup> by Life Technologies<sup>™</sup>) à cultura em confluência, com remoção previa do meio de cultura seguida de duas lavagens com PBS. Os demais procedimentos para extração do RNA foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi quantificado e avaliado quanto à pureza por espectrofotometria (espectrofotômetro GE, modelo NanoVue) em comprimento de onda de 260 nm bem como nas relações 260 / 280 e 260 / 230 nm respectivamente. Posteriormente, o RNA foi tratado com DNase (Promega, RQ1 RNase-Free DNase, código M6101) seguindo as instruções do fabricante para eliminar possível contaminação com DNA genômico. O RNA assim obtido foi utilizado para transcrição reversa (Promega, ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcriptase, código A3802) conforme instruções contidas na bula do produto e processada em termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler Gradient.

A síntese do cDNA foi realizada com a mesma quantidade de RNA inicial de forma a ter a concentração final de 50 ng cDNA por  $\mu$ L de amostra a ser utilizada na quantificação da expressão gênica, facilitando assim a padronização e controle dos procedimentos na mesma. Para todas as amostras, na transcrição reversa, foi incluído um controle dos reagentes (NT- *no template*) onde todos os reagentes eram utilizados, exceto a amostra e um controle da amostra (NRT- *no reverse transcriptase*) no qual não era adicionada a enzima transcriptase reversa. Assim, ao realizar-se a reação de PCR em tempo real com GAPDH para verificar se o cDNA sintetizado poderia ser liberado para a quantificação dos genes alvo, estes controles eram processados juntos assegurando a ausência de contaminação com DNA genômico.

## 4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS

### 4.5.1 Caracterização das CTMs da membrana coriônica e do viló

As células obtidas conforme descrito no item 4.4.1 foram analisadas quanto à morfologia e a expressão de antígenos de superfície. A avaliação do potencial de diferenciação foi realizada previamente por

outros grupos do laboratório. Esta tríade, morfologia, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação se faz necessária para que as células possam ser caracterizadas como CTMs (DOMINICI et al., 2006).

#### **4.5.1.1 Caracterização morfológica**

A análise morfológica foi realizada em microscópio de contraste de fase (Olympus, modelo CK40), visando a observação de células aderentes ao plástico e com morfologia fibroblastóide, nas diferentes passagens para a membrana coriônica e para o vilos.

#### **4.5.1.2 Caracterização imunofenotípica**

A expressão dos antígenos de superfície das células aderidas ao plástico e com morfologia fibroblastóide, com grau de confluência de aproximadamente 60% a 70% foi procedida pela metodologia da citometria de fluxo. Para isso foram utilizados os anticorpos conjugados a fluorocromos e seus respectivos isotipos controles conforme descritos na tabela 2.

Todos os experimentos incluíam, além dos tubos testes, o controle positivo, o branco e o respectivo isotipo controle. Para os marcadores CD34 e CD45 foram utilizadas MNC como controle positivo, uma vez que as CTMs devem ser negativas para os mesmos. A quantidade de anticorpo foi previamente titulada utilizando-se os volumes de 20, 10 ou 5  $\mu\text{L}$  para o anti-CD73, anti-CD45 e anti-CD34, volumes de 2, 1 e 0,5  $\mu\text{L}$  para o anti-CD90 e volumes de 5, 2,5 e 1,25  $\mu\text{L}$  para o anti-CD105, por tubo a ser analisado.

Inicialmente as culturas foram tratadas com tripsina, as células ressuspensas em PBS acrescido de 10% SBF, contadas em câmara de Neubauer e a concentração da suspensão celular ajustada para  $2 \times 10^6$  células/mL. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  (105 células) foram distribuídas nos tubos previamente identificados. Em seguida, os anticorpos conjugados ou controles do mesmo isotipo foram adicionados aos respectivos tubos e incubados durante 1h a 4°C e protegidos de luz. Após o período de incubação foram efetuadas duas lavagens adicionando 2mL de PBS suplementado com 10% de SBF a cada tudo e centrifugando-os a  $300 \times g$  por 5 min. Ao final, os pellets resultantes foram ressuspensos em 180  $\mu\text{L}$  de PBS suplementado com 10% de SBF e procedeu-se a aquisição de pelo menos 104 eventos em citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCanto II, com software FACSDiva, versão 6.0.

**Tabela 2.** Anticorpos e isotipos controle utilizados na citometria de fluxo das CTMs.

<b>Anticorpo / isotipo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Volume <math>\mu</math>L</b>	<b>Produto</b>
Anti-CD73	PE	AD2	5,0	BD550257
Anti-CD90	FITC	5E10	1,0	BD555595
Anti-CD105	PerCP Cy5.5	266	5,0	BD560819
Anti-CD45	FITC	HI30	5,0	BD555482
Anti-CD34	PE	581/CD34	5,0	BD555822
Mouse IgG1, $\kappa$	PE	MOPC-21	5,0	BD550257
Mouse IgG1, $\kappa$	FITC	MOPC-21	5,0	BD555748
Mouse IgG1, $\kappa$	PerCP Cy5.5	MOPC-21	5,0	BD550795

Os dados gerados foram analisados com software FlowJo de propriedade da Fiocruz-PR (Fundação Oswaldo Cruz-Paraná).

#### **4.5.2 Avaliação da expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs**

As CTMs dos dois tecidos, membrana coriônica e vilo, foram analisadas em três passagens (P1, P5 e P10) quanto à expressão gênica quantitativa de citocinas de interesse hematopoiético. Esta análise teve por finalidade selecionar CTMs que pudessem oferecer o melhor suporte para expansão *ex vivo* de CTPHs obtidas do SCUP. Para este fim foram desenhados iniciadores para o gene do SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1 (tabela 3), utilizando-se o programa Primer3Plus (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e respectivas sequências gênicas obtidas no *GenBank* (NCBI, USA). Análises complementares dos iniciadores selecionados foram realizadas com o programa OligoAnalyzer, versão 3.1 (IDT, Coralville, Iowa, USA) para verificar a formação de dímeros ou estruturas secundárias.

O gene GAPDH foi utilizado como normalizador. Para que um gene possa ser utilizado como normalizador a sua expressão deve se manter constante nas células onde a expressão dos genes alvo será quantificada (MANE *et al.*, 2008; THELLIN *et al.*, 1999). Neste sentido, a expressão quantitativa do GAPDH foi analisada nas CTMs em diferentes passagens a fim de verificar se a mesma se mantinha

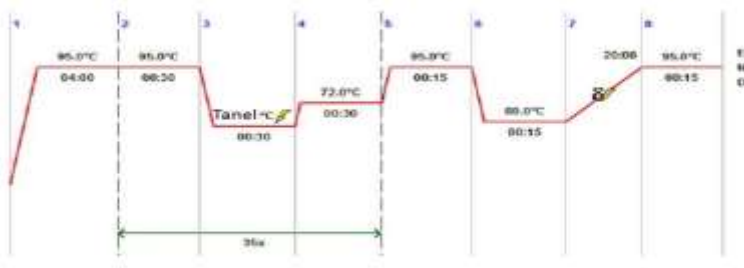
constante e assim atenderia a exigência para que o GAPDH fosse utilizado como gene normalizador.

Uma vez selecionados os iniciadores procederam-se os gradientes de temperatura para cada par de iniciadores (*sense e anti-sense*) do respectivo gene a fim de determinar a temperatura de anelamento (Tanel) ideal para os mesmos (Tabela 3). Foram realizadas reações de PCR em tempo real em pelo menos três temperaturas abaixo da *T melting* (TM) e selecionada a que apresentou melhor Ct e perfil da curva de dissociação. Foi realizada corrida de eletroforese do produto do PCR acompanhado de padrão de 50 pares de base (Promega, código G452A) em gel de agarose 2 % (Invitrogen, código 16500100), com tampão SB, 250 V, 500 mA, durante 20 min. Foi utilizado tampão de carregamento Blue Orange 6X (Promega, código G190A) e corante para ácidos nucleicos Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, código 1315009-06) . As imagens foram capturadas com sistema de captura marca UVP, MultiDoc-It digital Imaging System acoplado ao transiluminador com fonte de luz ultravioleta marca UVP, modelo M20.

Após definir a Tanel, a otimização da concentração de cada iniciador do par foi realizada para determinar a concentração ideal deste na reação de quantificação da expressão gênica. Foram montadas reações combinando três concentrações diferentes (0,20; 0,30 e 0,45  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) de cada iniciador do par, totalizando nove combinações por par de iniciadores. Da mesma forma que para a seleção da temperatura, foi escolhida a combinação de concentração para o *sense* e *anti-sense* que demonstrou melhor Ct e perfil na curva de dissociação. Após a determinação da Tanel e da concentração para cada iniciador, foi realizada a curva padrão com cinco diluições seriadas (5 pontos) da amostra como passo final da padronização das condições de reação para, então, proceder as respectivas reações de quantificação. As condições de reação foram consideradas adequadas quando a respectiva curva padrão apresentou eficiência (Ef) de 90 a 105 % e linearidade ( $R^2$ ) igual ou superior a 0,98.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata para a otimização da Tanel e da concentração dos iniciadores e em triplicata para a curva padrão e reações de quantificação. Foi utilizado o kit Platinun<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen Life Technologies, código 117033-038) seguindo-se as instruções do fabricante, com redução equivalente do volume final para 10  $\mu\text{L}$ . As reações foram processadas em placas de 96 poços (Eppendorff, Twin tec PCR plate, código 951020443), seladas com filme plástico para PCR (Eppendorff, código 00301 27811) e em equipamento Eppendorff,

modelo egradient S realplex<sup>2</sup>. O equipamento foi programado conforme esquema da figura 3.



**Figura 3.** Representação esquemática da programação do equipamento de PCR em tempo real.

As quantificações foram processadas em baterias de amostras de forma que a variação intra e inter experimento fosse minimizada para preservar tanto quanto possível a diferença de expressão de cada citocina. Além disso, o *noiseband* foi ajustado manualmente para o mesmo valor, contribuindo, também, para minimizar as interferências entre os experimentos.

Foi procedida a quantificação relativa das citocinas tendo-se o GAPDH como normalizador (gene de referência) e aplicando-se o tratamento matemático pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001), que leva em consideração, além do  $\Delta C_t$ , a eficiência do iniciador. O cálculo comparativo foi realizado primeiro entre as diferentes passagens das CTMs de cada origem (membrana coriônica ou vilos), separadamente. Posteriormente, o cálculo foi aplicado comparando o melhor perfil de expressão das CTMs do vilos com o melhor perfil de expressão das CTMs da membrana coriônica. O melhor perfil de expressão foi definido pela expressão comparativa maior, no maior número de citocinas avaliadas.



**Tabela 3.** Iniciadores para quantificar a expressão gênica de citocinas hematopoiéticas pelas CTMs

<b>Gene</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>[ ] µM</b>	<b>Tanel °C</b>	<b>Amplicom (pb)</b>
<b>SCF</b>	s-GAAGCAGGGACAGTGGAGAG	0,45	57	133
	as-TCCAGCACAAACAGTGGTGT	0,45		
<b>Flt3- L</b>	s-GGATACTGAGGCACACAGAGG	0,30	54	138
	as-TACAATTTTCATGGGGACAAGG	0,30		
<b>TPO</b>	s-AAATCCCCGGATACCTGAAC	0,45	57	126
	as-GGGAGCCTGTGTCTGATGTT	0,45		
<b>IL6</b>	s-AGAAAACAACCTGAACCTTCCA	0,45	57	111
	as-TCAAACCTCCAAAAGACCAGTGA	0,30		
<b>IL16</b>	s-GCAGGCATCACAGCTAACAA	0,30	57	141
	as-GCTTCTTGAGTGTGGCACA	0,45		
<b>SDF1</b>	s-GGGCTCCCTGTAACCTCTTC	0,30	54	134
	as-GGACACACCACAGCACAAAC	0,45		
<b>GAP DH</b>	s-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	0,30	57	226
	as-GAAGATGGTGATGGGATTTTC	0,30		

#### 4.5.3 Hemograma do SCUP

O hemograma foi realizado na alíquota coletada conforme descrito no item 4.4.2, em equipamento automatizado marca Sysmex, modelo Xs-1000i, utilizando os princípios de impedância com foco hidrodinâmico, espectrofotometria, difração laser e fluorescência de ácidos nucleicos, num período não superior a 12 h após a coleta. O equipamento fornece 21 parâmetros hematológicos para a amostra analisada, dentre os quais foram selecionados os seguintes: eritrócitos (E - número/ $\mu$ L), hemoglobina (Hgb - g/dL), volume corpuscular médio (VCM - fL), leucócitos totais (L - número/ $\mu$ L), granulócitos (Gran - número/ $\mu$ L), linfócitos (Linf - número/ $\mu$ L), monócitos (Mon - número/ $\mu$ L) e plaquetas (Plt - número/ $\mu$ L). A soma do número de linfócitos e monócitos forneceu o número de mononucleares. As

análises foram realizadas em duplicata sendo considerada a média dos valores obtidos em cada parâmetro. A contagem manual de eritroblastos (NRBC) foi realizada em extensão sanguínea corada pelo método de May-Grünwald-Giensa e expressa como percentagem em 400 leucócitos contados, sem diferenciar os mesmos quanto ao estágio de maturação. O número de eritroblastos por  $\mu\text{L}$  de SCUP foi obtido multiplicando-se o número de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de SCUP pela percentagem de eritroblastos contados manualmente.

#### **4.5.4 Percentual e número absoluto de células CD34<sup>+</sup> no SCUP e MNC**

A percentagem e o número de células CD34<sup>+</sup> foram determinados por citometria de fluxo no SCUP, nas MNC do gradiente de densidade e nas células provenientes da seleção positiva para progenitores CD34, todas procedentes da mesma amostra de SCUP (n=10).

As amostras de SCUP e das MNC foram diluídas para uma concentração final de  $1 \times 10^7$  leucócitos/mL, com PBS acrescido de 10% de SBF. As células oriundas da seleção positiva para CD34 foram ressuspensas a uma concentração final de  $6 \times 10^5$  células/mL. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  ( $5 \times 10^5$  células ou  $3 \times 10^4$  células, respectivamente) foram distribuídas nos tubos previamente identificados. Em seguida, os anticorpos conjugados ou controles do mesmo isotipo (Tabela 4) foram adicionados aos respectivos tubos e incubados durante 1h a 4°C e protegidos da luz. As amostras de SCUP foram incubadas a TA, por 30 min, acrescidas da lise por 15 min, após a adição de 450  $\mu\text{L}$  de solução de lise (FACS Lysing Solution, BD, código 349202) diluída 10x. Após o período de incubação foram efetuadas duas lavagens em todos os tubos adicionando 2mL de PBS suplementado com 10% de SBF a cada tudo e centrifugando-os a  $300 \times g$  por 5 min. Ao final, os pellets resultantes foram ressuspensos em 180  $\mu\text{L}$  de PBS suplementado com 10% de SBF.

Na sequência procedeu-se a aquisição dos eventos em citômetro de fluxo Becton Dickinson, modelo FACSCanto II e realizadas as análises com o software de livre acesso Flowing, versão 2.5.0, seguindo a estratégia de gates sequenciais e restritivos recomendada pelas diretrizes da International Society of Hematotherapy and Graft Engineering/International Society of Cellular Therapy (ISHAGE/ISCT) (SUTHERLAND, R. D. et al., 1996). Todos os experimentos incluíam, além dos tubos testes, o controle positivo, o branco e o respectivo isotipo controle.

Para determinar o número absoluto de células CD34+ no SCUP, utilizou-se o método da plataforma dupla (SUTHERLAND, R. D. et al., 1996) multiplicando-se o número de células CD34+ obtidas na citometria pelo número de leucócitos totais obtido no hemograma e este resultado foi, então, multiplicado por 1000 e o valor obtido foi dividido pelo número total de eventos CD45 positivos adquiridos na citometria.

**Tabela 4.** Anticorpos e isotipos controles utilizados na citometria de fluxo do SCUP, MNC e células da seleção positiva para CD34, pré e pós-expansão *ex vivo*.

<b>Anticorpo / isotipo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Volume <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Produto</b>
Anti-CD34	PE	581/CD34	5,0	BD555822
Anti-CD45	FITC	HI30	5,0	BD555482
Anti-CD38	APC	HIT2	5,0	BD555462
7-AAD	-	-	1,5	BD559925
Mouse IgG1, $\kappa$	PE	MOPC-21	5,0	BD550257
Mouse IgG1, $\kappa$	FITC	MOPC-21	5,0	BD555748
Mouse IgG1, $\kappa$	APC	MOPC-21	5,0	BD554681

Nas amostras acima referidas (n=10) não foi utilizado o anticorpo anti-CD38 em quatro delas. O anticorpo anti-CD38 foi incorporado nas análises por citometria nos experimentos de expansão *ex vivo* das CTPHs de SCUP. A quantidade utilizada deste anticorpo foi titulada utilizando-se os volumes de 20, 10 ou 5  $\mu\text{L}$ .

A avaliação da viabilidade, por citometria de fluxo, foi realizada com o corante de ácidos nucléicos 7-amino-actinomicina D (7-AAD) somente nas células após a expansão em co-cultura. A viabilidade foi analisada em tubo separado, para cada co-cultura, adicionando-se o corante 10 minutos antes da aquisição no citômetro. As células foram previamente marcadas com anti-CD45-FITC e anti-CD34-PE, como descrito acima.

#### 4.5.5 Avaliação da pureza e taxa de recuperação das MNC e CD34<sup>+</sup> obtidas do SCUP

A taxa de recuperação das MNC foi calculada dividindo-se o número total das mesmas obtido no gradiente de densidade pelo número total de células mononucleares no volume de sangue utilizado para este procedimento. Por sua vez, o número total de MNC no volume de sangue utilizado para o gradiente de densidade foi calculado multiplicando-se o número de MNC (linfócitos + monócitos) por  $\mu\text{L}$  fornecido no hemograma do SCUP pelo volume utilizado no gradiente. Para o cálculo da recuperação das MNC pelo gradiente de densidade, foi levado em conta a pureza das mesmas. Esta pureza foi determinada pela análise de uma alíquota de cada amostra no mesmo equipamento utilizado para o hemograma.

A taxa de recuperação das células CD34<sup>+</sup> foi calculada dividindo-se o número total das mesmas obtido na seleção positiva pelo número total de células CD34<sup>+</sup> no volume de sangue utilizado inicialmente no gradiente de densidade da mesma amostra. Por sua vez, o número total de células CD34<sup>+</sup> no volume de SCUP utilizado foi determinado pelo método de plataforma dupla considerando o número de células CD34<sup>+</sup> fornecido pela citometria de fluxo e o número total de células nucleadas fornecido pelo analisador hematológico, conforme descrito no item 4.5.4. A pureza das células CD34<sup>+</sup>, obtidas na seleção positiva para as mesmas, foi determinada por citometria de fluxo e tomada em consideração no cálculo da respectiva taxa de recuperação.

#### 4.5.6 Avaliação do potencial clonogênico das CTPHs do SCUP

Para avaliação do potencial clonogênico das CTPHs obtidas do SCUP, conforme descrito no item 4.4.3, foram realizados ensaios de formação de colônias com os meios semissólidos de metil celulose h4434 (StemCells Technologies, Methocult<sup>TM</sup> H4434, código 04434) contendo as citocinas recombinantes humanas SCF, GM-CSF, IL-3 e eritropoietina (EPO) e H4437 (StemCells Technologies, Methocult<sup>TM</sup> Express H4437, código 04437). Todos os procedimentos foram realizados sequencialmente, em ambiente estéril e iniciados logo após a coleta do SCUP.

Ensaio prévios foram realizados para determinar o número de células a serem semeadas a fim de evitar a sobreposição das colônias (*overplating*), a qual impossibilita uma contagem acurada tanto qualitativa quanto quantitativamente das mesmas, ou por outro lado, a

obtenção de um número muito pequeno de colônias (*underplating*) que compromete os valores quantitativos da contagem.

As CTPHs foram contadas e avaliadas quanto à viabilidade (azul de Trypan) e a seguir  $7,5 \times 10^2$  ou  $5 \times 10^2$  células foram cultivadas por placa de 35 mm de diâmetro de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante (human colony-forming cell assays using MethoCult® Technical Manual, version 3.0, October 2004, 48 pg). Os procedimentos foram realizados em duplicata. Resumidamente, o número de CTPHs suficiente para cada duplicata foi ressuspensionado em volume inferior a 10% do volume de meio e adicionado ao respectivo tubo. O tubo foi homogeneizado em vortex por 15 s e deixado em repouso por 5 min para dissipar as bolhas de ar. Decorrido o repouso, 1,1mL de meio foi distribuído por placa utilizando-se seringa de 3mL de capacidade e agulha 40 x 1,2mm. As placas foram inclinadas em várias direções durante movimentos circulares para uniformizar a distribuição do meio. Em seguida foram observadas ao microscópio de contraste de fase para verificar a distribuição das células no meio após o plaqueamento. Posteriormente, a duplicata de placas foi transferida para uma placa de Petry de 100mm de diâmetro contendo uma placa de 35mm com 3mL de água estéril para formar a câmara úmida. O conjunto foi incubado por 12 a 14 dias em estufa a 37 °C, com ar atmosférico suplementado com 5% CO<sub>2</sub> e umidade do ar superior a 95%.

Ao término do período de incubação fez-se a leitura integral das culturas (placa inteira) em microscópio de contraste de fase e com o auxílio de uma placa quadriculada (StemCell Technologies, código 27500). As colônias formadas foram identificadas e contadas como BFU-E (UFC-E + BFU-E), UFC-GM (UFC-G + UFC-M + UFC-GM) ou UFC-GEMM. Todas as leituras foram realizadas pelo mesmo observador e os resultados expressos como número da respectiva UFC por  $10^3$  CTPHs, proporção (%) de cada tipo de unidade formadora de colônia (UFC) em relação ao total de UFCs e número por mL. O número de UFC por mL foi calculado multiplicando-se o número de UFC obtidas por  $10^3$  células CD34<sup>+</sup> pelo número de células CD34<sup>+</sup> x  $10^3$  por mL de SCUP.

#### **4.5.7 Avaliação da associação entre fatores materno-fetais e parâmetros laboratoriais qualitativos do SCUP e entre os dados do conteúdo do SCUP**

Com a finalidade de avaliar se há influência de fatores materno-fetais sobre os parâmetros laboratoriais, em termos qualitativos, do SCUP ou a associação entre os próprios dados do SCUP que possam contribuir para a seleção de amostras mais adequadas para a expansão *ex vivo* ou transplante das mesmas, correlações entre tais fatores e parâmetros foram investigadas. Para tanto, dados sobre idade maternal (anos), tempo de gestação (semanas), peso da placenta e peso do recém-nascido (RN) foram registrados em local apropriado da planilha de cada amostra do SCUP. Foi investigada a associação entre cada um destes fatores e os seguintes parâmetros laboratoriais do SCUP: leucócitos x  $10^6$ /mL, MNC  $10^6$ /mL, CD34<sup>+</sup> %, CD34<sup>+</sup> x  $10^3$ /mL, Eritroblastos x  $10^6$ /mL, NRBC %, BFU-E/ $10^3$  CD34<sup>+</sup> e por mL, UFC-GM/ $10^3$  CD34<sup>+</sup> e por mL, UFC-GEMM/ $10^3$  CD34<sup>+</sup> e por mL, UFC-Total/ $10^3$  CD34<sup>+</sup> e por mL, % de BFU-E, % de UFC-GM e % UFC-GEMM. Os percentuais se referem a percentagem de cada tipo de colônia no total de UFC, calculados por amostra e posteriormente foi calculada a média dos percentuais obtidos individualmente. A correlação entre estes parâmetros laboratoriais do SCUP e outros constantes do item 4.5.3 também foi investigada. Além disso foi avaliada a associação entre os fatores acima citados e a taxa de expansão *ex vivo* de CTPHs, descritas nos experimentos a seguir.

#### **4.5.8 Expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP**

As CTPHs obtidas conforme descrito no item 4.4.3, foram co-cultivadas com CTMs obtidas como descrito no item 4.4.1, em ambiente 2D e 3D com o intuito de obter a expansão das mesmas. Foi avaliado qual CTM propicia melhores condições de expansão em 2D e, posteriormente em qual ambiente (2D ou 3D), utilizando-se a CTM selecionada na etapa anterior (MC ou vilo). Foi avaliado se a expansão que tenha ocorrido alterou ou não a proporção das subpopulações de CTPHs (CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>; BFU-E, UFC-GM e UFC-GEMM) na população submetida aos diferentes protocolos de co-cultura na avaliação por citometria e ensaios clonogênicos.

#### 4.5.8.1 Expansão em ambiente 2D

A expansão em ambiente 2D foi realizada por meio da co-cultura das CTPHs sobre monocamada alimentadora de CTMs, semiconfluente ( $\pm 70\%$  de confluência).

Para a monocamada foram utilizadas CTMs da MC em P1 e CTMs do vilão em P5, por terem apresentado melhor perfil de expressão das citocinas de interesse hematopoiético. Para isso foi preparado um *pool* de CTMs para o vilão e outro para a membrana coriônica. Cada *pool* foi preparado a partir de três placentas diferentes. Entretanto, da mesma placenta que foi obtido o vilão, também foi obtida a membrana coriônica, para evitar a variabilidade biológica entre elas. Alíquotas destas CTMs, devidamente caracterizadas como descrito no item 4.5.1, foram congeladas em P0 e posteriormente descongeladas e cultivadas em placas de 24 poços ( $3,0 \times 10^4$  células por poço) com meio IMDM suplementado com 10% de SFB. Uma vez atingido o grau de confluência, o meio foi removido e foram adicionadas  $10^4$  CTPHs ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de IMDM suplementado com 10% de SFB. As co-culturas foram mantidas em estufa durante 7 dias, a  $37^\circ\text{C}$ , com ar atmosférico suplementado com 5%  $\text{CO}_2$  e umidade do ar superior a 95%. No quarto dia da cultura foram acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de IMDM suplementado com 10% de SFB. As co-culturas foram realizadas em triplicatas acompanhadas de controle, nas mesmas condições, porém, sem a monocamada de CTMs.

Após o período de incubação, o meio com as células em suspensão foi removido e foram realizadas três lavagens dos poços de cultura para remoção completa das CTPH. A seguir foi procedida a contagem de células nucleadas totais (CNT), a avaliação do potencial clonogênico e a análise por citometria de fluxo. A contagem do total de células nucleadas foi realizada em câmara de Neubauer. O potencial clonogênico foi avaliado conforme descrito no item 4.5.6, semeando-se o equivalente a 1% das CTPHs inicialmente co-cultivadas, ou seja, o equivalente a  $1,0 \times 10^2$  CTPHs. Para o controle foi semeado o equivalente a 7,5% das CTPHs inicialmente co-cultivadas, ou seja, o equivalente a  $7,5 \times 10^2$  CTPHs. Estes valores foram estabelecidos em um experimento piloto realizado previamente. A citometria foi procedida conforme descrito no item 4.5.4. Neste procedimento também foi incorporado o anticorpo anti-CD38 (Tabela 4) para avaliar a proporção de progenitores mais jovens  $\text{CD}34^+38^-$  e a avaliação da viabilidade por citometria de fluxo com o corante de ácidos nucleicos 7-AAD. Os mesmos procedimentos de análise foram realizados nas

CTPHs pré e após a co-cultura, exceto a viabilidade com a 7-AAD, realizada somente nas células expandidas após o co-cultivo.

O resultado das análises das CTPHs poderia ficar comprometido caso estas aderissem ou assim permanecessem durante a etapa de remoção do meio sobrenadante. Para certificar-se quanto a não ocorrência de tal adesão, as células aderidas foram tratadas com tripsinisa 0,05% e submetidas à marcação com anti-CD45 (Tabela 2), conforme descrito no item 4.5.1.2. Uma vez que as CTMs não expressam CD45 e as CTPHs ou células mais diferenciadas da linhagem hematopoiética mielóide são positivas para tal marcador, este procedimento demonstra, caso ocorra, a permanência de outras células aderidas que não sejam CTMs.

Os dados deste experimento (CNT, citometria, potencial clonogênico) foram utilizados para calcular a expansão das CTPHs em relação aos controles e à inicial (expansão absoluta), nas condições de cultivo utilizadas.

Os procedimentos constantes deste tópico foram realizados em três experimentos independentes (CTPHs de três doadores, em momentos diferentes).

#### **4.5.8.2 Expansão em ambiente 3D**

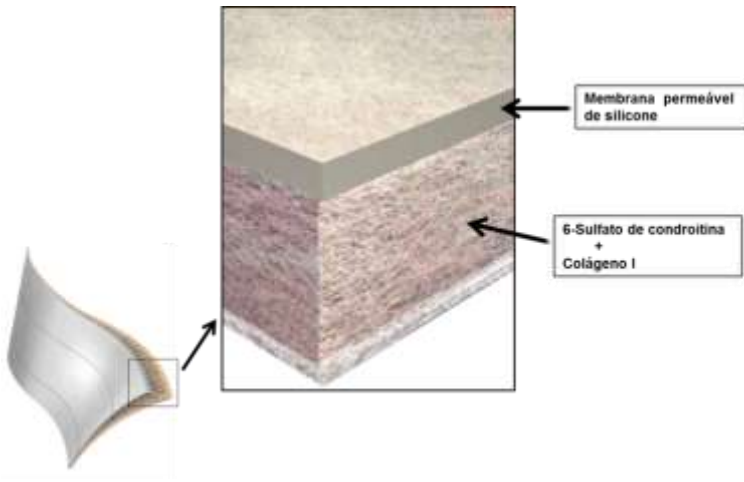
A expansão *ex vivo* de CTPH em ambiente 3D foi realizada sobre matriz de origem comercial (Integra<sup>®</sup>, Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, EUA) comumente utilizada como matriz de regeneração dérmica (MRD). A adesão, migração, e proliferação de CTMs neste ambiente 3D foram investigadas no Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual -CCB-UFSC (LACERT) onde as condições de cultura foram verificadas (JEREMIAS, 2013).

A MRD Integra<sup>®</sup> é um arcabouço constituído de uma camada de silicone com 0,1 mm de espessura e uma matriz porosa de colágeno I entrelaçado com o glicosaminoglicano 6-sulfato de condroitina (Figura 4), com poros de aproximadamente 80 µm de diâmetro (BURKE *et al.*, 1981; INTEGRA, 2012). O colágeno I é obtido de tendão bovino e o 6-sulfato de condroitina de cartilagem de tubarão.

A expansão foi realizada nas mesmas condições gerais descritas no item 4.5.8.1, com as seguintes modificações: foram recortados fragmentos da matriz adequados ao formato dos poços da placa de cultura (placa de 24 poços) utilizando-se a extremidade de um tubo cônico de vidro de 14 mm diâmetro interno e previamente esterilizado. A matriz foi então lavada 3x por imersão em meio IMDM suplementado



com 10% de SFB, sendo que na terceira lavagem permaneceu 10 min no mesmo. Os recortes de matriz foram depositados no fundo do poço de placas de 24 poços onde seria realizada a co-cultura. A seguir  $5 \times 10^4$  CTMs, ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de IMDM suplementado com 10% de SBF foram distribuídas sobre a matriz e incubadas por duas horas a 37 °C, com ar atmosférico suplementado com 5%  $\text{CO}_2$  e umidade do ar superior a 95%. Decorrido este período foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  de meio e as culturas foram incubadas por 7 dias com troca de meio no quarto e sétimo dias. O meio foi removido e, então, foram adicionadas as CTPHs, como descrito no item 4.5.8.1 nos poços para o ensaio em ambiente 2D. Para a cultura e co-cultura em ambiente 3D, as CTPHs foram ressuspensas em 50  $\mu\text{L}$  de meio IMDM, semeadas diretamente sobre a matriz 3D, subsequentemente foram adicionados 450  $\mu\text{L}$  de IMDM suplementado com 10% de SFB. No terceiro dia da cultura foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de meio e no quinto dia foram cuidadosamente removidos 500  $\mu\text{L}$  do meio sobrenadante e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de meio novo. O meio removido foi centrifugado e observado ao microscópio óptico de luz visível para certificar de que não haviam sido removidas células da cultura durante este procedimento. Estes procedimentos foram comuns às culturas em 2D e 3D. No oitavo dia de cultura as CTPHs foram removidas da co-cultura em ambiente 2D como descrito no item 4.5.8.1. Nas culturas e co-culturas em 3D, as CTPHs foram removidas pela lavagem (3 vezes) da matriz fazendo-se um fluxo com o meio de cultura utilizando uma micropipeta. As análises pré e pós-expansão foram as mesmas descritas no item 4.5.8.1.



**Figura 4.** Representação esquemática da MRD Integra<sup>®</sup>, adaptada de Integra (2012).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente empregando-se os softwares GraphPad Prism 5 para Windows, versão 5.01 e SPSS para Windows, versão 17.0. O coeficiente de correlação de Pearson (dados que passaram no teste de normalidade) ou de Spearman (*Speraman rank correlation test* – dados que não passaram no teste de normalidade) foram utilizados para avaliar a associação entre os fatores materno fetais e os dados laboratoriais do SCUP e da expansão *ex vivo*, ou entre os próprios dados laboratoriais. As associações que apresentaram significância estatística foram estratificados segundo a média ou mediana do fator preditor e analisada a significância da diferença entre os dois grupos. Os testes não paramétricos de Mann Whitney, de Friedman e de Kruskal-Wallis (os dois últimos com o pós-teste de Dunn), o teste paramétrico “t” não pareado e a regreção linear simples, foram utilizados para as demais análises. O teste de Mann Whitney e o teste “t” não pareado para análise de medidas não repetidas de dois grupos e o de Kruskal-Wallis para as medidas não repetidas de três ou mais grupos, enquanto o de Friedman foi utilizado para as medidas repetidas de três ou mais grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de *p* obtidos foram menores que 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS MATERNO-FETAIS E OBSTÉTRICAS REFERENTES ÀS DOAÇÕES

Os dados materno-fetais e obstétricos referentes às doações que atenderam aos critérios de inclusão no estudo estão descritos na tabela 5.

**Tabela 5.** Características materno-fetais e obstétricas referentes às doações de placenta e SCUP.

	<b>n</b>	<b>média ±SD</b>	<b>mínimo</b>	<b>máximo</b>
Idade maternal (anos)	15	27,1 ±8,2	18	43
Idade gestacional (semanas)	15	39,5 ±1,7	36	42
Peso placentário (gramas)	15	602,5 ±97	480	825
Peso RN (gramas)	15	3265 ±596	1920	4485
Parto cesariana	6	-	-	-
Parto vaginal	9	-	-	-
RN feminino	7	-	-	-
RN masculino	8	-	-	-
Raça RN Br	14	-	-	-
Raça RN N	1	-	-	-

Os critérios de inclusão das doadoras no estudo permitiram a triagem de amostras de gestações clinicamente saudáveis. Uma vez preenchidos estes critérios, as amostras foram obtidas de acordo com a necessidade de desenvolver os experimentos, sem qualquer direcionamento quanto às características materno-fetais ou obstétricas como tipo de parto, uso ou não de indutores, etc. Predominaram os partos vaginais (60%) conforme descrito na literatura para nascimentos ocorridos em dois hospitais públicos (58,9 e 59,3%) no sul do Brasil (REIS et al., 2009), em contraste com a taxa de 20,2% do Banco de SCUP do Hospital Israelita Albert Einstein e a taxa nacional (20,3%) no serviço de saúde suplementar (BRASIL-MS-ANS, 2006). Quanto à raça, houve marcado predomínio de RN brancos, refletindo a distribuição de raças na população catarinense que tem a maior proporção de habitantes da raça branca (84%) do Brasil e a menor proporção de habitantes da raça negra (2,9%) (IBGE, 2010).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs DA MEMBRANA CORIÔNICA E DO VILO

### 5.2.1 Caracterização morfológica

As CTMs apresentam a propriedade de aderirem ao plástico, a qual é útil no processo de isolamento das mesmas em cultivo. Aderidas ao plástico, as CTMs apresentam morfologia fibroblastóide com crescimento em monocamada (MONTESINOS *et al.*, 2009). Estas características foram observadas nas culturas realizadas nesse estudo, tanto com CTMs da MC quanto do vilô e não somente nas passagens objeto da pesquisa (P1, P5 e P10), conforme as imagens das figuras 5 e 6, mas em todas as passagens (P1 a P10) analisadas durante os procedimentos de expansão e manutenção das mesmas (dados não transcritos).



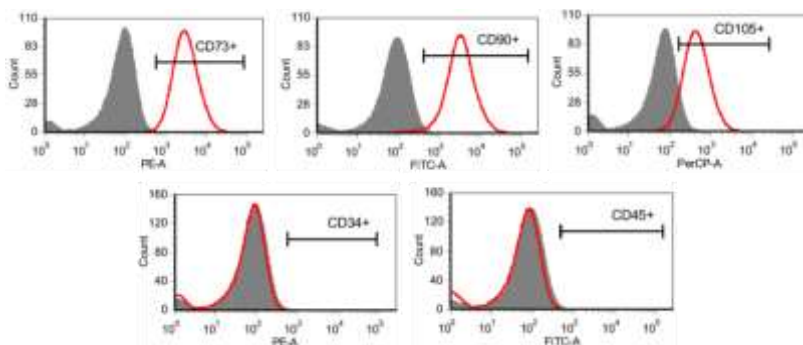
**Figura 5.** Imagens representativas das CTMs isoladas da membrana coriônica em P1, P5 e P10. P1 e P10 em grau de confluência de 100% e P5 em 50 a 70%. (Contraste de fase, amplificação de 40x).



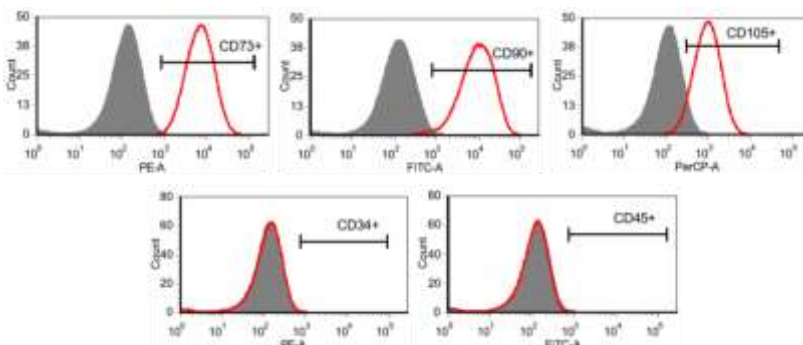
**Figura 6.** Imagens representativas das CTMs isoladas do vilô em P1, P5 e P10. P1 e P10 em grau de confluência de 100% e P5 em 50 a 60%. (Contraste de fase, amplificação de 40x).

## 5.2.2 Caracterização imunofenotípica

As CTMs da membrana coriônica e do vilão demonstraram um perfil positivo para a expressão dos antígenos de superfície CD73, CD90 e CD105 e negativo para a expressão dos antígenos CD34 e CD45, nas passagens analisadas (P1, P4 a P6 e P10 a P11), conforme pode ser observado nas figuras 7 e 8, e tabela 6.



**Figura 7.** Caracterização imunofenotípica das CTMs obtidas da membrana coriônica: histogramas representativos do perfil imunofenotípico das amostras em P1, P5 e P10, analisadas por citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD105-PerCP, CD34-PE e CD45-FITC (aquisição de pelo menos  $10^4$  eventos).



**Figura 8.** Caracterização imunofenotípica das CTMs obtidas do vilão: histogramas representativos do perfil imunofenotípico das amostras em P1, P5 e P10, analisadas por citometria de fluxo, para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD105-PerCP, CD34-PE e CD45-FITC (aquisição de pelo menos  $10^4$  eventos).

Em todos os procedimentos foram utilizados os respectivos isotipos controles bem como a funcionalidade dos anticorpos anti-CD34 e anti-CD45 foi verificada em cada experimento pelo emprego de controles positivos compostos de células mononucleares separadas por gradiente de densidade, assegurando a veracidade da não expressão dos mesmos pelas CTMs. Os resultados da imunofenotipagem corroboram os resultados obtidos na caracterização morfológica (item 5.2.1) quanto às características mesenquimais das células isoladas da membrana coriônica e do vilão.

**Tabela 6.** Dados referentes à citometria de fluxo das CTMs da membrana coriônica e do vilão, para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD105-PerCP Cy5.5, CD34-PE e CD45-FITC.

	n	CD73 X ± DP%	CD90 X ± DP%	CD105 X ± DP%	CD34 X ± DP%	CD45 X ± DP%
CTM MC <sup>a</sup>	9	98,3(1,2)	98,2(0,9)	85,4 (4,7)	0,34(0,24)	0,57(0,44)
CTM V <sup>b</sup>	9	96,6(2,2)	97,0(4,9)	86,3(6,2)	0,15(011)	0,74(0,63)

a= membrana coriônica b= vilão. As análises foram processadas nas CTMs em P1, P4 a P6 e P10 a P11, em três experimentos independentes.

Quando foi comparada a expressão dos antígenos de superfície pelas CTMs da MC e vilão não foi obtida diferença estatisticamente significativa entre as mesmas para qualquer dos marcadores utilizados ( $p > 0,05$ ).

A inexistência de diferença nestes marcadores foi observada por outros autores, mesmo com CTMs de diferentes órgãos. O perfil imunofenotípico de CTMs da MC, do âmnio e da medula óssea foi comparado analisando a expressão dos antígenos de superfície utilizados no presente estudo, entre outros marcadores (JARAMILLO-FERRADA *et al.*, 2012). Os percentuais de expressão dos mesmos na CTMs foram 91%, 98%, 97%, 0,8% e 1,5%, para CTMs da MC, 95%, 90%, 84%, 0,7% e 0,5% para CTMs do âmnio e 81%, 97%, 97%, 1,5% e 1,8% para as CTMs da medula óssea, para os marcadores CD73, CD90, CD105, CD34 e CD45 respectivamente. Poloni e colaboradores (2012) também obtiveram um perfil semelhante na expressão desses cinco antígenos em CTMs da placenta e da medula óssea.

No presente estudo as culturas foram expandidas até aproximadamente 70% da confluência para a análise do perfil imunofenotípico, visto que foi demonstrado que o grau de confluência das culturas de CTMs pode influenciar na expressão dos antígenos de

superfície (SEMENOV *et al.*, 2010). Semenov e colaboradores (2010) demonstraram que CTMs cultivadas na confluência de 50 a 70% mantiveram o perfil inicial de expressão dos marcadores, mesmo quando expandidas até a vigésima passagem. Por outro lado, culturas de CTMs em alta confluência apresentaram redução na expressão de marcadores como o CD73, CD90, CD105, e CD166.

A designação de uma célula como CTM inclui também a avaliação quanto ao potencial de diferenciação da mesma para fenótipos como o osteogênico, o adipogênico e o condrogênico, completando a tríade para sua caracterização (PAROLINI *et al.*, 2008). Esta caracterização foi realizada previamente em outros trabalhos desenvolvidos no LACERT onde a capacidade de diferenciação das CTMs da membrana coriônica (HECK, 2012) e do viló foram avaliadas (MARÓSTICA, 2011) pelo cultivo das mesmas em meios indutores específicos para os fenótipos osteogênico e adipogênico. Nas pesquisas realizadas no LACERT, a diferenciação osteogênica foi demonstrada pela presença de depósitos de cálcio extracelular mediante a coloração com *Alizarin Red S* e a diferenciação adipogênica foi constatada pela presença de acúmulos lipídicos no interior das células coradas com *Oil Red O*.

As CTMs passaram então a ser analisadas quanto a capacidade de suporte à hematopoiese com foco na expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP.

### **5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS DE INTERESSE HEMATOPOÉTICO PELAS CTMs DA MEMBRANA CORIÔNICA E DO VILO**

A expressão de citocinas de interesse hematopoiético pode ser um aspecto de relevância na seleção de populações celulares para uso em sistemas de co-cultivo objetivando a expansão de CTPHs.

Nesse sentido foi avaliada a expressão gênica das citocinas IL6, SCF, TPO, IL16, Flt3-L, e SDF1 pela metodologia de PCR em tempo real, nas CTMs obtidas da membrana coriônica e do viló. As CTMs da membrana coriônica e do viló, da mesma placenta, foram cultivadas de P0 a P10. A expressão das citocinas foi avaliada nas três passagens (P1, P5 e P10) em três a quatro placentas diferentes.

A extração do RNA, síntese do cDNA e a padronização das condições de reação foram realizadas conforme descrito nos itens 4.4.4 e 4.5.2 respectivamente. Os valores obtidos para a eficiência e a

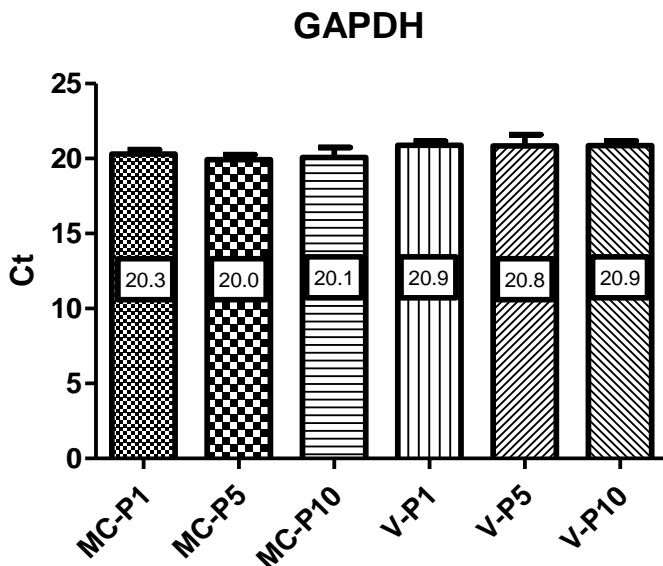
linearidade de cada par de iniciadores de interesse e do gene de referência constam da tabela 7.

**Tabela 7.** Dados referentes à eficiência e linearidade de cada par de iniciadores.

	GAPDH	IL6	SCF	TPO	IL16	Flt3-L	SDF1
Eficiência %	97	95	91	94	105	90	99
Linearidade	0,99	0,99	0,98	0,98	0,99	0,98	0,99

Curvas-padrão de cinco pontos, realizados em triplicata.

A quantificação utilizando um gene de referência como normalizador exige, além da padronização das condições de reação, que a sua expressão seja constante nas diferentes condições do experimento onde será utilizado (MANE et al., 2008; THELLIN et al., 1999). Neste estudo, a variabilidade na expressão do gene da GAPDH pelas CTMs da membrana coriônica e do vilão, nas diferentes passagens, não apresentou diferenças estatisticamente significantes (Figura 9).



**Figura 09.** Expressão do GAPDH pelas CTMs da membrana coriônica (MC) e do vilão (V) em P1, P5 e P10. As comparações entre todas as passagens e tecidos não apresentaram resultados estatisticamente significantes ( $p = 0,46$  - Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns).



Para o presente estudo, quando o Ct do gene alvo foi superior a 35 ciclos a expressão foi considerada negativa para aquela citocina, naquela amostra.

Os resultados deste estudo demonstraram que as CTMs da membrana coriônica e do vilão expressam citocinas de interesse hematopoiético (Tabela 08 e Figuras 10, 11 e 12). De um modo geral a expressão apresentou elevada variabilidade entre as diferentes placentas (dados não mostrados). A expressão de IL6, foi elevada e crescente com as passagens nas CTMs da membrana coriônica e decrescente nas CTMs do vilão (Figuras 10 e 11 respectivamente). A expressão de IL6 apresentou o menor Ct entre todas as citocinas quantificadas (média de 23,59 ciclos para as CTMs da MC, de todas as passagens e 26,19 para as CTMs do vilão, de todas as passagens), considerando todas as amostras e passagens analisadas. Além disso, destaca-se a expressão de Flt3-L e TPO na membrana coriônica em P1, quando comparada com as demais passagens da mesma (Figura 10).

Embora diferenças metodológicas quanto a obtenção das CTMs, cultivo (tempo de cultivo, meio utilizado, densidade celular), momento da coleta (passagem, tempo de cultura para remoção do sobrenadante), metodologias empregadas na detecção e no modo de expressão dos resultados, são fatores que dificultam a comparação quantitativa entre os diferentes estudos, a IL6 é uma das citocinas de interesse hematopoiético com expressão gênica e secreção proteica mais abundante e constante (HWANG *et al.*, 2009), em acordo com os resultados obtidos para a sua expressão gênica na presente pesquisa.

Ainda que a expressão gênica não represente necessariamente a secreção de uma proteína ou a existência de equivalência entre ambas (BERTHO *et al.*, 2008), os resultados da PCR em tempo real e da detecção por enzimaímunensaio para a IL6 e IL8 obtidos de CTMs de placenta (n= 10) se corroboraram (ABUMAREE *et al.*, 2013). Ambas citocinas demonstraram expressão gênica forte na definição dos autores (Ct < 29 ciclos) e resultados detectáveis por enzimaímunensaio (294 pg/mL e 254 pg/mL). Neste mesmo estudo, a expressão gênica da IL16 foi considerada fraca (Ct > de 35 ciclos), mas não foi possível saber se não foi realizada ou não foi detectada na análises por enzimaímunensaio. Para a expressão gênica, as CTMs foram coletadas na primeira passagem, com 75% de confluência e para as análises por enzimaímunensaio, após 48 h de cultivo na mesma passagem, porém na densidade de  $2 \times 10^6$  células por poço, em placa de 6 poços. No entanto, a pesquisa não deixa claro quanto a dissecação da membrana

coriônica e isolamento de células somente do viló ou se foi conduzida com CTMs de ambas as regiões da placenta.

Poloni e colaboradores (2012), avaliaram a secreção de citocinas por CTMs obtidas do líquido amniótico de gestações com 15 a 28 semanas, da membrana coriônica ou viló ou ambas (não está claro) de gestações de 11 a 13 semanas e da medula óssea de adultos, em diferentes condições de cultivo (SBF, soro halogênico e lizado de plaquetas). Os resultados foram expressos em picogramas por mL de meio, por  $10^6$  células e em culturas confluentes. Dentre as citocinas avaliadas, as de maior interesse para a hematopoiese foram a IL6 com valores entre 500 e 5000 pg por mL, por  $10^6$  células, para as CTMs de todas as fontes, cultivadas em SBF, o GM-CSF com valores entre 50 e 500pg e o G-CSF com valores considerados negativos ou inferiores a 50pg, nas mesmas condições de cultivo e expressão dos resultados (n= 3 amostras). A secreção de interleucina 8 (IL8) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foram superiores a 5000pg por mL, por  $10^6$  células. A secreção de IL6 e IL8 pode estar relacionada a propriedade imunoreguladora da placenta enquanto o VEGF a sua propriedade angiogênica. Os resultados destas citocinas mencionadas não demonstraram diferença entre CTMs das diferentes origens, quando cultivadas em SBF. No entanto, a amplitude das faixas para discriminar os níveis de secreção (10 vezes, ex. 50 a 500pg) pode ter encoberto as diferenças na secreção entre os tecidos.

Ostanin e colaboradores analisaram a secreção de interleucinas no meio de cultura em CTMs em confluência (passagem 2), de 4 amostras de placentas obtendo valores de 13.400 pg/mL para IL6, 376 pg/mL para GM-CSF, 277 pg/mL para o G-CSF, 4.500 pg/mL para a IL8, 4.980 pg/mL para VEGF. Quando comparados com os níveis secretados pelas CTMs da medula óssea e tecido adiposo, não foram obtidas diferenças significantes, exceto para o GM-CSF que foi mais elevado no último. Na expressão dos resultados os autores não relatam a normalização pelo número de células.

Dados da quantificação da TPO, SDF1, SCF e Flt3-L são menos frequentes. A produção de TPO, SDF1 G-CSF, GM-CSF, IL6 pelas CTMs da medula óssea e do cordão umbilical foi comparada pela concentração no sobrenadante de culturas após 24 h da última troca do meio, em quatro experimentos independentes (FRIEDMAN *et al.*, 2007). Não foram observadas diferenças significantes nos níveis de TPO entre as duas fontes de CTM. Por outro lado, as CTMs do cordão umbilical secretaram concentrações significativamente maiores de G-

CSF, GM-CSF e IL6, do que as CTMs da medula óssea, enquanto que estas secretaram significativamente mais SDF1.

O SCF foi detectado em PCR de ponto final nas CTMs do âmnio e da MC (RUS CIUCĂ *et al.*, 2011), do cordão umbilical e da medula óssea (LIU *et al.*, 2010). A produção e secreção de Flt3-L foi demonstrada por ensaio imunoenzimático em CTMs da MO (BERTHO *et al.*, 2008). Além disso foi determinada a concentração intracitoplasmática no lisado das CTMs e a expressão gênica, permitindo concluir que a sua síntese é controlada por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais.

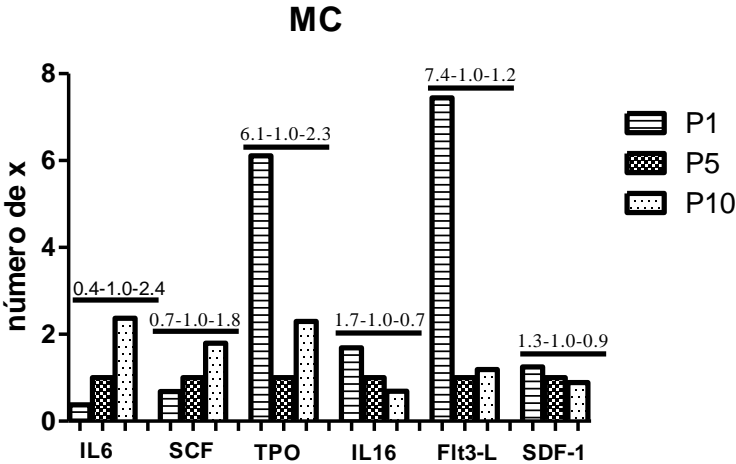
No presente estudo foi demonstrada a expressão gênica deste conjunto de citocinas que atuam nos estágios precoces da hematopoiese, em CTMs de duas origens diferentes da placenta (MC e vilão), que tem demonstrado cada vez mais evidências de serem sítios hematopoéticos (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; DZIERZAK; ROBIN, 2010; ROBIN *et al.*, 2009). Além disso, a expressão foi determinada nas CTMs das duas origens obtidas das mesmas doadoras, evitando variabilidade interindividual. A medida foi realizada em três passagens (P1, P5 e P10), e analisadas de forma pareada. A expressão gênica de cada citocina foi mensurada num mesmo experimento para todas as passagens, o que contribui para a redução na variabilidade analítica.

**Tabela 08.** Valores comparativos, em número de vezes, da expressão gênica de citocinas pelas CTMs obtidas da MC e do vilão, nas diferentes passagens, calculados pelo método de Pfaffl.

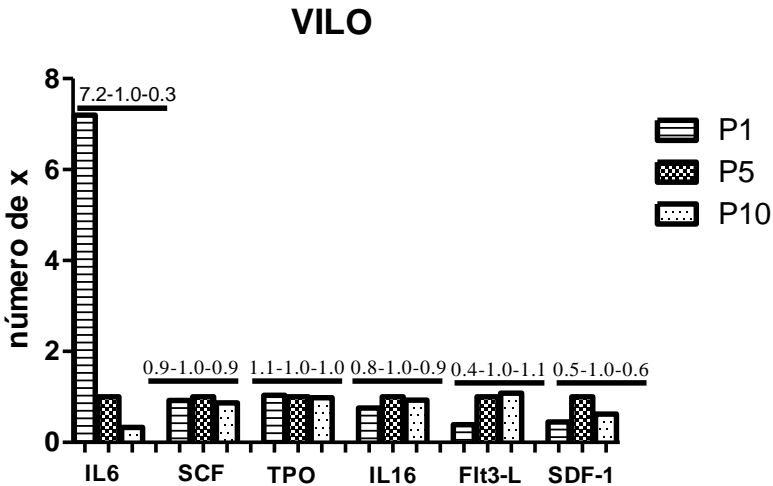
Citocina	MC (média)				Vilão (média)			
	P1	P5	P10	mín-máx	P1	P5	P10	mín-máx
IL6	0,38	1	2,37	-5,4 – 2,95	7,2	1	0,33	-7,5 - 25,5
SCF	0,68	1	1,8	-3,6 – 3,34	0,92	1	0,87	-3,9 – 1,5
TPO	6,11	1	2,3	-3,7 – 11,2	1,04	1	0,98	-1,2 – 1,2
IL16	1,69	1	0,69	-3,6 – 2,9	0,76	1	0,93	-3,5 – 1,4
Flt3-L	7,44	1	1,19	-2,6 – 11,1	0,39	1	1,08	-4,3 – 1,3
SDF1	1,25	1	0,89	-4,2 – 2,2	0,45	1	0,62	-6,6 – 2,4

n (MC)=3, em triplicata; n (vilão)=4, em triplicata

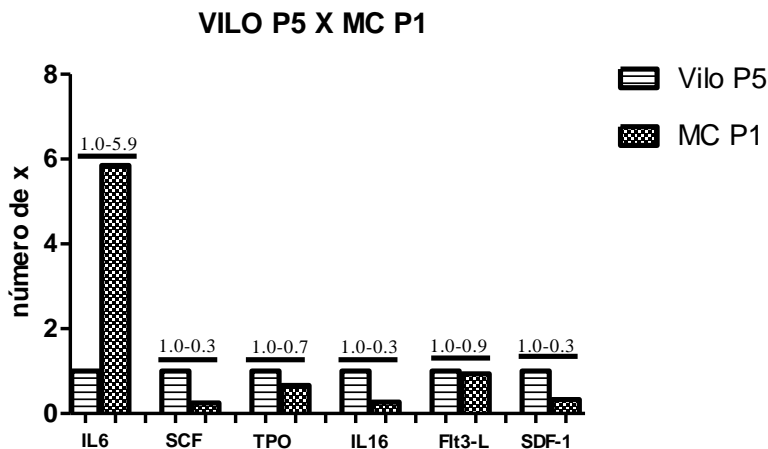
Além do cálculo comparativo pelo método de Pfaffl, foi analisada estatisticamente (Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns) a relação Ct do gene normalizador (GPDH) / Ct do alvo (citocina), entre as diferentes passagens de cada tecido e entre os diferentes tecidos. Por esta metodologia quanto maior a relação Ct (GPDH) / Ct (citocina),



**Figura 10.** Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético, pelas CTMs da membrana coriônica (MC), em P1, P5 e P10, em três experimentos independentes. A quantificação relativa foi calculada pelo método de Pfaffl, com normalização pelo gene de referência GAPDH.



**Figura 11.** Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético, pelas CTMs do vilão, em P1, P5 e P10, em quatro experimentos independentes. A quantificação relativa foi calculada pelo método de Pfaffl, com normalização pelo gene de referência GAPDH.



**Figura 12.** Expressão gênica comparativa das citocinas de interesse hematopoiético, entre as CTMs obtidas do vilo em P5 e da membrana coriônica em P1, em três experimentos independentes. A quantificação relativa foi calculada pelo método de Pfaffl, com normalização pelo gene de referência GAPDH. As CTMs da membrana coriônica e do vilo eram obtidas da mesma placenta, em cada experimento independente.

tanto maior é a expressão da respectiva citocina. A análise quantitativa dos dados por esta metodologia corroborou os resultados da quantificação relativa pelo método de Pfaffl. Quando a expressão pelo cálculo comparativo de Pfaffl demonstrou expressão gênica maior ou menor em número médio de vezes, a relação acompanhou tais resultados sendo maior ou menor respectivamente (Tabela 09). Além disso, a diferença na expressão gênica foi estatisticamente significativa para a IL6 entre as CTMs da P1 e P10 da membrana coriônica e entre as CTMs da membrana coriônica e do vilo, ambas em P10 (Figura 13). Outra citocina que apresentou diferença estatisticamente significativa na expressão gênica foi a TPO, entre as CTMs das passagens 1 e 5 (P5) na MC (Figura 14).

A diferença estatisticamente significativa na expressão gênica da IL6 e da TPO entre as diferentes passagens não tem uma explicação lógica como a presença de endotoxinas, pois ocorreu aumento com as passagens nas CTMs da MC e redução nas do vilo e o meio e SBF utilizados foram os mesmos. Além disso, todos os materiais utilizados eram descartáveis. Entretanto, pode ter ocorrido modificações na expressão gênica durante a expansão. Por sua vez as diferenças entre as

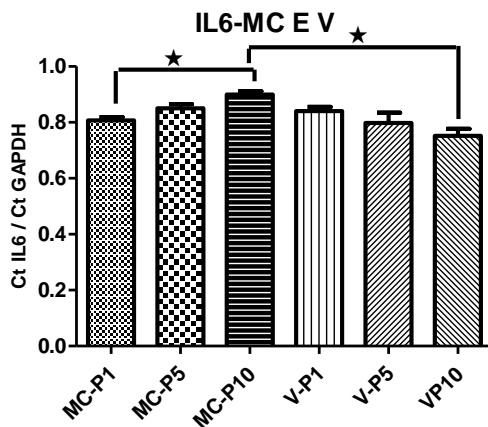
CTMs de diferentes origens pode estar relacionada à presença ou migração de precursores hematopoiéticos em cada tecido. As citocinas analisadas são parte do microambiente hematopoiético e, embora não esteja claramente estabelecido, crescem as evidências de que a placenta é um órgão hematopoiético (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; CHHABRA *et al.*, 2012; SERIKOV *et al.*, 2009). Sabe-se que nela existem precursores hematopoiéticos que tem origem no feto e persistem ao longo de toda a gestação (BÁRCENA *et al.*, 2009). Estes progenitores CD34<sup>+</sup> foram observados em maior densidade na MC nas primeiras cinco semanas de gestação e, posteriormente, estão em maior proporção no vilo (BÁRCENA *et al.*, 2011), onde foi proposta a existência de nichos hematopoiéticos (ROBIN *et al.*, 2009).

Por outro lado, a inexistência de diferença estatisticamente significativa pode não representar a ausência de relevância biológica em tal diferença, de modo que os dados da expressão de citocinas devem ser analisados em conjunto com testes funcionais como a expansão em co-cultura. Assim, foram selecionadas as CTMs da MC em P1 e as do vilo em P5 para os estudos da expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP em função do abaixo exposto.

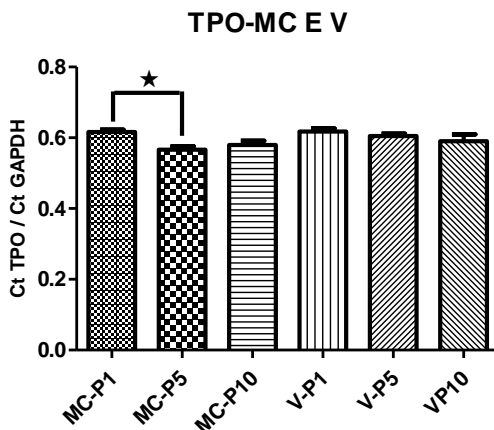
As CTMs da MC em P1 apresentaram expressão gênica maior em duas (TPO e Flt3-L) das três (SCF, TPO e Flt3-L) citocinas mais utilizadas para adição exógena na expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP (ANDRADE *et al.*, 2010; NORKIN *et al.*, 2013), quando comparadas com as passagens 5 e 10, além de expressar mais IL16 e SDF1, embora com diferença de menor proporção que nas citocinas anteriormente citadas (Figura 10).

Quanto ao vilo, as CTMs em P5 apresentaram menor expressão gênica de IL6 (7,2 vezes) que na P1, mas demonstram expressão maior (aproximadamente 2 vezes) para o Flt3-L e SDF1 e equivalente nas demais citocinas enquanto que a P10 apresentou uma expressão menor, embora discreta, em 4 citocinas e acentuada para a IL6, quando comparada com as demais passagens (Figura 11). Além disso, a expansão até a P10 demanda mais tempo e maior dispêndio de material.

Quando comparadas as CTMs das diferentes origens, MC e vilo, a expressão gênica das citocinas SCF, IL16 e SDF1 nas CTMs do vilo foi aproximadamente 3 vezes maior que nas da MC, enquanto que a da IL6 foi 5,9 vezes maior nas CTMs da MC do que nas do vilo (Figura 12). Estas diferenças podem induzir respostas biológicas diferentes quando estas células forem utilizadas em um sistema para a expansão *ex vivo* de CTPHs.



**Figura 13.** Expressão gênica da IL6, nas diferentes passagens, na MC e no viló, obtida pela relação Ct IL6 / Ct GAPDH (Teste de Friedman com pós-teste de Dunn para expressão gênica em diferentes passagens no mesmo tecido; teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn para expressão gênica entre os diferentes tecidos. \*  $p < 0,05$ ).



**Figura 14.** Expressão gênica da TPO, nas diferentes passagens, na MC e no viló, obtida pela relação Ct TPO / Ct GAPDH (Teste de Friedman com pós-teste de Dunn para expressão gênica em diferentes passagens no mesmo tecido; teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, para expressão gênica entre os diferentes tecidos. \*  $p < 0,05$ ).

**Tabela 09.** Valores da expressão gênica de citocinas pelas CTMs obtidas da MC e do vilo, nas diferentes passagens, calculados pela relação entre o Ct do gene normalizador (GAPDH) e o Ct do gene alvo (citocina).

Citocina	MC			Vilo		
	média $\pm$ SD			média $\pm$ SD		
	P1	P5	P10	P1	P5	P10
IL6	0,81 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,07	0,75 $\pm$ 0,05
SCF	0,68 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,09
TPO	0,62 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,04
IL16	0,61 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,04	0,64 $\pm$ 0,03	0,65 $\pm$ 0,03	0,63 $\pm$ 0,05
Flt3-L	0,79 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,04	0,72 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,04
SDF-1	0,68 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,03	0,66 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,07	0,67 $\pm$ 0,06

n (MC)= 3, em triplicata; n (vilo)= 4, em triplicata.

Portanto, os resultados demonstram a expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs da MC e do vilo e que o nível desta expressão apresenta diferenças entre as passagens e tecidos, as quais podem ser relevantes para a expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP.

#### 5.4 HEMATOLOGIA DO SCUP

As amostras de SCUP foram analisadas quanto aos parâmetros do hemograma, conteúdo de CTPHs e potencial clonogênico. Estas análises propiciaram avaliar qualitativa e quantitativamente as amostras do SCUP e as subpopulações dele obtidas, bem como buscar correlações com os dados materno-fetais que pudessem contribuir para a seleção de amostras mais adequadas à expansão *ex vivo* ou armazenamento em bancos de SCUP.



### 5.4.1 Hemograma do SCUP

Os parâmetros selecionados e seus dados, dentre os fornecidos pelo analisador hematológico, constam da tabela 10. Ainda que o número de amostras não corresponda a um estudo populacional, os valores médios obtidos foram próximos dos descritos na literatura, conforme tabela 11 (PRANKE *et al.*, 2001; WALKA *et al.*, 1999).

As populações dos trabalhos referidos, embora não contenham especificamente as características da estudada na presente pesquisa, provavelmente apresentem semelhanças, considerando a distribuição de raças no Estado do Rio Grande do Sul, com 83,2 % da raça branca, em Santa Catarina, com 84% na mesma (IBGE, 2010) e a existente na Alemanha.

**Tabela 10.** Parâmetros do hemograma e respectivos valores no SCUP.

Parâmetro	n	média $\pm$ SD	mínimo	máximo
E x 10 <sup>6</sup> / $\mu$ L	15	4,39 $\pm$ 0,40	3,73	5,17
Hgb g/dL	15	15,4 $\pm$ 1,3	13,1	18,2
VCM fL	15	105,4 $\pm$ 6,2	96,2	121,4
NRBC x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	14	0,74 $\pm$ 1,09	0,03	4,31
NRBC% (manual)	14	5,50 $\pm$ 5,89	0,25	19
L x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	15	13,53 $\pm$ 4,61	5,45	22,68
Gran x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	15	6,63 $\pm$ 3,07	2,49	12,58
Gran%	15	47,80 $\pm$ 12,1	27,6	64,8
MNC x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	15	6,90 $\pm$ 2,79	2,96	15,41
MNC%	15	52,2 $\pm$ 12,1	35,2	72,4
Plt x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	15	248 $\pm$ 86	96	377

E= Eritrócitos; Hgb= hemoglobina; VCM= volume corpuscular médio; NRBC= eritroblastos; L= leucócitos totais; Gran = neutrófilos + eosinófilos + basófilos; MNC = Linf + Mon Plt= plaquetas.

Os parâmetros escolhidos são clássicos na representação do conteúdo eritroide e mieloide do sangue periférico (FAILACE, R. R. *et al.*, 2009; LICHTMAN *et al.*, 2010) e estão relacionados, como a leucometria global, a critérios de qualidade na seleção de unidades de SCUP para armazenamento, transplante e predição da pega do enxerto (GLUCKMAN, E *et al.*, 2004; KUDO *et al.*, 2011; STEVENS, C. E. *et al.*, 2002). Além de permitirem a análise de correlações com os fatores materno-fetais e parâmetros como o potencial clonogênico e expansão

*ex vivo*, podem representar uma contribuição para o estabelecimento de valores de referência locais para o SCUP, ainda que a casuística seja limitada.

**Tabela 11.** Parâmetros e respectivos valores de referência para o hemograma no SCUP, obtidos na literatura.

Parâmetro	Walka (n= 123)		Pranke (n= 30)	
	média	Faixa	média	faixa
E x 10 <sup>6</sup> /μL	4.5	3.90 - 5.50	3.99	3.14 - 5.20
Hgb g/dL	15,7	12.5 - 18.2	14.5	11.9 - 17.8
VCM fL	106	105 - 113	107	99.6 - 115
NRBC x 10 <sup>3</sup> /μL	0.53	00 - 3.20	0,88	0,15 - 2,58
NRBC % (manual)	5.0	00 - 24	6.6	2.9 - 16.8
L x 10 <sup>3</sup> /μL	14.2	7.8 - 24.3	12.9	5.2 - 25.1
Gran x 10 <sup>3</sup> /μL	-	-	7.2	3.3 - 13.7
MNC x 10 <sup>3</sup> /μL	-	-	5.52	1.90 - 10.1
Plt x 10 <sup>3</sup> /μL	265	174 - 363	304	156 - 469

Gran = neutrófilos + eosinófilos + basófilos; MNC = Linf + Mon NRBC = eritroblastos. Adaptado de Wlaka e colaboradores, 1999 e Pranke e colaboradores (2001).

#### 5.4.2 Número absoluto e relativo de células CD34<sup>+</sup> no SCUP

O marcador de membrana citoplasmática CD34 é utilizado como o principal antígeno de superfície na identificação da população de CTPHs, visto que pacientes transplantados com células selecionadas por esse antígeno são hematopoieticamente reconstituídos com êxito (ACCORSI *et al.*, 2012; KISS *et al.*, 1997; RATAJJCZAK, 2008). No entanto, a expressão do antígeno CD34 ocorre em uma pequena fração do total de células nas diferentes fontes onde as CTPHs podem ser obtidas, como o sangue periférico, a medula óssea e o SCUP (BACAL *et al.*, 2001; GAJKOWSKA *et al.*, 2006; PRANKE *et al.*, 2001). Estas constituem 0,07% das MNC do SP (LANE *et al.*, 1995), o que representa aproximadamente a metade (0,035%) em termos do percentual de leucócitos totais. Na medula óssea essas células representam de 1 a 3% das MNC (SUTHERLAND *et al.*, 1993).

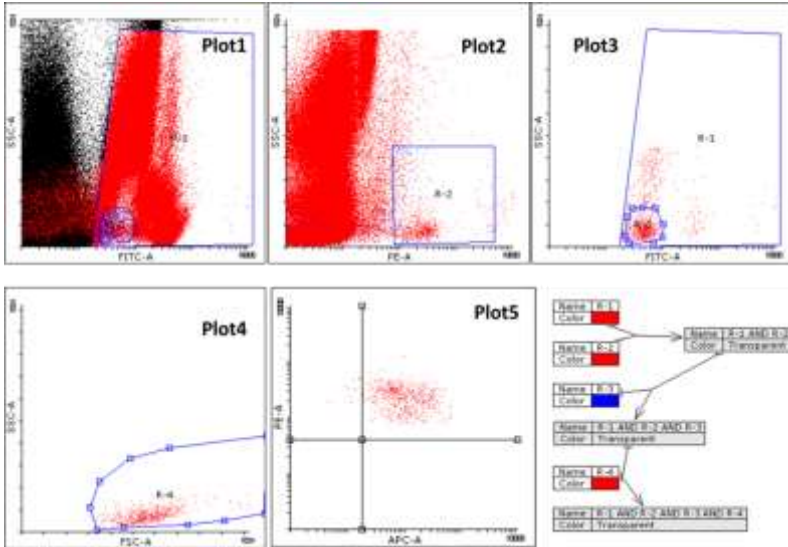
O antígeno CD34 é uma molécula altamente glicosilada e com heterogeneidade nas glicofomas dos seus epítomos. Assim, com base na sensibilidade dos epítomos à atividade enzimática da neuramidase e O-sialoprotease, os antígenos foram distribuídos em três classes diferentes

(I, II e III) (LANZA *et al.*, 2001; SUTHERLAND *et al.*, 1993; SUTHERLAND, R. D. *et al.*, 1996). Os antígenos da classe III são resistentes a ambas as enzimas e amplamente distribuídos na população de células CD34<sup>+</sup>. Uma vez que a ligação dos anticorpos é dependente da glicosilação, especialmente por moléculas de ácido siálico, a seleção de anticorpos contra essa classe do antígeno CD34 deve ser a de escolha para a quantificação relativa ou absoluta de células CD34<sup>+</sup>. Isso porque o emprego de anticorpos contra as classes I e II poderá resultar em contagens subestimadas dessas células na amostra em estudo (SUTHERLAND, R. D. *et al.*, 1996).

Outro aspecto a ser considerado na quantificação de células CD34<sup>+</sup> refere-se ao fluorocromo a ser escolhido. Para a detecção de eventos raros como ocorre com as células CD34<sup>+</sup> nas populações onde é obtida, é recomendado o emprego de fluorocromos de alto brilho, preferindo-se, por exemplo, a ficoeritrina (PE) em relação ao isotiocianato de fluoresceína (SUTHERLAND, R. D. *et al.*, 1996).

Em função do exposto acima, a quantificação das células CD34<sup>+</sup> nas amostras do SCUP, de MNC do gradiente de densidade e após seleção positiva por imunoparamagnetismo, foi utilizado o anticorpo anti-CD34 clone 581, conjugado com ficoeritrina e seguindo-se a estratégia de *gates* sequenciais restritivos conforme pode se observar na figura 15.

Os valores percentuais e absolutos da quantificação das células CD34<sup>+</sup> no SCUP, e os percentuais nas MNC do SCUP e do gradiente de densidade, assim como na fração negativa da seleção positiva para progenitores CD34, constam na tabela 12. Os valores das médias obtidas no SCUP e nas MNC nesse estudo, ainda que utilizando uma casuística restrita, foram próximos aos obtidos no estudo de Bacal e colaboradores (2001) ( $38,8 \times 10^3$  células CD34<sup>+</sup>/mL de SCUP) e Pranke e colaboradores (2001 e 2006) (0,28 % do SCUP, 0,54 % das células MNC e  $35,6 \times 10^3$  células CD34<sup>+</sup>/mL), ambos realizados no Brasil (BACAL *et al.*, 2001; PRANKE *et al.*, 2001, 2006).



**Figura 15.** Citometria de fluxo do SCUP marcado com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC. Imagem representativa das análises realizadas, seguindo a estratégia de janelas restritivas da ISHAGE/ISCT, com software Flowing. Foram adquiridos pelo menos 150 eventos positivos.

**Tabela 12.** Quantificação das células CD34<sup>+</sup> no SCUP e nas MNC do GD antes e após proceder a seleção positiva para progenitores CD34.

	$\bar{X} \pm DP$	Mínimo	Máximo
SCUP*%	0,243(0,195)	0,09	0,77
SCUP CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> **%	95.50(3,36)	91,11	99,48
SCUP CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup> **%	4.50(3,36)	0,52	8,89
SCUP x10 <sup>3</sup> /mL*	31,74(21,65)	13,89	75,46
MNC SCUP* %	0,49(0,47)	0,22	1,81
MNC GD* %	0,61(0,60)	0,17	2,07
Fração Neg** %	0,07(0,14)	0,00	0,28

\*n= 10; \*\*n= 6; Fração neg= fração das MNC da qual as células CD34<sup>+</sup> foram removidas no procedimento de seleção positiva para progenitores CD34.

### 5.4.3 viabilidade, pureza e taxa de recuperação das MNCs e CTPHS

Os dados referentes à viabilidade, pureza e taxa de recuperação das MNC separadas por GD e das CD34<sup>+</sup> obtidas por seleção positiva são apresentados na tabela 13.

A viabilidade das MNC foi avaliada como controle de qualidade do procedimento de separação pelo gradiente de densidade. Dessa forma, uma viabilidade baixa dos progenitores CD34<sup>+</sup> ao final da seleção positiva poderia ser rastreada para esclarecer qual etapa (gradiente de densidade ou seleção positiva) seria responsável pelo dano, o que comprometeria, sobretudo, a avaliação do potencial clonogênico desses progenitores. Os resultados obtidos demonstraram que em nenhuma das etapas envolvidas houve comprometimento da viabilidade celular. O processamento imediato das amostras após a coleta pode ter contribuído neste sentido, visto que o tempo decorrido entre a coleta e processamento de amostras demonstrou afetar a viabilidade das células nucleadas após o mesmo (YANG *et al.*, 2011).

A percentagem de células CD34<sup>+</sup> nas MNC do GD pré e pós-seleção positiva das células CD34<sup>+</sup> foi determinada por citometria de fluxo em alíquotas separadas para este fim, com o objetivo de analisar a perda nas diferentes etapas do procedimento de sua obtenção. A perda diferenciada de progenitores hematopoiéticos ou células mononucleares pode ocorrer durante a separação das MNC por gradiente de densidade.

Como controle de uma possível perda de células CD34<sup>+</sup> na etapa de seleção positiva das mesmas, a fração negativa resultante desta fase foi analisada quanto à presença de células CD34<sup>+</sup>. A percentagem média de perda obtida foi de 0,07%, o que corresponde a 10,3%  $([0,07\% / 0,61\% + 0,07\%] \times 100)$  do percentual total destas células nas MNC do gradiente de densidade. Pode-se sugerir que a etapa do gradiente de densidade responde pela maior parcela da perda total de 42,3% (Tabela 13) de progenitores CD34<sup>+</sup>. Essa conclusão surgiu da consideração de que a percentagem de perda até a etapa do gradiente de densidade foi de 33,6% (100-66,4) e na etapa seguinte que envolve a seleção positiva com as partículas magnéticas, ocorre a perda dos demais 8,7% (42,3% - 33,6%), o qual é aproximado do valor da perda (10,3%) obtido por citometria na fração negativa da seleção positiva com as partículas magnéticas.

Além disso, pode-se supor que no procedimento do gradiente de densidade ocorre perda de MNC sem a correspondente proporção de perda de progenitores CD34<sup>+</sup>. Isso porque o percentual destes é maior nas MNC do gradiente de densidade (0,61%) do que nas MNC do SCUP (0,49%), e a taxa de recuperação de MNC no gradiente de densidade (52,6%) é menor do que a taxa de recuperação de progenitores CD34<sup>+</sup> (66,4%) durante essa etapa (Tabelas 12 e 13).

**Tabela 13.** Média ( $\pm$  DP) da viabilidade, pureza e taxa de recuperação das MNC separadas por GD e das CD34<sup>+</sup> obtidas por seleção positiva.

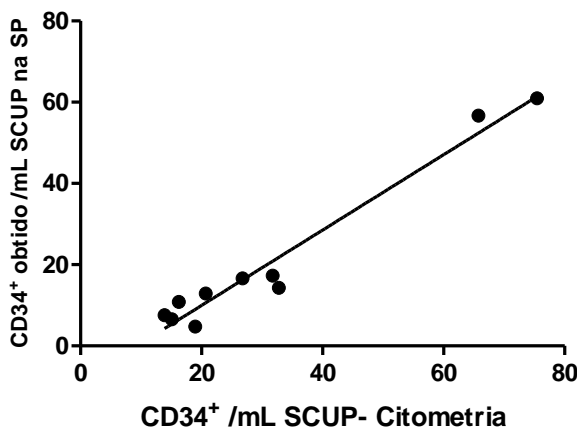
	<b>Viabilidade(%)</b>	<b>Pureza (%)</b>	<b>Recuperação até GD (%)</b>	<b>Recuperação até final (%)</b>
MNC	98,5(0,56)	91,5(12,8)	52,6(18,0)	-
CD34 <sup>+</sup>	97,9(0,74)	82,9(14,5)	66,4(28,3)	57,7(18,3)

n=15, exceto para a pureza e taxa de recuperação das células CD34<sup>+</sup> (n=10).  
GD= gradiente de densidade

O fabricante do sistema de seleção de progenitores CD34<sup>+</sup> utilizado nesse estudo não informa na bula do produto a taxa de recuperação nem a pureza dos progenitores obtidos com o mesmo, no entanto, a literatura descreve, em sistemas semelhantes (CliniMACS-Miltenyi Biotech e Baxter Isolex 300i-Baxter Healthcare Corp), valores médios de 38% a 80% para taxa de recuperação e de 22% a 81% para pureza em amostras de mobilização periférica e de SCUP (LANE *et al.*, 1995; MCNIECE *et al.*, 1998). Entretanto, a perda em algumas amostras chegou a 76% do conteúdo inicial de células CD34<sup>+</sup>.

Os valores obtidos na contagem de progenitores CD34<sup>+</sup> /mL de SCUP por citometria e pela metodologia da seleção positiva foram analisados estatisticamente para verificar a correlação entre os ambos, conforme figura 16.

Pode-se expressar que a metodologia pela seleção positiva demonstrou boa correspondência com a citometria de fluxo visto que, estatisticamente, 96,23% ( $R^2$ ) da variabilidade ocorrida nos valores de CD34<sup>+</sup> obtidos pela seleção positiva podem ser explicados pela variabilidade nos valores de CD34<sup>+</sup> obtidos pela citometria de fluxo no SCUP.

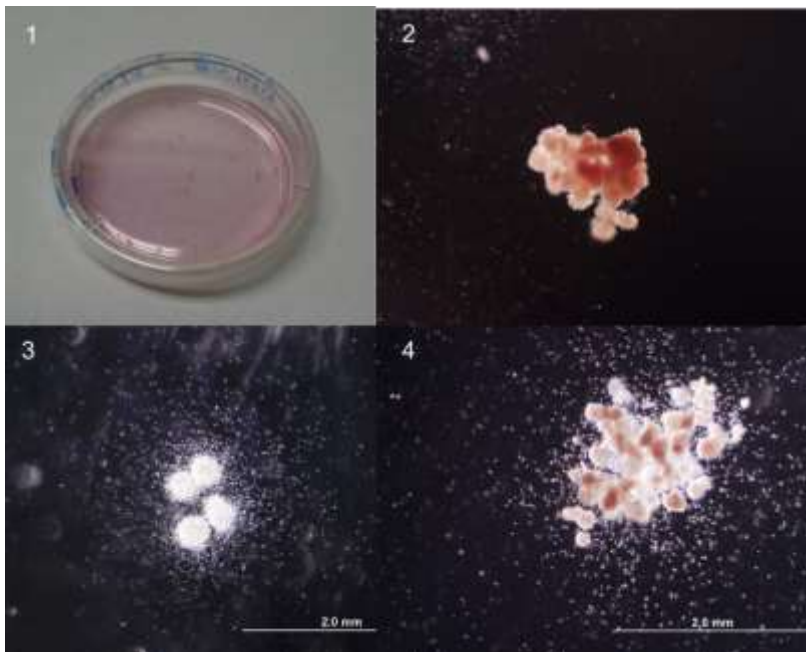


**Figura 16.** Correlação entre o número de progenitores CD34<sup>+</sup>/mL do SCUP, obtido por citometria de fluxo e o obtido pelo sistema de seleção positiva com partículas magnéticas. ( $r=0,9802$ ;  $R^2=0,9623$ ;  $p<0,0001$ ).

Entretanto, a análise pelo teste t pareado dos valores obtidos para contagem de células CD34<sup>+</sup> pela citometria e pela seleção positiva, demonstrou diferença significativa entre os mesmos ( $p<0,0001$ ). Estes resultados estão de acordo com a literatura que relata perdas no procedimento de seleção positiva que vão até 76% das células CD34<sup>+</sup> inicialmente existentes na amostra (MCNIECE *et al.*, 1998). Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que a perda de células CD34<sup>+</sup> no procedimento de separação, com a metodologia empregada, é reprodutível e significativa.

#### 5.4.4 Potencial clonogênico das CTPHs do SCUP

O potencial clonogênico é um dos melhores testes para avaliar o potencial hematopoiético do SCUP (QUEROL *et al.*, 2010). Para avaliar o potencial clonogênico das CTPHs do SCUP no presente estudo, foram realizados ensaios de formação de colônias conforme descrito no item 4.5.6. As colônias foram classificadas em 3 tipos (BFU-E, UFC-GM e UFC-GEMM), conforme figura 17. Os valores para cada tipo e proporção no total de colônias, constam na tabela 14. Os dados representam as médias obtidas de 15 doadores ( $n=15$ ), realizados em duplicata. Todas as contagens foram realizadas pelo mesmo observador.



**Figura 17.** Culturas de CTPHs ( $7,5 \times 10^2$  células por placa) do SCUP, após 12 a 14 dias de cultivo em meio semissólido H4434 (StemCell Technologies). 1. Visualização macroscópica da distribuição e densidade de colônias e da hemoglobinizacão das colônias de precursores eritróides. 2. Colônia BFU-E com pelo menos 13 *clusters* e bom grau de hemoglobinizacão. 3. Colônia UFC-GM, com 4 *clusters* e crescimento centrífugo. 4. Colônia UFC-GEMM, com pelo menos 15 *clusters* eritróides distribuídos na região central da mesma e migração centrífuga de outras linhagens. Amplificação de 40x.

A porcentagem de cada tipo de colônia em relação ao total foi calculada para cada experimento separadamente. A proporção de precursores eritróides foi ligeiramente superior aos mielóides. O bulário do produto (human colony-forming cell assays using MethoCult® Technical Manual, version 3.0, October 2004, 48 pg) não relata os valores de referência para o ensaio de formação de colônias com células  $CD34^+$  do SCUP, mas somente para MNC deste tipo de amostra. Neste caso são referidos valores médios, por  $10^5$  MNC, de 113, 115 e 25 para BFU-E (incluindo UFC-E), UFC-GM (UFC-M e UFC-G inclusas) e UFC-GEMM respectivamente ( $n=16$ ) (STEMCELL TECHNOLOGIES, 2009).



**Tabela 14.** Média, valor mínimo e máximo de UFCs no SCUP.

	<b>BFU-E</b>	<b>GM</b>	<b>GEMM</b>	<b>Total de UFC</b>
/10 <sup>3</sup> células CD34 <sup>+</sup>	154,5 (62-248)	136,3 (95-212)	22,4 (0,67-49)	313,2 (168-480)
% do total UFC	48,4 (35,2-65,6)	44,6 (34,2-58,9)	6,96 (0,31-14,2)	100
/mL SCUP*	4507 (1544-12300)	4326 (1703-10187)	740,2 (10,9-1556)	9773 (3521-23340)

n=15; \*n=10. Cultivo em meio semissólido H4434 (n= 12) ou H4437 (n= 3) ambos StemCell Technologies, por 12 a 14 dias, em duplicata.

Os dados do potencial clonogênico são de difícil comparação tendo em vista diferenças no tipo celular cultivado (células monocucleares na maioria das vezes) e fonte dos mesmos (medula óssea, leucoafereze, pós-congelamento, pós-processamentos nos bancos de sangue de cordão, etc), na contagem das colônias (apenas do número total ou de colônias UFC-GM), no tipo de meio utilizado (diferentes suplementos, especialmente ausência de EPO), no procedimento de cultivo e na forma de expressão dos resultados (total por unidade de SCUP, incremento em percentual ou número de vezes sem relatar um valor numérico de colônias) (CAIRO *et al.*, 2005; KUDO *et al.*, 2011; PAGE, K. M. *et al.*, 2011; SMAGUR *et al.*, 2012; WU, J. Y. *et al.*, 2006).

Quando comparado os dados dos ensaios clonogênicos obtidos com células CD34<sup>+</sup> do SCUP no presente estudo (Tabela 14) com os obtidos com células CD34<sup>+</sup> da medula óssea (54, 64, 2 e 120 para BFU-E, UFC-GM, UFC-GEMM e UFC total, por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> respectivamente), com o mesmo meio de cultura e forma de expressão dos resultados (STEMCELL TECHNOLOGIES, 2009), as primeiras demonstraram maior potencial clonogênico, de acordo com o referido na literatura (STEEN *et al.*, 1994) e evidenciam o corrente na mesma de que, embora CTPHs do SCUP, da medula óssea e do sangue periférico sejam todas consideradas adultas, existem importantes diferenças entre elas como a capacidade de autorrenovação, proliferação e diferenciação

(DOULATOV *et al.*, 2010; SILVA, CLÁUDIA LOBATO DA *et al.*, 2009; THEUNISSEN; VERFAILLIE, 2005).

Ademais, assim como para os dados do hemograma e os da citometria, os dos ensaios clonogênicos também representam uma contribuição para o estabelecimento de valores de referência locais para o SCUP.

Além disso, os dados do hemograma, da citometria de fluxo e dos ensaios clonogênicos, junto com os dados materno-fetais, podem ser úteis no estabelecimento de associações que possam contribuir para a seleção de amostras de SCUP com melhores propriedades para armazenamento e em especial para expansão *ex vivo* das mesmas.

## **5.5 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE FATORES MATERNO-FETAIS E PARÂMETROS LABORATORIAIS QUALITATIVOS DO SCUP E ENTRE OS DADOS DO CONTEÚDO DO SCUP**

Desde que o primeiro transplante de sangue de cordão umbilical foi realizado em 1988 (GLUCKMAN, E *et al.*, 1989) diversos estudos têm pesquisado características associadas ao doador ou ao conteúdo do SCUP objetivando estabelecer critérios para a seleção e armazenamento de unidades que pudessem contribuir para a sua utilização em transplantes (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013; HIETT *et al.*, 1995; WEN *et al.*, 2012). Em última análise, buscava-se selecionar unidades de SCUP que produzissem os melhores resultados quanto à pega do enxerto e reconstituição hematopoiética dos indivíduos transplantados.

Nesse sentido a idade materna, idade gestacional, peso da placenta, peso e sexo do RN, tipo de parto e a técnica de coleta do SCUP têm sido investigados como fatores preditores materno-fetais e obstétricos que influenciam no conteúdo de unidades de sangue de cordão umbilical e placentário (USCUP) a serem armazenadas (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013; CAIRO *et al.*, 2005; PAFUMI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2011; SOLVES *et al.*, 2004; SOLVES *et al.*, 2005). O volume de SCUP obtido, total de células nucleadas, total de células CD34<sup>+</sup>, a viabilidade pré e pós-congelamento, assim como o potencial clonogênico são características do SCUP exploradas para sua seleção, armazenamento e transplante (BARKER *et al.*, 2010; BRAND *et al.*, 2008; GLUCKMAN, E. *et al.*, 2004; PAGE *et al.*, 2011; WAGNER, J. E. *et al.*, 2002).

Estes estudos, por razões práticas, têm se focado na influência das características materno-fetais e obstétricas sobre os quantitativos totais

das USCUP, a fim de determinar a dose celular ou de UFC por kg de peso do paciente, que uma dada unidade contém para o transplante. Contudo, poucos estudos (WEN *et al.*, 2012) têm investigado fatores que possam influenciar, numa perspectiva qualitativa, nas proporções dos parâmetros internos do SCUP. Por exemplo, no número de células nucleadas ou de colônias por mL do SCUP em vez do número total por unidade deste. O número total de células ou de UFC por USCUP pode, muitas vezes, ser mais dependente do volume total obtido na doação do que da concentração celular ou de UFC por unidade de volume (mL). Em consequência dos critérios estabelecidos com base nos valores absolutos das USCUP, muitas delas são descartadas por não atenderem a tais exigências.

A taxa de descarte de USCUP pode representar até 62% das unidades coletadas dependendo do valor estabelecido para o critério total de células nucleadas (QUEROL *et al.*, 2009). No BSCUP de Valência (Espanha) 30,8% das unidades coletadas são descartadas devido à baixa contagem celular absoluta (SOLVES *et al.*, 2004) e no de Guangzhou (China) 51,9% das unidades são rejeitadas, sendo 64,1% em razão do baixo volume ou contagem celular (WU, J. Y. *et al.*, 2006).

Entretanto, uma USCUP descartada por não atingir o volume mínimo para armazenamento pode ser adequada para a expansão *ex vivo* ou até melhor do que aquelas que atenderam a este critério, demonstrando melhores contagens por mL ou potencial clonogênico, taxas de expansão em co-cultura mais elevadas para contagem das CNT, células CD34<sup>+</sup> e UFCs, do que as unidades armazenadas. As unidades descartadas, assim como as armazenadas, podem apresentar diferenças na capacidade para expansão. Desse modo foram avaliados aspectos qualitativos das amostras de SCUP, bem como fatores que pudessem estar relacionados com a capacidade para expansão.

Portanto, este tópico visou analisar a influência de fatores materno-fetais e parâmetros laboratoriais do SCUP que pudessem contribuir para avaliar e selecionar amostras do mesmo pela perspectiva qualitativa, focando-se especialmente na possibilidade de expansão *ex vivo* de unidades de SCUP que seriam descartadas nos respectivos bancos pelo critério de valores absolutos.

Uma vez que o presente estudo está focado na influência dos fatores materno-fetais sobre aspectos qualitativos do SCUP, foram considerados os parâmetros do hemograma por mL, as células CD34<sup>+</sup> e subpopulações por mL e percentagem, as UFC por mL, número por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> e proporção de cada tipo.

As características materno-fetais foram apresentadas na tabela 5, no item 5.1.

Os resultados das correlações de Pearson e Spearman que apresentaram significância estatística entre os fatores materno-fetais e parâmetros laboratoriais do SCUP, assim como entre os próprios parâmetros laboratoriais, estão descritos na tabela 15. As correlações entre fatores e alguns parâmetros considerados de maior impacto para a qualidade do SCUP e que não apresentaram significância estatística, constam na tabela 16.

A idade materna e o peso da placenta não apresentaram correlação significativa com qualquer parâmetro analisado. Estudo realizado na Jordânia com dados materno-fetais de 200 partos (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013) e nos EUA, com dados de 1.269 partos (BALLEN, K K *et al.*, 2001), ambos em mulheres com idade de 18 a 44 anos, não demonstraram correlação desta com os dados do SCUP como o volume, contagem de CNT, contagem de células CD34<sup>+</sup> e, no último, incluindo o número de UFC-GM. Todos os valores se referem ao total por unidade de SCUP. Portanto, a idade materna demonstrou não influenciar os valores por mL obtidos no presente estudo, assim como nos quantitativos totais do SCUP.

Em estudo realizado com doações para o BSCUP de Valência demonstrou que o peso da placenta correlacionou-se significativamente com o total de células nucleadas, de células CD34<sup>+</sup> e de UFC do SCUP (SOLVES *et al.*, 2005). A diferença com os resultados da presente pesquisa podem ser devidas ao fato das correlações terem sido realizadas com os quantitativos totais dos parâmetros laboratoriais na USCUP, que são influenciados pelo volume. O peso da placenta demonstrou estar relacionado ao volume de SCUP obtido (JONES, J. *et al.*, 2003). Os valores médios do volume de SCUP em placentas de 214 a 599g, 600 a 699g e 700g ou mais foram 57, 65,8 e 81,1mL respectivamente. Por outro lado, quando foi analisada a correlação do peso placentário com as contagens de CNT e de células CD34<sup>+</sup>, expressas por microlitro, não houve correlação significativa com os mesmos (WEN *et al.*, 2012). Esses resultados demonstram a diferença entre as duas formas de abordagem.

Quanto à idade gestacional, os resultados demonstraram que um período gestacional mais longo influencia positivamente na contagem, por mL, de CNT, de MNC, de Plt e no número de UFC-GEMM e UFC-totais por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> (Tabela 15). Além disso, a proporção de progenitores hematopoiéticos mais precoces, representados pelas UFC-

GEMM, bem como a taxa de expansão destes progenitores foi maior em amostras de SCUP de gestações mais prolongadas (Tabela 15).

**Tabela 15.** Correlações entre os fatores materno-fetais e os parâmetros do SCUP e entre os próprios parâmetros hematológicos e taxa de expansão *ex vivo*, que apresentaram significância estatística.

<b>Fator (preditor)</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>r</b>	<b>95 % IC</b>	<b>p</b>
Id Gest (semanas)	L x 10 <sup>6</sup> /mL	0,5801	0,0964 - 0,8422	0,0234
	MNC x 10 <sup>6</sup> /mL	0,5610	0,0682 - 0,8337	0,0296
	SCUP			
	Plt 10 <sup>6</sup> /mL SCUP	0,5554	0,0601 - 0,8312	0,0316
	UFC-GEMM/10 <sup>3</sup>	0,7712	0,4279 - 0,9200	0,0008
	CD34 <sup>+</sup>			
	% UFC-GEMM	0,6559	0,2163 - 0,8744	0,0079
Peso RN (g)	Total UFC /10 <sup>3</sup>	0,5575	0,0631 - 0,8321	0,0308
	CD34 <sup>+</sup>			
	UFC-GEMM Exp****	0,8518	0,2751 - 0,9777	0,015
L x10 <sup>6</sup> /mL	L x 10 <sup>6</sup> /mL	0,6260	0,1673 - 0,8319	0,0125
	MNC x 10 <sup>6</sup> /mL	0,6739	0,2467 - 0,8818	0,0059
NRBC % SCUP*	SCUP			
	CD34 <sup>+</sup> %	0,8268	-	0,0047
	SCUP**			
L x10 <sup>6</sup> /mL	CD34 <sup>+</sup> /mL**	0,7333	-	0,0202
	UFC-GM /mL**	0,6845	-	0,0490
	UFC-total /mL**	0,7091	-	0,0268
	UFC-GEMM	0,7928	-	0,0480
	Exp****			
L x10 <sup>6</sup> /mL	CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>-</sup> x 10 <sup>3</sup>	0,5493	0,0514 - 0,8285	0,0339
	/mL***	0,8532	0,1353 - 0,9837	0,0307
	BFU-E Exp*****	0,8492	0,2663 - 0,9773	0,0156

Continuação tabela 15...

<b>Fator (preditor)</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>r</b>	<b>95 % IC</b>	<b>p</b>
NRBC /mL SCUP*	CD34 <sup>+</sup> % SCUP**	0,7842	-	0,0105
	CD34 <sup>+</sup> /mL**	0,7697	-	0,0126
	UFC-GM /mL**	0,6970	-	0,0306
	UFC-total /mL**	0,7333	-	0,0202
CD34 <sup>+</sup> /mL CB**	BFU-E /mL**	0,8031	0,3507 - 0,9516	0,0051
	UFC-GM /mL**	0,9388	0,7559 - 0,9858	<0,0001
	UFC-total /mL**	0,8929	0,6012 - 0,9746	0,0005
	UFC-GEMM Exp****	0,7666	0,03169 - 0,9635	0,0444

n=15; \* n=14; \*\* n= 10; \*\*\* n= 6; \*\*\*\*n= 7; Exp= expansão IC= intervalo de confiança; Id Gest = Idade gestacional.

Santos e colaboradores (SANTOS et al., 2011) demonstraram que idade gestacional maior correspondia a maior contagem de CNT por USCUP. No entanto, a idade gestacional não influenciou o volume total coletado. Os dados do total de células nucleadas concordam, indiretamente, com a contagem de CNT por mL obtidos no presente estudo, visto que no primeiro as USCUP apresentaram maior CNT no total, sem influência da idade gestacional no volume total obtido. Portanto, a maior contagem de CNT deve ser decorrente da maior concentração de células nucleadas por mL.

**Tabela 16.** Correlações entre os fatores materno-fetais e os parâmetros do SCUP e entre os próprios parâmetros hematológicos e taxa de expansão *ex vivo*, que não apresentaram significância estatística.

<b>Fator (preditor)</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>r</b>	<b>95 % IC</b>	<b>p</b>
Id Materna (anos)	L x10 <sup>6</sup> /mL	0,1735	-0,3719 - 0,6299	0,5364
	CD34 <sup>+</sup> % *	-0,2932	-	0,4069
	CD34 <sup>+</sup> /mL*	-0,2539	-0,7618 - 0,4474	0,4791
	BFU-E/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,3070	-0,7080 - 0,2437	0,2657
	UFC-GM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,4183	-0,7664 - 0,1198	0,1208
	UFC-GEMM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	0,0462	-0,4774 - 0,5457	0,8699
	UFC-Total/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,3417	-0,7268 - 0,2069	0,2125
	% BFU-E	-0,0631	-0,5574 - 0,4643	0,8232
	% UFC-GM	-0,0688	-0,5614 - 0,4597	0,8074
	% UFC-GEMM	0,2283	-0,3217 - 0,6631	0,4132
	Id Gest (semanas)	CD34 <sup>+</sup> % *	0,06037	-
CD34 <sup>+</sup> /mL*		-0,3018	-0,7828 - 0,4049	0,3967
BFU-E/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>		0,4593	-0,0693 - 0,7866	0,0850
UFC-GM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>		0,4354	-0,0990 - 0,7749	0,1048
% BFU-E		0,0874	-0,4448 - 0,5741	0,7566
% UFC-GM		-0,4036	-0,8239 - 0,3032	0,2474
CNT Exp***		0,3376	-0,5572 - 0,8696	0,4589
CD34 <sup>+</sup> Exp**		-0,2486	-0,7384 - 0,4130	0,4611
UFC-total Exp***		-0,2068	-0,7177 - 0,4489	0,5419
Peso Placenta (g)		L x10 <sup>6</sup> /mL	-0,1284	-0,6542 - 0,4810
	CD34 <sup>+</sup> % *	-0,1176	-	0,7756
	CD34 <sup>+</sup> /mL*	-0,0411	-0,6866 - 0,6406	0,9162
	BFU-E/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,0221	-0,5887 - 0,5590	0,9456

Continuação tabela 16...

<b>Fator (preditor)</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>r</b>	<b>95 % IC</b>	<b>p</b>
Peso Placenta (g)	UFC-GM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,2001	-0,6944 - 0,4224	0,5329
	UFC-GEMM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,2429	-0,7170 - 0,3847	0,4468
	UFC-Total/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,1336	-0,6572 - 0,4770	0,6788
	% BFU-E	0,1771	-0,4418 - 0,6818	0,5819
	% UFC-GM	-0,0987	-0,6366 - 0,5039	0,7602
	% UFC-GEMM	0,1884	-0,6880 - 0,4324	0,5577
Peso RN (g)	CD34 <sup>+</sup> %*	-0,5000	-	0,4500
	CD34 <sup>+</sup> /mL*	0,1638	-0,5195 - 0,7194	0,6511
	BFU-E/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	0,0425	-0,4803 - 0,5431	0,8802
	UFC-GM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	-0,1074	-0,5875 - 0,4285	0,7032
	UFC-GEMM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	0,2674	-0,2838 - 0,6858	0,3353
	UFC-Total/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	0,0251	-0,4936 - 0,5307	0,9291
	% BFU-E	0,0740	-0,4556 - 0,5650	0,7391
	% UFC-GM	-0,3234	-0,7169 - 0,2265	0,2397
	% UFC-GEMM	0,4262	-0,1103 - 0,7703	0,1132
	CNT Exp***	-0,3291	-0,8673 - 0,5638	0,4710
	CD34 <sup>+</sup> Exp**	0,1803	-0,6629 - 0,8219	0,6988
	UFC-total Exp***	-0,2766	-0,8522 - 0,6020	0,5482
	L x10 <sup>6</sup> /mL	CD34 <sup>+</sup> %*	-0,1885	-
CD34 <sup>+</sup> /mL*		0,3045	-0,4024 - 0,7839	0,3924
BFU-E/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>		-0,1457	-0,3962 - 0,6124	0,6043
UFC-GM/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>		0,2463	-0,3045 - 0,6736	0,3762
UFC-Total/10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>		0,2575	-0,2936 - 0,6801	0,3542
% BFU-E		-0,1945	-0,6428 - 0,3531	0,4874
% UFC-GM		-0,0109	-0,5885 - 0,4272	0,6989



Continuação tabela 16...

<b>Fator (preditor)</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>r</b>	<b>95 % IC</b>	<b>p</b>
L x10 <sup>9</sup> /mL	CNT Exp***	0,5240	-0,3786 - 0,9157	0,2274
	CD34 <sup>+</sup> Exp**	-0,3059	-0,8607 - 0,5812	0,5047
	UFC-total Exp***	0,2718	-0,6053 - 0,8508	0,5554
NRBC % SCUP	BFU-E / mL*	0,5515	-	0,1049
	UFC-GEMM / mL*	0,6364	-	0,0544
	CNT Exp***	0,0900	-	0,8397
	CD34 <sup>+</sup> Exp**	-0,3063	-	0,4976
	UFC-total Exp***	-0,2523	-	0,5948
NRBC / mL	BFU-E / mL*	0,5879	-	0,0806
	UFC-GEMM / mL*	0,6242	-	0,0603
	CNT Exp***	0,5091	-	0,2433
	CD34 <sup>+</sup> Exp**	-0,3063	-	0,4976
	UFC-total Exp***	-0,2523	-	0,5948
CD34 <sup>+</sup> /mL	UFC-GEMM / mL*	0,5975	-0,0596 - 0,8917	0,0681
	CNT Exp***	0,5091	-0,3959 - 0,9124	0,2433
	CD34 <sup>+</sup> Exp**	0,2781	-0,8527 - 0,6009	0,5459
	UFC-total Exp***	0,3368	-0,5579 - 0,8694	0,4601

n=15; \* n= 10; \*\*n= 6; \*\*\*n= 7 IC = intervalo de confiança.

Por outro lado, Jones e colaboradores obtiveram associação positiva entre idade gestacional (41 semanas ou mais) e volume total de SCUP coletado (JONES, *et al.*, 2003), enquanto que Jan e colaboradores relataram uma correlação negativa entre essas variáveis (JAN *et al.*, 2008).

A contagem de MNC tem sido relatada raramente pelos bancos de SCUP, sendo de mais interesse para aqueles onde o processamento depleta os polimorfonucleares da amostra a ser armazenada (ALLAN *et al.*, 2013). Não foram localizados trabalhos avaliando a importância do número de MNC com o sucesso na reconstituição hematopoiética após transplantes com CTPHs de SCUP.

Os resultados obtidos não demonstraram acentuada diferença na correlação da idade gestacional com a contagem de leucócitos ou com a de MNC (Tabela 15).

Não foi localizado na literatura dados referentes à correlação entre fatores materno-fetais e a contagem de plaquetas por mL ou o total por USCUP, nem quanto a uma possível aplicabilidade da correlação entre ambas. No entanto, em uma pesquisa recente a plaquetometria por USCUP demonstrou influenciar positivamente a contagem de CNT por USCUP (AL-SWEEDAN *et al.*, 2013).

Além do total de células nucleadas e de células CD34<sup>+</sup>, o potencial clonogênico é outro parâmetro do próprio SCUP que tem sido utilizado como preditor para a pega do enxerto de CTPHs do SCUP (PAGE, *et al.*, 2011). Os resultados de Page e colaboradores (2011), demonstraram que o número total de colônias foi o fator preditor mais potente pré e, especialmente, pós-congelamento para a pega de transplante alogênico não aparentado, superando inclusive o total de células nucleadas ou de células CD34<sup>+</sup>. Com base neste preditor e na dose para ele estabelecida no trabalho (19,1 x 10<sup>4</sup> colônias/kg de peso corporal), os autores concluem que das mais de 22 mil unidades armazenadas no banco de SCUP da Universidade de Duke, somente 49% e 2,8% das mesmas poderiam ser utilizadas em receptores com até 20kg ou com mais de 50kg respectivamente. Estes resultados podem explicar, em parte, a taxa de insucessos observada no transplante de CTPHs do SCUP. Isto porque com base neste preditor, muitas das USCUP transplantadas com dose celular considerada adequada, não passaria no critério dose de UFC.

No presente estudo, a proporção de UFC-GEMM também demonstrou ser influenciada pela idade gestacional. Uma maior proporção de UFC-GEMM é um indicador da presença de precursores mais jovens em maior concentração na população de células CD34<sup>+</sup>.

A análise retrospectiva de mais de 300 doações para o banco de SCUP de Barcelona, o total de UFC por USCUP após processamento e congelamento se correlacionou positivamente com o volume total e a contagem de CNT no volume total pré-processamento, bem como com o peso do RN (SOLVES *et al.*, 2004).

Na presente pesquisa, a correlação positiva da idade gestacional com o número de UFC-GEMM (Figura 18) e de UFC-total por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup>, assim como com a proporção das primeiras (Figura 19), se traduz numa avaliação essencialmente qualitativa uma vez que se referem ao mesmo número de células CD34<sup>+</sup> positivas utilizadas nos ensaios clonogênicos para as diferentes amostras. Esta análise exclui a

influência do volume e do número de CTPHs ou de outras células nucleadas por unidade de volume ou no volume total obtido para uma USCUP demonstrando um maior potencial clonogênico das mesmas.

Além disso, a análise dos dados de expansão *ex vivo* de CTPHs de sete experimentos independentes realizados em co-cultura com CTM do viló, a idade gestacional influenciou positivamente a taxa de expansão destes progenitores mais precoces. Tal resultado sugere que células CD34<sup>+</sup> positivas de gestações prolongadas podem ser mais apropriadas quando o objetivo é expandi-las *ex vivo*, o que pode ser um importante critério no aproveitamento das USCUP descartadas com base no volume total ou total de células nucleadas. O volume e o total de células nucleadas são duas das principais causas de recusa na armazenagem de USCUP (SOLVES *et al.*, 2004; WU, J. Y. *et al.*, 2006). Não foram localizados dados na literatura quanto à associação entre fatores maternos-fetais e a capacidade de expansão *ex vivo* de CTPHs de SCUP que permitissem estabelecer algum paralelo.

Os parâmetros laboratoriais que demonstraram correlação estatisticamente significativa com a idade gestacional foram categorizados segundo a média da mesma (menor ou maior de 39,5 semanas) para verificar se havia diferença significativa entre os grupos. O número e a proporção de UFC-GEMM por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> foram significativamente diferentes nos dois grupos (Tabela 17; Figuras 20 e 21). Assim, pode-se sugerir a idade gestacional de 39,5 semanas ou mais como um critério indicativo na seleção de amostras de SCUP sob um aspecto qualitativo para expansão *ex vivo*.

Da mesma forma que a idade gestacional, o peso do RN influenciou positivamente na CNT e no número de MNC por mL (Tabela 15). Como descrito anteriormente não foram localizados estudos correlacionando fatores materno-fetais e a contagem de MNC, seja no total da unidade ou por mL. O peso do RN tem sido um dos fatores materno-fetais mais frequentemente associados com o volume total obtido e o total de células nucleadas. RN de maior peso rendem maior volume total e número de células nucleadas por USCUP (SOLVES *et al.*, 2005).

**Tabela 17.** Parâmetros do SCUP com diferenças significantes entre os grupos quando os mesmos foram categorizados segundo a média ou mediana do fator preditor.

<b>Fator</b>		<b>n</b>	<b>Parâmetro SCUP</b>	<b>Média ou mediana</b>	<b>SD</b>	<b>p</b>
Id Gest (semanas)	<39,5	8	UFC-GEMM /10 <sup>3</sup> CD34 <sup>+</sup>	12,08	9,3	0,0005
	>39,5	7		34,17	9,5	
	<39,5	8	% UFC-GEMM	4,22	2,8	0,0011
	>39,5	7		10,10	2,6	
L x10 <sup>6</sup> /mL	<13,05	7	% UFC-GEMM	3,92	2,90	0,0018
	>13,05	8		9,62	2,73	
NRBC % SCUP	<2,87	5	CD34 <sup>+</sup> % SCUP	0,152	0,05	0,046
	>2,87	5		0,334	0,025	
CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL	<23,73	5	BFU-E x 10 <sup>3</sup> /mL	2689	985	0,0079
	>23,73	5		6725	2172	
CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL	<23,73	5	UFC-GM x 10 <sup>3</sup> /mL	2469	917	0,0159
	>23,73	5		6184	2480	
CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>3</sup> /mL	<23,73	5	UFC-total x 10 <sup>3</sup> /mL	4806	2072	0,0079
	>23,73	5		12394	5259	

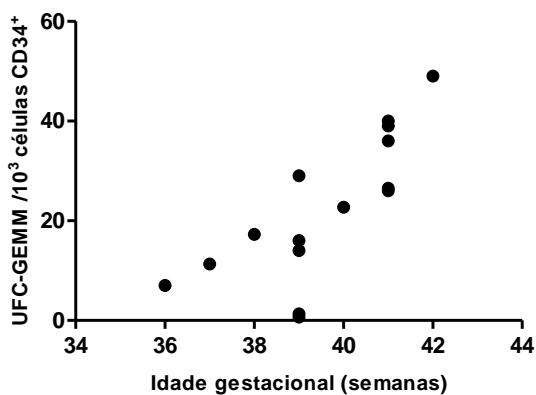


Figura 18. Correlação entre a idade gestacional (semanas) e o número de colônias GEMM ( $/10^3$  células  $CD34^+$ ) do SCUP. Correlação de Pearson ( $n=15$ ,  $r = 0,7712$ ,  $p=0,0008$ ).

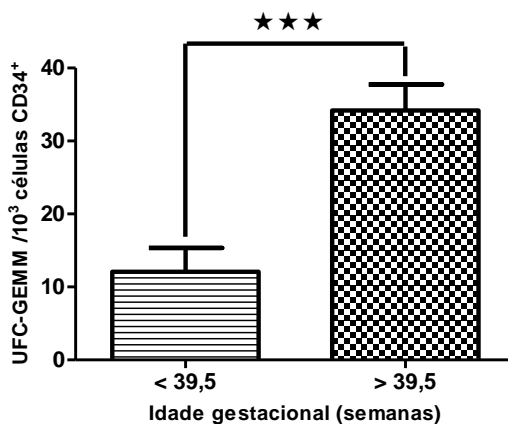
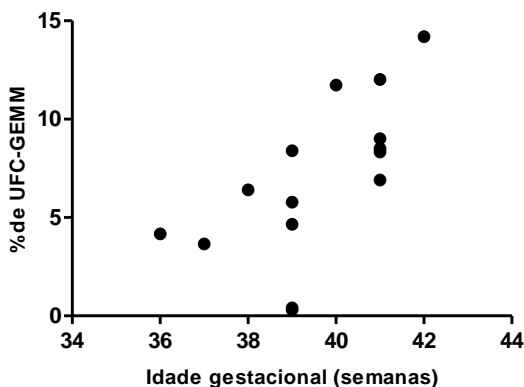
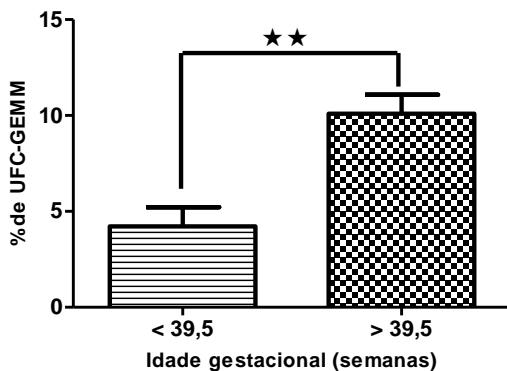


Figura 20. Número de UFC-GEMM  $/10^3$  células  $CD34^+$  do SCUP, segundo a idade gestacional menor ou maior que 39,5 semanas. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (Teste “t” não pareado;  $p = 0,0005$ ).



**Figura 19.** Correlação entre a idade gestacional (semanas) e a proporção de colônias GEMM (%). Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (correlação de Pearson;  $r = 0,6503$ ;  $p = 0,0079$ ).



**Figura 21.** Proporção de UFC-GEMM do SCUP, segundo a idade gestacional menor ou maior que 39,5 semanas. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (teste “t” não pareado;  $p = 0,0011$ ).

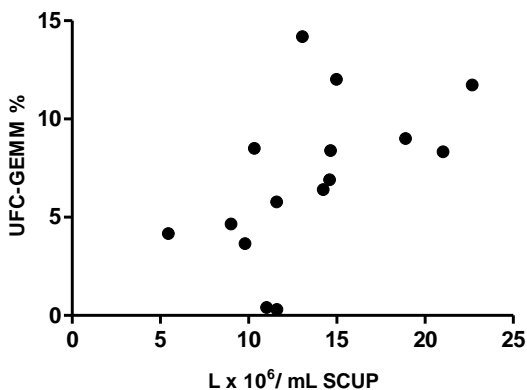
Santos e colaboradores (SANTOS, S. V. *et al.*, 2011) obtiveram diferenças significantes no volume total e no número absoluto de células nucleadas por USCUP de RN categorizados segundo o peso (<2750 g; 2750 a 3000 g; 3000 a 3250 g; 3250 a 3500g e > 3500g). Com base nas médias do volume e do total de células nucleadas relatados pelos autores para cada faixa de peso, foi realizado o cálculo para obter a contagem

média de CNT por mL, a fim de verificar se corresponderia a um aumento na concentração de CNT por mL, uma vez que esta foi a forma de abordagem do presente estudo. Embora não tenha sido possível testar a significância da diferença entre os grupos, os resultados do cálculo demonstraram um crescente aumento no número de CNT por mL com o aumento do peso do RN. Isto significa que o aumento na quantidade de células não é apenas consequência do aumento do volume, mas um aumento no número destas células por unidade de volume (mL), de acordo com o obtido no presente estudo.

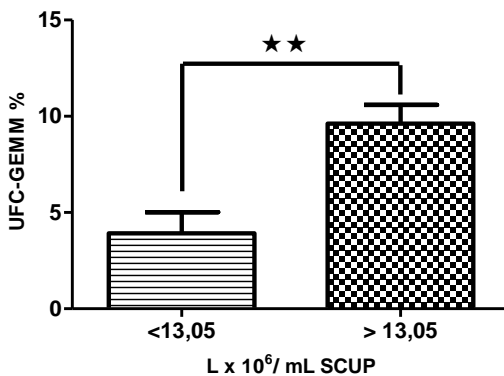
Além de avaliar a associação entre fatores materno-fetais e parâmetros do SCUP, foi pesquisada a correlação entre os parâmetros do próprio SCUP.

Contagens maiores de leucócitos por mL influenciaram positivamente a proporção de UFC-GEMM (Figura 22), o número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> por mL e a taxa de expansão de BFU-E (Tabela 15). A correlação com a proporção maior de UFC-GEMM (Figura 22) pode estar relacionada com o maior número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> por mL, embora não tenha apresentado correlação positiva entre o número destas células e a proporção ou número por mL das UFC-GEMM. Estudos com maior número de observações devam ser realizados. Solves e colaboradores (SOLVES *et al.*, 2004) estratificaram as USCUP em dois grupos segundo o total de células nucleadas pré-processamento ( $< 80 \times 10^7$  ou  $> 80 \times 10^7$  células), de acordo com o critério para armazenamento ou não das mesmas. Houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos no número total células CD34<sup>+</sup> e de UFC, ambas realizadas após o processamento das USCUP.

A contagem de células nucleadas é realizada rotineiramente nas USCUP coletadas. Portanto, é um parâmetro disponível sem custo financeiro ou dispêndio adicional de tempo. A estratificação dos valores da proporção de UFC-GEMM segundo a mediana da contagem de leucócitos por mL demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 17e figura 23), possibilitando propor o valor de  $13,05 \times 10^6$  CNT/mL como critério na seleção de USCUP.



**Figura 22.** Correlação entre o número de leucócitos ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) do SCUP e a proporção de colônias UFC-GEMM (%). Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Tecnologias), por 12 a 14 dias (correlação de Pearson;  $r = 0,5493$ ,  $p=0,0339$ ).



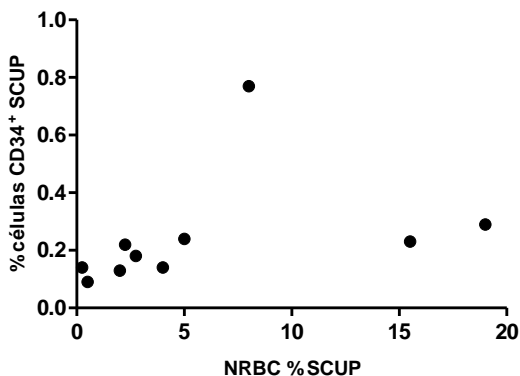
**Figura 23.** Proporção de UFC-GEMM do SCUP, segundo a contagem de leucócitos menor ou maior que  $13,05 \times 10^6/\text{mL}$ . Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Tecnologias), por 12 a 14 dias (Teste “t” não pareado;  $p = 0,0018$ ).



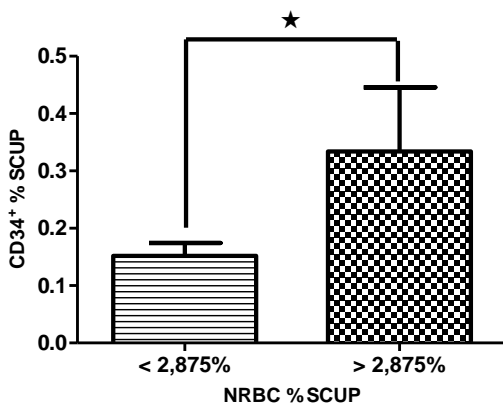
Além dos parâmetros laboratoriais descritos, o percentual e o número absoluto de NRBC por mL de SCUP foram investigados como indicadores para seleção de USCUP para expansão *ex vivo*. Stevens e colaboradores obtiveram correlação positiva dos valores absolutos de NRBC por USCUP com os de células CD34<sup>+</sup>, de UFC total e seus diferentes tipos e com o de células nucleadas, todos expressos por USCUP (STEVENS, C. E. *et al.*, 2002). Além disso, a correlação do total de NRBC com o total de células CD34<sup>+</sup> e de UFC foi mais forte do que a obtida entre o total de células nucleadas com estes mesmos parâmetros. Os resultados obtidos no presente estudo para as correlações utilizando o percentual de NRBC e o número por mL com parâmetros do SCUP foram similares ao descrito acima.

A percentagem de NRBC e o número por mL demonstraram correlação positiva com o número de UFC-GM e total de UFC por mL, assim como com a percentagem e número de células CD34<sup>+</sup> por mL (Tabela 15). A percentagem de NRBC se correlacionou positivamente também com a taxa de expansão de UFC-GEMM (Tabela 15). A correlação mais forte e com menor valor de *p* foi obtida entre a percentagem de células CD34<sup>+</sup> e a percentagem de NRBC (Figura 24). No entanto, não foi observada correlação da percentagem ou do número de NRBC com o número de BFU-E por mL. Na pesquisa realizada por Stevens e colaboradores (2002), a correlação com o total de BFU-E por USCUP foi a menor obtida, com um R<sup>2</sup> de 0,025.

Os valores dos parâmetros com correlação significativa com a percentagem de NRBC ou número por mL foram categorizados segundo a mediana destes preditores. A percentagem de células CD34<sup>+</sup> estratificada pela mediana da percentagem de NRBC foi significativamente diferente entre os grupos (Tabela 17 e figura 25), sugerindo este valor como mais um critério útil na seleção de amostras de SCUP. Soma-se a isso o aspecto da obtenção fácil, rápida e de baixo custo da percentagem e número de NRBC.



**Figura 24.** Correlação entre o percentual de NRBC do SCUP e o percentual de células CD34<sup>+</sup> do SCUP. Correlação de Spearman;  $r = 0,8268$ ;  $p = 0,0047$ ).



**Figura 25.** Percentagem de células CD34<sup>+</sup> do SCUP, segundo a percentagem de NRBC menor ou maior que 2,87%. Teste de Mann Whitney;  $p = 0,046$ .

As correlações obtidas entre a percentagem ou o número por mL de NRBC com o número por mL dos diferentes tipos de UFC podem estar relacionadas à correlação observada entre as NRBC e o número de células CD34<sup>+</sup> e destas com o número de UFC por mL.

Como exposto anteriormente, a dose de células CD34<sup>+</sup> por kg de peso corporal é um dos parâmetros utilizados para a realização de transplantes de CTPHs (WAGNER, JOHN E *et al.*, 2002) e, mais recentemente, a dose de UFC tem se mostrado importante preditor do

sucesso na reconstituição hematopoiética dos transplantados (PAGE, K. M. *et al.*, 2011).

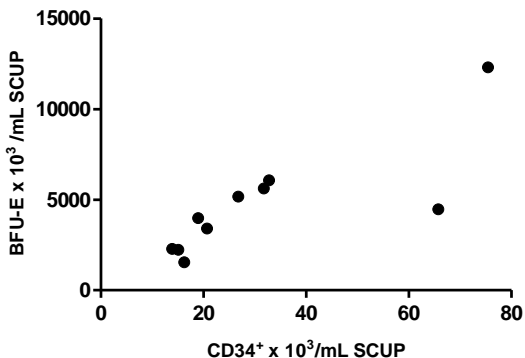
Na presente pesquisa a contagem de células CD34<sup>+</sup> por mL demonstrou correlação positiva com o número de BFU-E, UFC-GM e total de UFC, ambos por mL (Tabela 15 e figuras 26, 27 e 28) e com a taxa de expansão de UFC-GEMM (Tabela 15). Todas as correlações apresentaram coeficiente acima de 0,7 e um valor de *p* menor 0,01, exceto para a taxa de expansão das UFC-GEMM (*p*= 0,0444).

Os resultados obtidos para as correlações entre as contagens de CD34<sup>+</sup> por mL neste estudo, são semelhantes aos obtidos com o total de células CD34<sup>+</sup> e subpopulações (CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>90<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>61<sup>+</sup>) por USCUP coletadas em três centros norte-americanos (CAIRO *et al.*, 2005). Neste último, os ensaios clonogênicos foram realizados com MNC e expressos como número total por USCUP. Foram obtidas correlações positivas de todas as populações celulares estudadas com todos os tipos de colônias, bem como com o total delas.

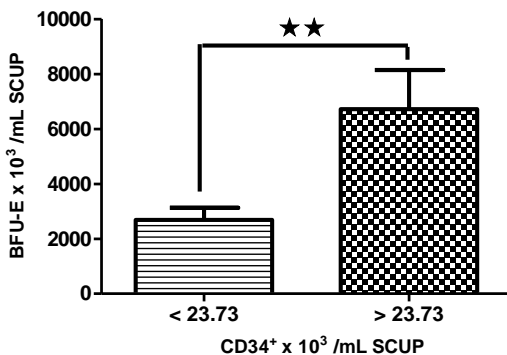
Os valores dos parâmetros com correlação significativa com a contagem de células CD34<sup>+</sup> foram categorizados segundo a mediana da mesma. A diferença no potencial clonogênico foi estatisticamente significativa entre os grupos para BFU-E, UFC-GM e UFC por mL (Tabela 17 e figuras 29, 30 e 31).

Embora a contagem de células CD34<sup>+</sup> seja mais complexa do que outras como o total de células nucleadas e NRBC, demande maior custo, mais tempo de análise das amostras e dos resultados, além de treinamento especializado de técnicos e profissionais, ela vem se tornando cada vez mais frequente (ALLAN *et al.*, 2013). Tal fato aumenta a utilidade do estabelecimento de um valor que possa contribuir na seleção de USCUP para expansão *ex vivo*. Portanto, uma contagem superior a  $23,73 \times 10^3$  células CD34<sup>+</sup> por mL pode ser um indicativo na seleção de amostras de SCUP com maior potencial clonogênico.

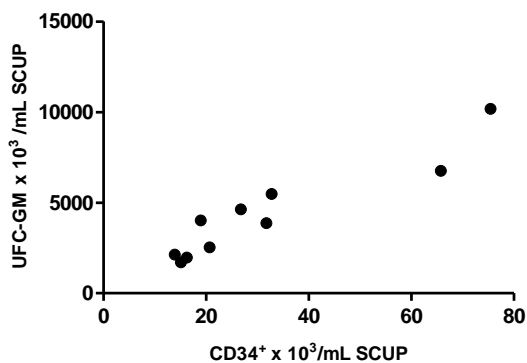
Outras correlações foram analisadas neste trabalho entre os fatores materno-fetais e parâmetros do SCUP citados ou não nas correlações descritas, (E, Hgb, VCM, parâmetros percentuais e absolutos de eritroblastos, MNC e as subpopulações celulares CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>), ou entre os próprios parâmetros deste último e com dados da expansão *ex vivo*, com resultados sem significância estatística (dados não mostrados).



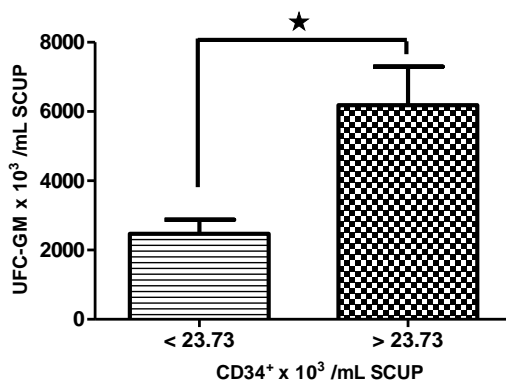
**Figura 26.** Correlação entre o número de células CD34<sup>+</sup> x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP e o número de BFU-E x 10<sup>3</sup> UFC /mL do SCUP. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (correlação de Pearsom;  $r = 0,8031$ ;  $p = 0,0051$ ).



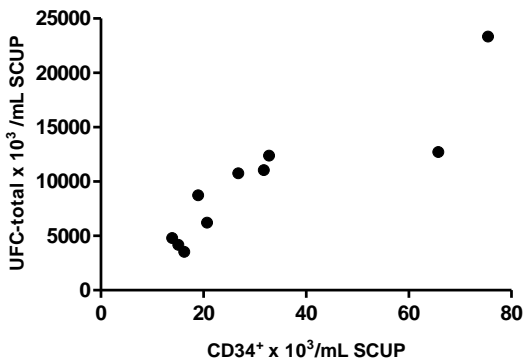
**Figura 29.** Número de BFU-E x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP, segundo o número de células CD34<sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10<sup>3</sup>/mL. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (teste de Mann Whitney;  $p = 0,0079$ ).



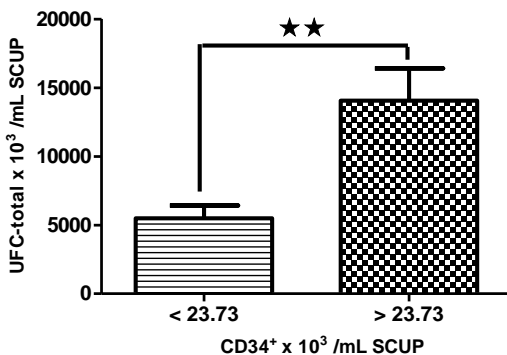
**Figura 27.** Correlação entre o número de células CD34<sup>+</sup> x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP e o número de UFC-GM x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (correlação de Pearsom;  $r = 0,9388$ ;  $p = 0,0001$ ).



**Figura 30.** Número de UFC-GM x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP, segundo o número de células CD34<sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10<sup>3</sup>/mL. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (teste de Mann Whitney;  $p = 0,0159$ ).



**Figura 28.** Correlação entre o número de células CD34<sup>+</sup> x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP e o número de UFC-total x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (correlação de Pearsom;  $r = 0,8929$ ;  $p=0,0005$ ).



**Figura 31.** Número de UFC-total x 10<sup>3</sup>/mL do SCUP, segundo o número de células CD34<sup>+</sup> menor ou maior que 23,73 x 10<sup>3</sup>/mL. Cultivo em meio semissólido H4434 e H4437 (StemCell Technologies), por 12 a 14 dias (teste de Mann Whitney;  $p = 0,0079$ ).

A coleta e o transporte de USCUP podem representar até 33% dos custos do banco de SCUP (QUEROL *et al.*, 2009). Por outro lado, a utilização de CTPHs de SCUP para transplante em adultos está crescendo, o que tem aumentado a pressão econômica no sentido de armazenar somente USCUP com contagens altas (acima de  $1,75 \times 10^9$  células nucleadas por USCUP) para reduzir custos de processamento e

armazenamento de unidades com menor probabilidade de uso (ALLAN *et al.*, 2013). Com base nestes aspectos, pode-se deduzir que aumentará a probabilidade de uma USCUP coletada vir ser descartada por não preencher os critérios exigidos.

No conjunto, os dados sugerem que a seleção de amostras de SCUP de gestações mais prolongadas, com RN de peso maior, com percentuais ou contagens mais elevadas de NRBC e contagens maiores de células CD34<sup>+</sup>, podem ser mais apropriadas para armazenamento ou expansão de CTPHs pela probabilidade de possuírem maior número de células nucleadas e de progenitores hematopoiéticos mais primitivos, com melhor potencial clonogênico e taxa de expansão. Portanto, cresce a importância do aproveitamento destas unidades para a expansão *ex vivo*.

## 5.6 EXPANSÃO *EX VIVO* DE CTPHs DO SCUP

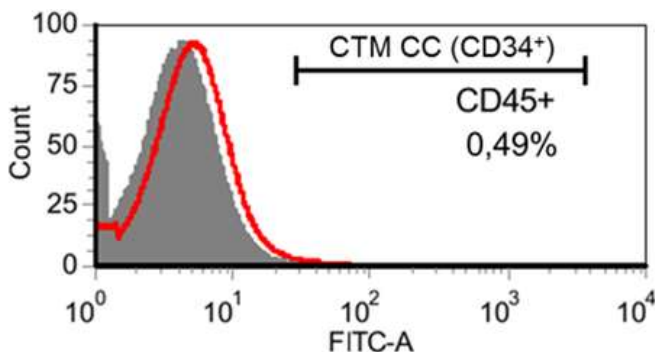
### 5.6.1 Expansão em ambiente 2D

Com base nos resultados obtidos nos experimentos com as CTMs (obtenção, caracterização e expressão de citocinas de interesse hematopoiético), com as CTPHs do SCUP (obtenção, citometria e potencial clonogênico) e em um experimento piloto para expansão *ex vivo*, desenvolveram-se os experimentos com o objetivo de avaliar a expansão *ex vivo* de CTPHs obtidas do SCUP, conforme descrito no item 4.4.3, em co-cultivo com as CTMs da MC e do vilo, obtidas conforme descrito no item 4.4.1.

Em face da variabilidade biológica observada na expressão gênica das citocinas nas CTMs de diferentes doadoras e da otimização do procedimento para expansão *ex vivo* das CTPHs, o co-cultivo destas foi realizado com um *pool* de CTMs de três doadoras diferentes. O *pool* de cada CTMs (MC ou vilo) foi preparado a partir das mesmas doadoras.

Para avaliar a expansão *ex vivo* das CTPHs foram realizados três experimentos independentes, em triplicata, conforme descrito no item 4.5.8.1 e foram coletados e analisados os seguintes dados: contagem das CNT no meio sobrenadante do co-cultivo; percentagem e número absoluto de células CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> nas amostras pré co-cultivo e no meio sobrenadante pós co-cultivo e respectivo controle; número e proporção de colônias no ensaio clonogênico nas amostras pré co-cultivo e com as células do meio sobrenadante após o co-cultivo e respectivo controle.

Além disso, foi realizada a citometria das células aderidas do co-cultivo no experimento piloto a fim de verificar se células hematopoiéticas aderiram ou permaneceram nas culturas após a remoção do meio sobrenadante do co-cultivo, causando a perda destas. Tal perda não ocorreu ou ocorreu em quantidades desprezíveis, conforme pode ser observado na figura 32. Não houve aumento na percentagem de células CD45<sup>+</sup> na citometria das células aderidas do co-cultivo com células CD34<sup>+</sup> (0,49%), em relação à citometria das CTMs sem o co-cultivo (0,57% para CTM da MC e 0,74% para CTMs do vilo), conforme consta na tabela 6.



**Figura 32.** Citometria de fluxo das CTMs do co-cultivo com células CD34<sup>+</sup>, após tratamento com tripsina e marcação com anti-CD45-FITC. Imagem representativa das análises realizadas (n=2).

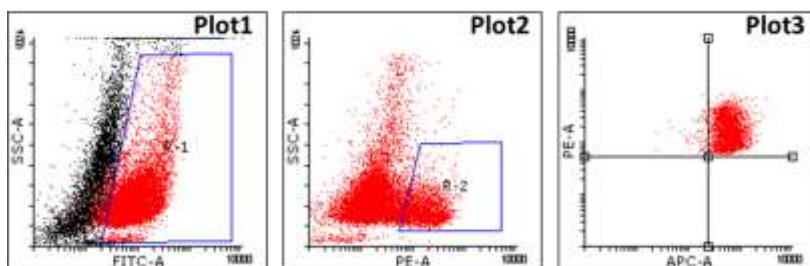
Por outro lado, poderia ocorrer o desprendimento de CTMs do plástico para o meio sobrenadante. As CTMs apresentam tamanho de 30 a 120  $\mu\text{m}$  de diâmetro (BARLOW *et al.*, 2008), enquanto que os leucócitos e seus precursores possuem de 10 e 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro (BAIN, 2004). Esta característica poderia ser utilizada para a exclusão das CTMs na aquisição, como utilizado em outras pesquisas (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-PARDO; VERNOT, 2013). Entretanto, no presente estudo preferiu-se realizar o *gate* inicial das amostras após co-cultura, de modo semelhante ao protocolo ISHAGE/ISCT, incluindo todas as células marcadas com CD45, independente do tamanho (Figura 33). Dessa forma não há possibilidade de excluir células hematopoiéticas que apresentassem tamanho próximo ao das CTMs. Assim, para interferir nos valores, a CTM teria que ser CD45<sup>+</sup>, o que é raro, ter tamanho próximo ao das



células hematopoiéticas e, posteriormente, ser positiva também para CD34 (outro evento raro) no *gate* subsequente.

Permanece, ainda, a possibilidade de interferência das CTMs na contagem de CNT, realizada em câmara de Neubauer, com microscopia de contraste de fase. Para estimar esta interferência foi realizada a contagem de CTMs no sobrenadante de culturas nas mesmas condições do co-cultivo, exceto a adição das CTPHs. Os valores obtidos foram de 782 ( $\pm$  108) células por poço em placa de 24 de poços, o que representa 2,2% da contagem de CNT das co-culturas com CTMs da MC e 0,54% nas co-culturas com CTMs do vilo. Considerando estes valores e que as raras células com tamanho claramente incompatível para ser uma célula da linhagem hematopoiética (aproximadamente 5 ou mais vezes maior que uma célula MNC), não foram computadas na CNT, esta interferência foi desconsiderada.

Os dados referentes à contagem de CNT e da citometria das células do meio sobrenadante e pré co-cultivo, são apresentados na tabela 18 e figuras 34, 35, 36 e 37.



**Figura 33.** Estratégia para a citometria de fluxo das células do sobrenadante das culturas e co-culturas de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da MC e do vilo. As células foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC. Os dados foram analisados com software Flowing.

**Tabela 18** Dados da contagem de CNT e da citometria de fluxo da co-cultura de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da MC em P1 e do vilo em P5:

	n	CNT		CD34 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>-</sup>	
		x 10 <sup>3</sup> ± DP	% ± DP	x 10 <sup>3</sup> ± DP	% ± DP	x 10 <sup>3</sup> ± DP	% ± DP	x 10 <sup>3</sup> ± DP	
Inicial	3	10	75,5 ±3,3	7,55 ±0,10	97,02 ±1,6	7,33 ±1,0	2,98 ±1,6	0,22 ±0,1	
CTR	3	6,36 ±1,62	20,78 ±7,4	1,27 ±0,42	6,49 ±2,1	0,08 ±0,02	93,51 ±2,1	1,19 ±0,4	
CC MC P1	3	36,24 ±1,98	45,0 ±8,2	16,12 ±0,25	88,22 ±4,0	14,3 ±1,7	11,78 ±3,9	1,99 ±0,9	
CC V P5	3	144,2 ±28,5	16,5 ±6,1	23,26 ±0,73	97,21 ±0,1	22,61 ±7,1	2,79 ±0,01	0,65 ±0,2	

MC=membrana coriônica; V= vilo; CNT= células nucleadas totais no meio sobrenadante, contadas em hemocitômetro; Inicial= dados pré cultivos; CTR= controle - células no cultivo de células CD34<sup>+</sup>, sem CTMs; CC MC P1= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da MC, em P1; CC V P5= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilo, em P5. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata e cultivadas por 7 dias. As células do meio sobrenadante dos co-cultivos e do CTR foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC. Para o cálculo do valor absoluto foi multiplicado o valor da CNT pela % obtida na citometria para a respectiva população ou subpopulação celular, separadamente para cada amostra.

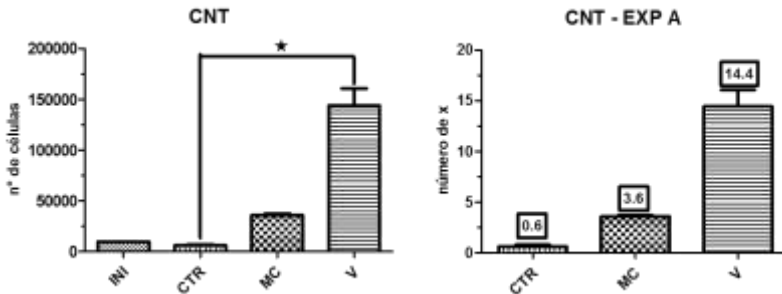
A contagem de CNT foi um dos parâmetros utilizados para avaliar a expansão que poderia ser promovida ou não pelas CTMs da MC e do vilo nos progenitores hematopoiéticos do SCUP. O co-cultivo de progenitores CD34<sup>+</sup>, com suporte pelas CTMs da MC e do vilo promoveu um incremento na contagem de CNT de 3,6x e 6,0x para a primeira e de 14,4x e 24x para a segunda, em relação ao número de células semeadas inicialmente e a condição sem CTMs (controle) respectivamente (Figura 34).

Com base nas contagens de CNT nas condições de co-cultivo com CTMs e sem as CTMs, pode-se sugerir que estas contribuem para o estabelecimento de condições apropriadas à proliferação das células hematopoiéticas. As CTMs do vilo em P5 demonstraram maior potencial de amplificação que as da MC em P1. Esta diferença na capacidade de dar suporte a expansão das CNT pode estar relacionada à secreção de citocinas e fatores de crescimento, dada a importância destas substâncias para a hematopoiese (METCALF, 2008). A expressão

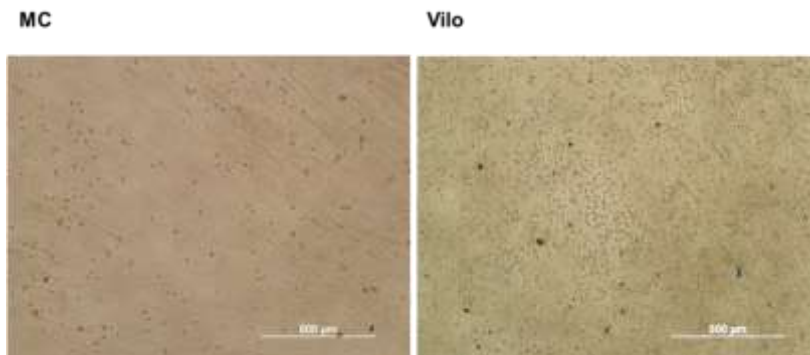
gênica do SCF, da IL16 e do SDF1 foi aproximadamente 3x maior nas CTMs do vilo em P5 que nas da MC em P1e ligeiramente superior para a TPO e o Flt3-L, embora tenha sido 5,9x menor para a IL6. Como discutido anteriormente, embora a diferença na expressão gênica das citocinas entre as CTMs da MC em P1 e do vilo em P5 não tenha sido estatisticamente significativa quando comparadas pela razão gene normalizador/gene alvo, diferenças de importância biológica foram observadas nos co-cultivos, ainda que, também, não tenham sido significantes na análise estatística (exceto Vilo x controle, figura 34). A expansão das CNT induzida pelas CTMs do vilo foi maior que a das CTMs da MC nos três experimentos independentes (3,2x, 3,8x e 5,1x, média de 4,03x). A CTPHs utilizadas (três doadores) foram as mesmas para ambas as co-culturas, descartando diferenças biológicas oriundas das próprias CTPHs. Uma amplificação dessa magnitude, sem a adição de citocinas exógenas, permitiria a utilização de uma USCUP, que seria descartada, em transplantes para indivíduos de maior peso corporal.

Por outro lado, foi demonstrado que co-culturas utilizando CTMs de passagens mais altas induzem maior número de divisões celulares nas CTPHs do que quando co-cultivadas com CTMs de passagens mais baixas (WALENDA *et al.*, 2010).

Entretanto, análises mais detalhadas da população e subpopulações de progenitores CD34<sup>+</sup> contidos nas amostras celulares obtidas das CTPHs cultivadas, devem ser levadas em consideração na avaliação do suporte à hematopoiese e da expansão real das mesmas por CTMs, uma vez que pode ter ocorrido diferenciação, reduzindo o número absoluto destes progenitores em relação ao inicial.



**Figura 34.** Contagem das CNT no meio sobrenadante e expansão das mesmas, em número de vezes, após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= representa o total de células CD34<sup>+</sup> semeadas inicialmente. CTR= controle - CNT no cultivo sem a presença das CTMs; CC MC P1= CNT no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da MC, em P1; CC V P5= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilo, em P5. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata e cultivadas por 7 dias, em três experimentos independentes. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de células nucleadas em relação ao total semeado inicialmente, calculada pela relação entre a CNT após o cultivo das células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs e a inicial. Testes de Friedman e de Kruskal-Wallis, ambos com o pós teste de Dunn (\*p<0,05)



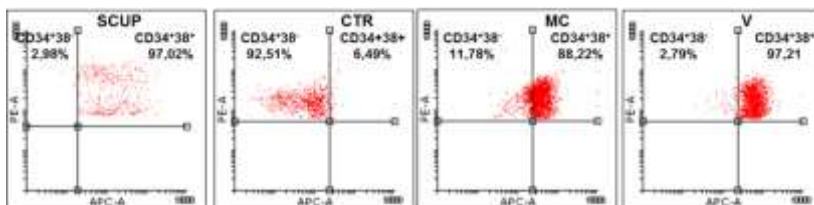
**Figura 35.** Expansão CTPHs do SCUP com CTMs da MC em P1 e do vilo em P5, após 7 dias de co-cultivo. Aumento:100x.

Os dados obtidos neste estudo com as análises por citometria de fluxo com os marcadores para CD45, CD34 e CD38 (Tabela 18 e Figuras 36, 37 e 38), demonstraram a amplificação dos progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> e subpopulações, sobretudo os mais primitivos (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) onde incrementos de 9,0x e 3,2x em relação ao inicial foram obtidos para os co-cultivos com as CTMs da MC e do vilo respectivamente. Quando considerados os progenitores CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> a expansão foi mais pronunciada com as CTMs do vilo, tanto em relação ao inicialmente semeado (expansão absoluta) quanto aos controles, sendo estatisticamente significativa em relação a estes últimos (Figura 37). Ocorreu aumento no número e na percentagem (Figuras 36 e 37) de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> no controle e no co-cultivo com CTMs da MC. No co-cultivo com as CTMs do vilo houve redução na percentagem de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> em relação à inicial (2,98% *versus* 2,79%), entretanto a amplificação do valor absoluto (3,2x) em relação ao inicial revela a expansão real destas células (Figuras 36 e 38).

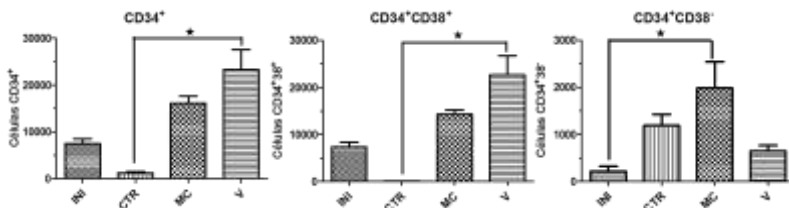
Por sua vez, nos controles foi observado um percentual elevado de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (92,51%) com franca redução na contagem de células nucleadas totais e no total de células CD34<sup>+</sup> para 0,6x e 0,17x a inicial respectivamente (Figuras 36 e 34). Uma percentagem elevada (52%) de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> foi obtida após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> de SCUP com adição exógena de TPO, Flt3-L e SCF (PRANKE *et al.*, 2005). Além disso, a modulação na expressão do antígeno CD38 foi demonstrada em culturas de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da medula óssea (SILVA *et al.*, 2009). A percentagem de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> aumentou de 1,73% no pré-cultivo para 24,5% após dois dias de cultura, enquanto que apenas 4,5% das células haviam se submetido à divisão celular sugerindo que estes progenitores se originaram das células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> por hiporregulação na expressão do antígeno CD38. Após 10 dias de co-cultivo 100% das células haviam se submetido a divisões celulares e 56% delas haviam alcançado a nona geração.

O aumento na percentagem de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> (2,98% para 93,5%) e na sua contagem (220 células para 1.190 células), a redução na contagem de CNT e no total de células CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> (Tabela 18), em conjunto com os resultados de Silva e colaboradores (2009), sugerem a hiporregulação do antígeno CD38 como uma das possíveis causas dos resultados obtidos no grupo controle para a percentagem e contagem das células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, na presente pesquisa. A mesma explicação é menos provável para o aumento no percentual e/ou valores absolutos das células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> nas co-culturas com CTMs, onde houve expansão das CNT e das células CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>.

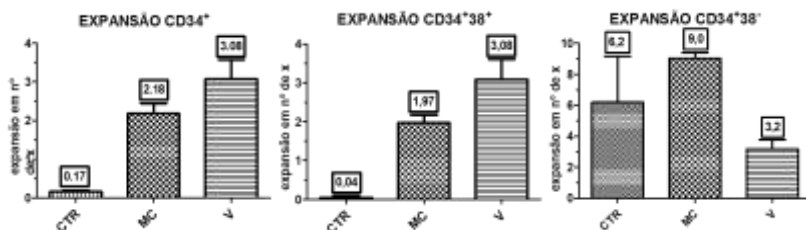
A redução na contagem da CNT na cultura controle sugere que ocorreu morte celular sem equivalente proliferação das que sobreviveram. Foi demonstrado que progenitores  $CD34^{+}38^{-}$  são mais resistentes do que os  $CD34^{+}38^{+}$  durante o processamento e congelamento (OJEDA-URIBE *et al.*, 2004). É possível que os progenitores mais jovens resistam melhor à condição de cultura sem o suporte de células do microambiente do que os progenitores  $CD34^{+}38^{+}$ , com aumento relativo dos primeiros por morte em maior proporção dos últimos. Por outro lado, no presente estudo, o percentual de células  $CD34^{+}$  inviáveis foi significativamente maior no controle que no co-cultivo com CTMs do vilô, ainda que o valor médio de inviáveis nas primeiras tenha sido de 3,5% (Figura 39). Entretanto, pode ter ocorrido a perda de muitas das células, como visto pela baixa contagem de CNT, subestimando o percentual de células inviáveis durante a cultura.



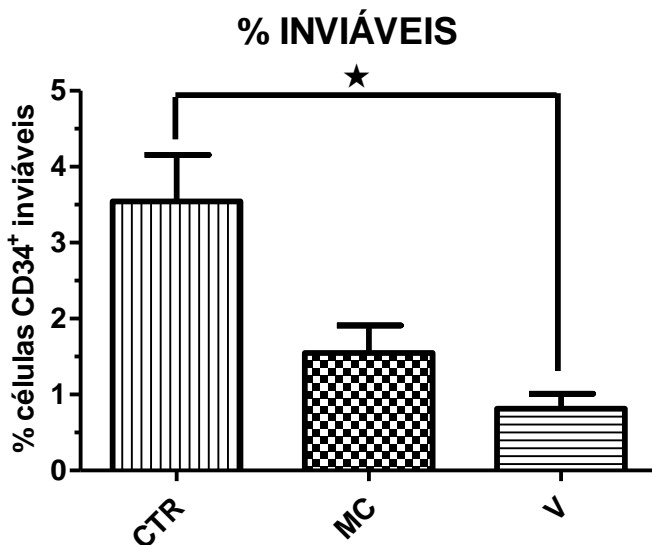
**Figura 36.** Imagem representativa da citometria de fluxo com valores percentuais médios das subpopulações celulares  $CD34^{+}38^{-}$  e  $CD34^{+}38^{+}$ , pré e após 7 dias de cultivo de células  $CD34^{+}$  na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. SCUP= sangue de cordão umbilical e placentário; CTR= células no meio sobrenadante do cultivo de células  $CD34^{+}$ , sem CTMs. MC= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células  $CD34^{+}$  com CTMs da MC, em P1. V= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células  $CD34^{+}$  com CTMs do vilô, em P5. Foram semeadas  $10^4$  células  $CD34^{+}$  por poço (placa de 24 poços), em duplicata e cultivadas por 7 dias, em três experimentos independentes. As células do SCUP e do meio sobrenadante do co-cultivo foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD38-APC e anti-CD34-PE e analisadas por citometria de fluxo.



**Figura 37.** Contagem das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>), pré e após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= representa o total de células CD34<sup>+</sup> semeadas inicialmente. CTR= controle - CNT no cultivo sem a presença das CTMs; CC MC P1= CNT no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs da MC, em P1; CC V P5= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilô, em P5. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata e cultivadas por 7 dias, em três experimentos independentes. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de células nucleadas em relação ao total semeado inicialmente, calculada pela relação entre a CNT após o cultivo das células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs e a inicial. Testes de Friedman e de Kruskal-Wallis, ambos com o pós teste de Dunn (\*p<0,05).



**Figura 38.** Expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>), em número de x à inicialmente cultivada, avaliadas por citometria de fluxo após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. CTR= expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações em cultura sem CTMs; MC = expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações em co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações em co-cultura com CTMs do vilô, em P5. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata, em três experimentos independentes. A citometria foi realizada do *pool* celular de cada triplicata, de cada condição de cultura e em cada experimento independente.



**Figura 39.** Percentual de células CD34<sup>+</sup> inviáveis, avaliada após a cultura das mesmas por 7 dias, na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. CTR= cultura de células CD34<sup>+</sup> sem CTMs; MC = cultura de células CD34<sup>+</sup> em co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= cultura de células CD34<sup>+</sup> em co-cultura com CTMs do viló, em P5. As células do meio sobrenadante das culturas foram previamente marcadas com anti-CD45-FITC e anti-CD34-PE, acrescido do corante de ácidos nucléicos 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo (teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. \*p<0,05).

Embora a análise por citometria de fluxo possa demonstrar a expansão, em termos quantitativos, dos progenitores hematopoiéticos e suas subpopulações, esta não é adequada para avaliar a capacidade funcional, a qual pode ser expressa pelo potencial clonogênico dos mesmos. O estudo realizado por Page e colaboradores (2011), no qual o número total de colônias foi o fator preditor mais potente pré e, especialmente, pós-congelamento para a pega de transplante alogênico não aparentado, reflete a importância deste ensaio como indicador da capacidade funcional e como dado para mensurar a expansão *ex vivo* de CTPHs.

Por isso, ensaios de formação de colônia foram realizados com os progenitores hematopoiéticos conforme descrito nos itens 4.5.6 e 4.5.8.1. Os resultados de 3 experimentos independentes foram expressos como: número absoluto de cada tipo de colônia e total de colônias;



proporção de cada tipo de colônia e como taxas de expansão (Tabela 19 e Figuras 40 a 44).

Tendo em vista que os valores do total e tipo de colônias formadas apresentam considerável variabilidade interindividual, os cálculos para obter a taxa de expansão foram procedidos separadamente para cada experimento independente e, então, calculada a média das taxas de expansão. Da mesma forma que para a taxa de expansão, a proporção de cada tipo de colônia foi calculada separadamente para cada experimento independente.

**Tabela 19.** Dados dos ensaios de formação de colônias (número e proporção de cada tipo) com as células CD34<sup>+</sup> pré e pós co-cultivo com CTMs da MC em P1 e do vilo em P5.

	BFU-E		UFC-GM		UFC-GEMM		UFC-TOTAL
	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP
Inicial	163,3 ±49,9	51,1 ±5,9	133,5 ±73,4	38,4 ±6,6	35,0 ±16,4	10,5 ±3,2	334,7 ±133,5
CTR	12,3 ±1,5	15,4 ±4,5	65,0 ±20,1	79,8 ±3,6	4,0 ±3,5	4,8 ±2,5	81,3 ±22,5
CC MC P1	132,3 ±85,3	19,5 ±13,4	468,1 ±95,8	70,0 ±13,1	78,6 ±68,7	10,5 ±7,1	678,7 ±161,5
CC V P5	364,6 ±96,4	20,1 ±7,0	1.290,0 ±264,1	68,9 ±8,1	219,9 ±169,1	11,0 ±7,3	1.875,0 ±345,9

Inicial= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup>, pré expansão; CTR= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> da cultura controle (sem co-cultivo com CTM) da expansão; CC MC P1= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pós-expansão em co-cultivo com CTMs da MC, em P1; CC V P5= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pós-expansão em co-cultivo com CTMs do vilo, em P5. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Os valores resultam da média de três experimentos independentes para cada tipo celular, realizados em duplicata, em meio semissólido H4434, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

O co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs amplificou o número de progenitores hematopoiéticos, como demonstrado nas análises realizadas pela citometria. Os ensaios de formação de colônias demonstraram a funcionalidade dos progenitores hematopoiéticos

amplificados em co-cultura uma vez que estes foram capazes de gerar as respectivas progênes. Além disso, o número total de colônias formadas após o co-cultivo com as CTMs foi maior tanto em relação ao controle quanto em relação aos valores obtidos com as células recém-coletadas (pré co-cultivo), evidenciando uma amplificação do conteúdo inicial de progenitores do SCUP com manutenção da funcionalidade (Tabela 19).

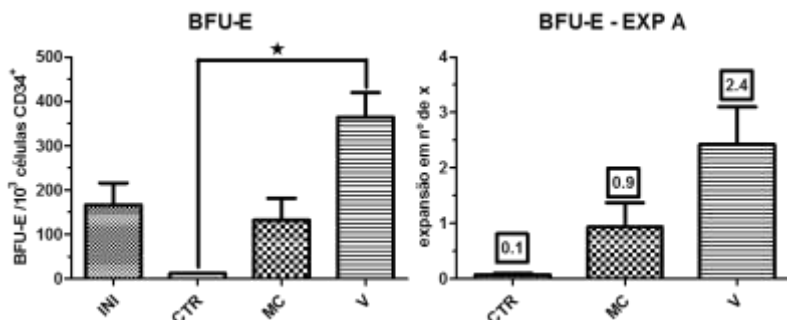
O mesmo não foi verdadeiro para os controles que demonstraram perdas em todos os tipos de UFC, redução na proporção dos progenitores eritróides e na dos mais precoces como demonstrado pela redução na percentagem de UFC-GEMM (Tabela 19 e figuras 40 a 44). Esses resultados corroboram os aspectos discutidos anteriormente para os controles em relação a CNT e citometria de fluxo.

A co-cultura de progenitores CD34+ com CTMs da MC gerou uma expansão absoluta de 4,1x, 2,0x e 2,2x no número de UFC-GM, UFC-GEMM e no total de colônias, respectivamente, e redução nas BFU-E (Figuras 40 a 44). Por sua vez, co-cultura das CTPHs com as CTMs do vilão levou a ampliações de 2,4x, 11,1x, 5,7x, e 6x no número de BFU-E, UFC-GM, UFC-GEMM e no total de colônias respectivamente.

A expansão não ocorreu de maneira uniforme entre os diferentes tipos de progenitores como pode ser visto nas figuras 40 a 44. Foi observada redução na proporção de BFU-E, aumento na proporção de UFC-GM e manutenção da proporção de UFC-GEMM, após a expansão com ambas as CTMs. A redução na proporção de BFU-E nos co-cultivos com CTMs da MC foi acompanhada de redução no seu número absoluto, o que não ocorreu nas co-culturas com CTMs do vilão.

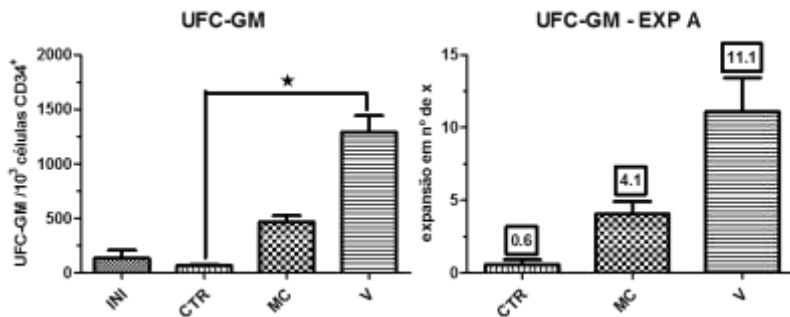
A proporção de colônias BFU-E obtida após o co-cultivo com CTMs da MC e do vilão (19,5% e 20,1% respectivamente) reduziu em relação à proporção pré co-cultivo (51,1%) e aumentou em relação à proporção na cultura controle (15,4%), formando a imagem em “U”. O inverso ocorreu para as colônias do tipo UFC-GM, onde se obteve uma imagem em “U” invertido (Tabela 19 e figuras 40 e 41). Estes dados sugerem que as condições de co-cultivo com CTMs da MC e do vilão podem estimular a proliferação ou diferenciação mielóide, ou ambas e sem restrição da eritróide pelas CTMs do vilão, visto que ocorreu expansão no número total destas colônias, mas com discreta restrição eritróide (redução no número absoluto) para as co-culturas com CTMs da MC (Tabela 19 e Figura 40). Por sua vez, o aumento no número absoluto de colônias mistas com manutenção da sua proporção (Tabela 19 e Figura 42), sugerem que o co-cultivo com CTMs obtidas da MC e do vilão promovem a proliferação dos progenitores mais primitivos

mantendo a autorrenovação dos mesmos. Além disso, as acentuadas diferenças nos resultados entre os co-cultivos e o respectivo controle, demonstram o potencial das CTMs no suporte à hematopoiese.



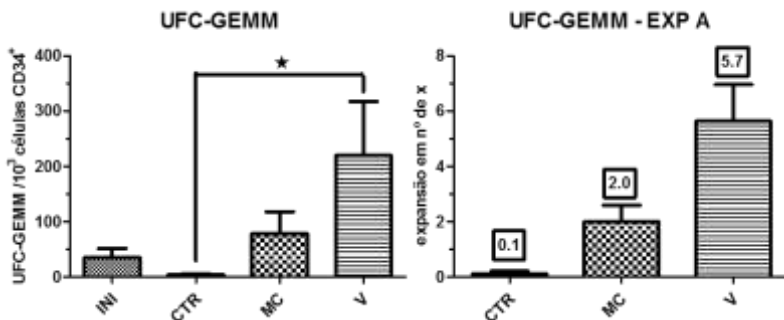
**Figura 40.** Contagem de colônias BFU-E e expansão dos progenitores eritróides do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CTR= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na cultura controle (sem co-cultivo com CTM); MC= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs do viló, em P5. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao total semeado inicialmente, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4434, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

As CTMs do viló foram capazes de gerar as taxas mais altas de expansão para todos os tipos de UFC em relação às da MC (Figuras 40 a 43), contrariando, em parte, os resultados da citometria que demonstraram maior amplificação da subpopulação de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> pelas últimas (Figuras 37 e 38). A expansão gerada pelas CTMs do viló, em termos do total de colônias e, em especial, a das UFC-GEMM, foi 2,8x e 2,85x respectivamente.



**Figura 41.** Contagem de UFC-GM e expansão dos progenitores GM do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CTR= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na cultura controle (sem co-cultivo com CTM); MC= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs do viló, em P5. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao total semeado inicialmente, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4434, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

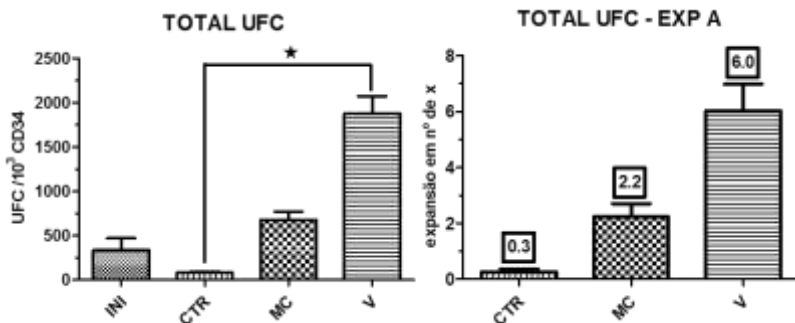
No presente estudo as CTMs da MC e do viló foram obtidas de gestações a termo. Foi demonstrado que a proporção de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> é maior na MC durante as primeiras semanas de gestação, tornando-se maior no viló em gestações a termo (BÁRCENA *et al.*, 2011). Este aspecto é um indicativo de uma melhor condição de suporte para as CTPHs nessa região da placenta em gestações a termo e pode ser, juntamente com as diferenças na expressão de citocinas, uma possível explicação para as diferenças observadas na expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP com CTMs destas duas regiões placentárias.



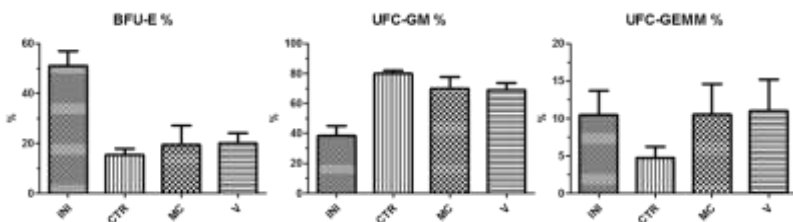
**Figura 42.** Contagem de UFC-GEMM e expansão dos progenitores GEMM do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CTR= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na cultura controle (sem co-cultivo com CTM); MC= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs do viló, em P5. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao total semeado inicialmente, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4434, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

Com base nos dados dos ensaios clonogênicos pode-se inferir que o co-cultivo com CTMs do viló se revelou a melhor opção para a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP em ambiente 2D, pois gerou as maiores taxas de amplificação, mantendo a funcionalidade das mesmas.

Tomados em conjunto os dados dos ensaios clonogênicos, da contagem de CNT e os da citometria (CD34<sup>+</sup> e subpopulações CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>), ambos obtidos dos co-cultivos, com os dados da expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs da MC e do viló (item 5.3), pode-se concluir que o co-cultivo de CTPHs do SCUP com estas CTMs apresenta condições potenciais para expansão *ex vivo* das mesmas em ambiente 2D, com preferência para o uso de CTMs do viló.



**Figura 43.** Contagem do total de UFC e expansão dos progenitores hematopoiéticos do SCUP, mensurada pelo ensaio de formação de colônias, pré e após 7 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= número total de UFC no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CTR= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na cultura controle (sem co-cultivo com CTM); MC= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs da MC, em P1; V= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão na co-cultura com CTMs do violo, em P5. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao total semeado inicialmente, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4434, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.



**Figura 44.** Proporção dos diferentes tipos de colônias obtidas no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pré e pós cultivo por 7 dias na presença (co-cultivo) ou não de CTMs. INI= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com as células CD34<sup>+</sup> pré co-cultivo; CTR= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células da cultura sem a presença de CTMs; MC= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células do co-cultivo com CTMs da MC, em P1; V= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células do co-cultivo com CTMs do violo, em P5.

Em função dos melhores resultados obtidos com as CTMs do vilo na expansão *ex vivo* das CTPHs do SCUP em ambiente 2D, estas foram selecionadas para os experimentos em ambiente 3D.

### 5.6.2 Expansão em ambiente 3D

A hematopoiese requer um microambiente competente para o suporte à auto-renovação, diferenciação e proliferação celular (REGO, 2005). O microambiente atende a tais necessidades por meio de um conjunto de células de suporte que o constituem, pela secreção fatores solúveis e moléculas que constituem a MEC, pela interação célula-célula e célula-MEC, propiciando assim a sobrevivência das células progenitoras, a acomodação das células em desenvolvimento e as interações entre os diferentes tipos celulares, em um ambiente tridimensional e anatomicamente organizado na medula óssea (ABBOUD; LICHTMAN, 2001; LYMPERI *et al.*, 2010; REGO, 2005).

O colágeno I e o 6-sulfato de condroitina, presentes na estrutura 3D do Integra<sup>®</sup> (INTEGRA, 2012), são constituintes da MEC no microambiente hematopoiético (AGGARWAL *et al.*, 2012; CELSO *et al.*, 2007). O 6-sulfato de condroitina demonstrou mediar a ligação entre progenitores hematopoiéticos e células estromais (MINGUELL *et al.*, 1992). O colágeno I é também, um componente da matriz óssea e do microambiente hematopoiético na região endosteal, envolvido na regulação de mais de 50 genes em células CD34<sup>+</sup> cultivadas na sua presença (OSWALD *et al.*, 2006).

Dessa forma tem-se um microambiente constituído do componente celular (as CTMs), moléculas da MEC (colágeno I e 6-sulfato de condroitina), fatores solúveis (citocinas produzidas pelas CTMs) e as CTPHs (células CD34<sup>+</sup> do SCUP).

A expansão *ex vivo* das CTPHs foi avaliada com a co-cultura com CTMs do vilo em ambiente 2D e 3D, em três experimentos independentes e em triplicata, conforme descrito no item 4.5.8.2. Foram coletados e analisados os seguintes dados: contagem das CNT no meio sobrenadante do co-cultivo em 2D e após fluxo na matriz 3D; percentagem e número absoluto de células CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> nas amostras pré co-cultivo e no meio sobrenadante pós co-cultivo e respectivo controle; número e proporção de colônias no ensaio clonogênico nas amostras pré co-cultivo e com as células do meio sobrenadante após o co-cultivo em 2D e fluxo na matriz 3D e respectivo controle.

As CTPHs foram obtidas conforme descrito no item 4.4.3 e as CTMs do vilô conforme descrito no item 4.4.1. As CTMs utilizadas nestes experimentos foram obtidas das mesmas placentas que as empregadas nos procedimentos de expansão descritos no item 5.6.1, e em igual forma de preparação (*pool* de três doadoras), pelas razões já descritas.

Foram realizados experimentos com co-cultivo em ambiente 2D e 3D a fim de comparar os mesmos quanto à expansão de progenitores hematopoiéticos, utilizando CTPHs do mesmo doador para evitar a variabilidade biológica interindividual.

Em função da resistência da matriz à digestão enzimática pela colagenase, não foi avaliada a retenção de CTPHs após o fluxo para remoção dessas células do arcabouço 3D. Estudos histológicos e histoquímicos poderão contribuir nesse sentido e, principalmente, no entendimento da interação das CTPHs com as CTMs e a estrutura 3D.

Para avaliar o desprendimento de CTMs do arcabouço 3D para o meio durante o fluxo para remoção das CTPHs, foram realizados três experimentos em duplicata com o cultivo nas mesmas condições que os co-cultivos para a expansão *ex vivo*, porém sem a adição das CTPHs. Estes experimentos foram realizados com o intuito de estimar a interferência na contagem de CNT. O valor médio obtido foi 6.544 ( $\pm$  3.240) células por poço em placa de 24 de poços, o que representa uma estimativa total de 13,4% da contagem de CNT nas co-culturas com CTMs em ambiente 3D. Porém, parte desta interferência foi removida ao não computar na contagem as células com tamanho incompatível com a linhagem hematopoiética. Além disso, esses valores podem ser modificados pela presença das CTPHs junto com as CTMs, como foi procedido para estimar o valor da interferência. Por outro lado, na citometria a interferência das CTMs que foram removidas do arcabouço com o fluxo para remoção das células hematopoiéticas, não é considerável, pelas razões discutidas no item 5.6.1. Assim, optou-se por não descontar a estimativa de CTMs removidas nas contagens de CNT nos co-cultivos em 3D.

Os dados referentes à contagem de CNT e da citometria das células do meio sobrenadante e pré co-cultivo, são apresentados na tabela 20 e figuras 45, 46 e 47.



**Tabela 20.** Dados da contagem de CNT e citometria de fluxo da co-cultura de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilão em P5, em ambiente 2D e 3D.

	n	CNT		CD34 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> 38 <sup>+</sup>	
		x 10 <sup>3</sup>	% ± DP	x 10 <sup>3</sup> ± DP	% ± DP	x 10 <sup>3</sup> ± DP	%(± DP)	x 10 <sup>3</sup> ± DP	
Inicial	3	10	65,5 ±14,9	6,55 ±1,49	93,3 ±1,5	6,11 ±1,40	6,7 ±1,4	0,44 ±0,14	
CC 2D	3	244,17 ±53,0	6,3 ±1,9	14,59 ±1,26	98,0 ±0,5	14,29 ±1,18	2,0 ±0,5	0,3 ±0,09	
CC 3D	3	48,89 ±4,0	12,2 ± 3,4	6,02 ± 2,14	88,1 ±5,6	5,34 ±2,02	11,9 ±5,6	0,68 ±0,28	
3D	3	2,78 ±1,5	18,5 ± 5,9	0,46 ± 0,07	7,3 ±3,9	0,17 ±0,26	92,7 ±3,9	0,28 ±0,19	

CNT= células nucleadas totais no meio sobrenadante e após lavado da matriz 3D, contadas em hemocítômetro; Inicial= dados pré cultivos; CC 2D= células no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 2D; CC 3D= células obtidas do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do V, em P5, em ambiente 3D; 3D= células do cultivo de células CD34<sup>+</sup>, em ambiente 3D, sem CTMs. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata e co-cultivadas por 8 dias, em três experimentos independentes. As células do meio sobrenadante dos co-cultivos e do 3D foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE e anti-CD38-APC. Para o cálculo do valor absoluto foi multiplicado o valor da CNT pela % obtida na citometria para a respectiva população ou subpopulação celular, separadamente para cada amostra.

Assim como para os resultados da contagem de CNT discutidos no item 5.6.1, o suporte pelas CTMs foi fundamental para promover a amplificação das células CTPHs. As co-culturas em ambiente 2D e 3D promoveram uma expansão de 24,47x e 4,9x nas CNT, respectivamente, enquanto que na ausência das CTMs ocorreu uma redução de 3,22x, em relação ao número de células semeadas inicialmente (Figura 45).

A expansão em ambiente 2D foi maior do que a observada nos experimentos no item 5.6.1, com as mesmas CTMs, porém com CTPHs de outro doador, e diferenças entre as CTPHs pode ser uma das razões. Outra causa pode ser o tempo de co-cultura que neste conjunto de experimentos envolvendo também o ambiente 3D, por questões de ordem prática, foi de oito dias. O co-cultivo por mais tempo permitiu maior expansão, mas também pode ter contribuído para maior diferenciação. Este aspecto pode ser observado pela redução mais

proeminente na percentagem de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> em relação à inicial no co-cultivo por 8 dias em relação ao de sete dias (6,70% para 1,99% versus 2,98% para 2,79%, figuras 46 e 36 respectivamente). O mesmo ocorreu em relação às taxas de expansão de progenitores CD34 e subpopulações (Figuras 38 e 48).

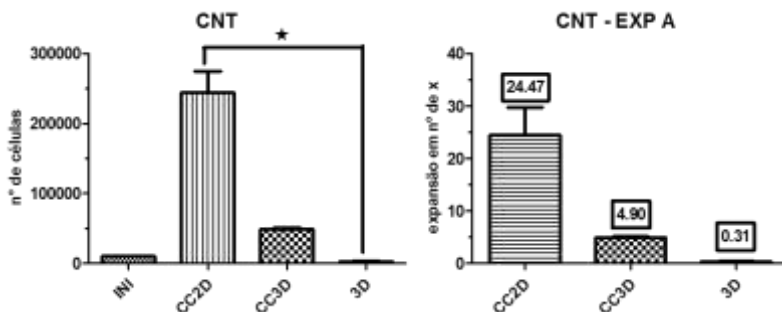
A expansão medida pela contagem de CNT, de células CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, foi maior na co-cultura em 2D em relação à 3D, com ou sem as CTMs. Entretanto, diferença estatisticamente significativa ocorreu somente em relação à condição 3D, sem CTMs (Figuras 45, 47 e 48). Oswald e colaboradores (2006), cultivaram células CD34<sup>+</sup> de SCUP em uma matriz 3D de colágeno I (bovino), com adição exógena de citocinas (Flt3-L, SCF e IL3). A análise da expressão gênica por *microarray*, e confirmada por PCR em tempo real, demonstrou a superexpressão dos genes DUSP2 e BTG2/TIS21. O gene DUSP2 pode inibir a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) envolvida na sinalização de citocinas (FEY *et al.*, 2012; YI *et al.*, 1995). O BTG2/TIS21 é um regulador do ciclo celular com atividade antiproliferativa (DOIDGE *et al.*, 2012; DURIEZ *et al.*, 2002). Os autores obtiveram discreta redução no número de células CD34<sup>+</sup> após o cultivo na matriz de colágeno, porém ocorreu expansão do número de UFC por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup>.

A modificação no perfil de expressão gênica relatado por Oswald e colaboradores (2006), pode ser um dos aspectos envolvidos na menor proliferação observada nas culturas com o arcabouço utilizado, em parte constituído de colágeno I.

Os resultados obtidos nas culturas em 3D sem as CTMs, com aumento na percentagem de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> e redução na sua contagem, bem como na contagem do total de células CD34<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e de CNT (Figuras 45 a 48), especialmente na condição sem as CTMs onde a contagem de CNT também reduziu (Tabela 20), sugerem que ocorreu morte/destruição das células CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> por menor resistência destas em relação às células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, conforme discutido anteriormente (OJEDA-URIBE *et al.*, 2004) e, em menor grau, pode ter ocorrido a hiporregulação na expressão do antígeno CD38. Devido ao reduzido número de células após o co-cultivo no ambiente 3D, sem as CTMs, não foi possível avaliar a viabilidade celular nesta condição.

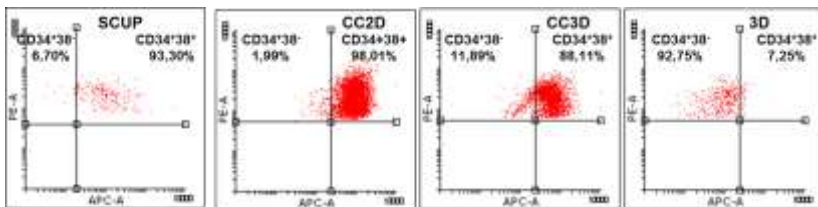
Nos cultivos 3D com CTMs, o aumento na percentagem e no número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>, com discreta redução no total de células CD34<sup>+</sup> e mais acentuada nas CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup>, são indicativos que pode ter ocorrido a hiporregulação do antígeno CD38 acompanhada de pequena expansão dos progenitores mais jovens. A maior resistência de

progenitores mais jovens à manipulação, pode estar envolvida em menor grau, conforme dados da viabilidade das células CD34 nesta condição (14,5% de células inviáveis *versus* 5,2% no co-cultivo em 2D, figura 49).

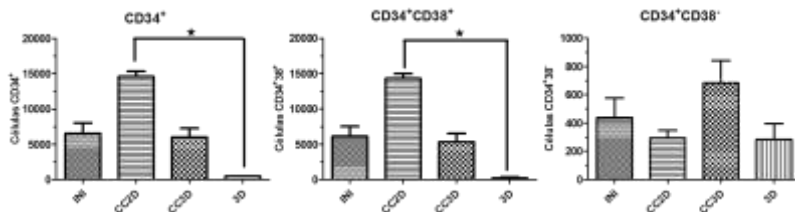


**Figura 45.** Contagem das CNT no meio sobrenadante e expansão das mesmas, em número de vezes, após co-cultivo células CD34<sup>+</sup>, por 8 dias, com CTMs do vilô em P5, em ambiente 2D e 3D. INI= representa o total de células CD34<sup>+</sup> semeadas inicialmente. CC2D= CNT no meio sobrenadante do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilô, em P5, em 2D; CC3D= CNT do co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do V, em P5, 3D; 3D= CNT do cultivo de células CD34<sup>+</sup>, em ambiente 3D, sem CTMs. Foram semeadas 10<sup>4</sup> células CD34<sup>+</sup> obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata e cultivadas por 8 dias, em três experimentos independentes. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de células nucleadas em relação ao total semeado inicialmente, calculada pela relação entre a CNT após o cultivo das células CD34<sup>+</sup> na presença (co-cultivo) ou não de CTMs e a inicial. Testes de Friedman e de Kruskal-Wallis, ambos com o pós teste de Dunn (\*p<0,05).

A retenção de CTPHs no arcabouço também não pode ser descartada, uma vez que não foi possível avaliar se esta havia ocorrido ou não após o fluxo para remoção das células da linhagem hematopoiética. Um aumento na retenção das CTPHs no arcabouço em função da maior interação com as CTMs que pode ser promovida pelo sulfato de condroitina (MINGUELL *et al.*, 1992) e da adesão ao colágeno I (OSWALD *et al.*, 2006), pode ter contribuído nesse sentido.

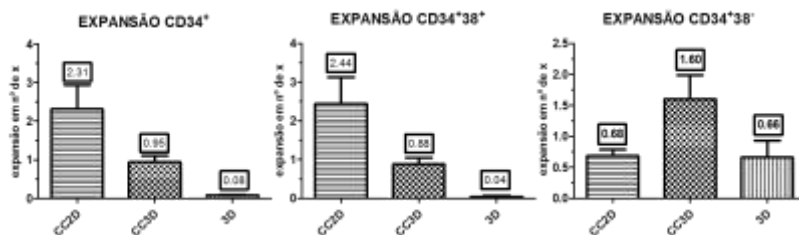


**Figura 46.** Imagem representativa da citometria de fluxo com valores percentuais médios das subpopulações celulares  $CD34^+38^+$  e  $CD34^+38^-$  pré e pós co-cultivo de células  $CD34^+$ , por 8 dias, com CTMs do vilô em P5, em 2D e 3D. SCUP= sangue de cordão umbilical e placentário; CC2D= citometria das células no meio sobrenadante do co-cultivo de células  $CD34^+$  com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D; CC3D= citometria das células do co-cultivo de células  $CD34^+$  com CTMs do V, em P5, em ambiente 3D; 3D= citometria das células do cultivo de células  $CD34^+$ , em ambiente 3D, sem CTMs. Foram semeadas  $10^4$  células  $CD34^+$  por poço (placa de 24 poços), em duplicata e cultivadas por 8 dias, em três experimentos independentes. As células do SCUP e do meio sobrenadante do co-cultivo foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD38-APC e anti-CD34-PE e analisadas por citometria de fluxo.



**Figura 47.** Contagem de células  $CD34^+$  e das subpopulações celulares  $CD34^+38^+$  e  $CD34^+38^-$ , por citometria de fluxo pré e pós cultivo de células  $CD34^+$ , por 8 dias, com CTMs do vilô em P5, em 2D e 3D. INI= número de células  $CD34^+$  e das subpopulações pré cultivo; CC2D= número de células  $CD34^+$  e das subpopulações após co-cultivo com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D; CC3D= número de células  $CD34^+$  e das subpopulações após co-cultivo com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 3D; 3D= número de células  $CD34^+$  e das subpopulações após cultivo, em ambiente 3D, sem CTMs. Foram semeadas  $10^4$  células  $CD34^+$  por poço (placa de 24 poços), em triplicata e cultivadas por 8 dias, em três experimentos independentes. Foram semeadas  $10^4$  células  $CD34^+$  obtidas no sistema de seleção positiva, por poço (placa de 24 poços), em triplicata, em três experimentos independentes. A citometria foi realizada do pool celular de cada triplicata, de cada condição de cultura e em cada experimento independente. As células foram marcadas com anti-CD45-FITC, anti-CD38-APC e anti-CD34-PE.

Além disso, o perfil de produção de citocinas pode mudar da condição 2D para a 3D (PATEL *et al.*, 2010), sendo outro aspecto a ser investigado, visto que nesta pesquisa a análise da expressão de citocinas pelas CTMs restringiu-se ao ambiente 2D.

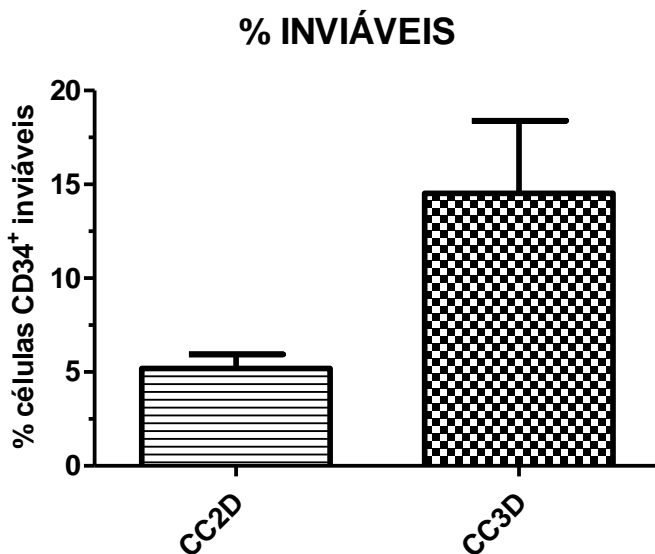


**Figura 48.** Expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>), em número de x à inicialmente cultivada, avaliada por citometria de fluxo após 8 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilão em P5, em 2D e 3D. CC2D= expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações após co-cultivo com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 2D; CC3D= expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações após co-cultivo com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 3D; 3D= expansão das células CD34<sup>+</sup> e subpopulações após cultivo em ambiente 3D, sem CTMs. Dados de três experimentos independentes, em triplicata.

O exposto no item 5.6.1 no que se refere à importância e razões para a realização dos ensaios clonogênicos, à metodologia para sua execução (exceto o meio, H4437 em vez do H4434) e ao modo para o cálculo e expressão dos resultados, se aplicam aos experimentos realizados neste tópico.

Os resultados obtidos nos ensaios clonogênicos em 3 experimentos independentes constam na tabela 21 e figuras 50 a 54.

Os resultados dos ensaios clonogênicos evidenciam a importância das CTMs como componente celular do microambiente hematopoiético e confirmam a tendência demonstrada na citometria de fluxo, quando levado em consideração o total de células CD34<sup>+</sup>. O co-cultivo destas células com as CTMs em ambiente 2D amplificou o número de todos os tipos de UFC, enquanto que o inverso ocorreu nos cultivos em 3D sem a presença das CTMs (Figuras 50 a 53). No cultivo em 3D com as CTMs houve amplificação no número de UFC-GM e UFC totais (Figuras 50 a 53). Em ambos os co-cultivos, 2D e 3D, a maior expansão ocorreu nos precursores de granulócitos e macrófagos (8,06x e 2,65x, respectivamente, figura 51) repetindo o comportamento observado nos co-cultivos com essas CTMs, relatados no item 5.6.1 (11,1x, Figura 41).



**Figura 49.** Percentual de células CD34<sup>+</sup> inviáveis, avaliada por citometria de fluxo após a cultura das mesmas por 8 dias com CTMs do vilão em P5, em 2D e 3D. CC2D= percentual de células CD34<sup>+</sup> inviáveis após co-cultivo com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 2D; CC3D= percentual de células CD34<sup>+</sup> inviáveis após co-cultivo com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 3D; As células do meio sobrenadante das culturas foram marcadas com anti-CD45-FITC e anti-CD34-PE, acrescido do corante de ácidos nucleicos 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo (teste de Mann Whitney. \*p<0,05).

Entretanto, ainda que a expansão das CNT no co-cultivo em ambiente 2D, por 8 dias tenha sido maior que no co-cultivo por 7 dias (24,47x *versus* 14,4x, figuras 45 e 34 respectivamente), a taxa de expansão dos progenitores mais primitivos (UFC-GEMM) reduziu no co-cultivo por 8 dias (5,7x para 4,37x, figuras 42 e 52), assim como diminuiu a proporção destes progenitores em relação ao inicial (8,1% para 5,3%), reforçando a indicação de uma possível proliferação com diferenciação, em detrimento da autorrenovação. Estes dados demonstram que o aumento no tempo de expansão em ambiente 2D, nestas condições experimentais, pode não ser vantajoso e que tempos menores devem ser estudados.

O período de sete dias de co-cultura de CTPHs de SCUP com CTMs da medula óssea demonstrou ser o melhor propiciando as taxas

mais altas dos progenitores primitivos CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> c-kit<sup>+</sup> (RODRÍGUEZ-PARDO; VERNOT, 2013) e reduzindo os riscos de ocorrência de defeitos durante a expansão *ex vivo* que levam a falha na pega do enxerto (LIU, BIANLING *et al.*, 2003) e apoptose (HOFMEISTER *et al.*, 2007).

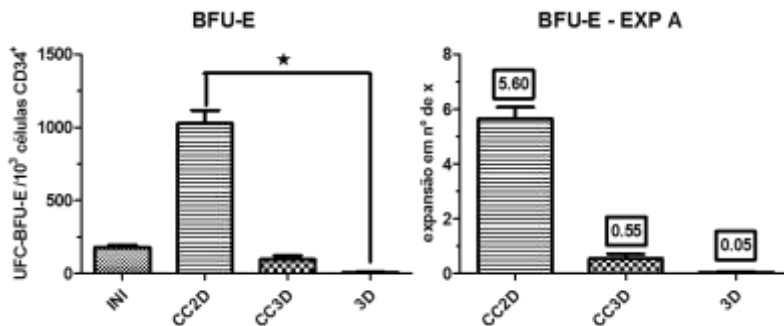
Por outro lado a expansão com co-cultivo em ambiente 3D, tanto no que se refere às taxas de expansão dos diferentes tipos de progenitores, quanto à proporção dos mais primitivos, não se mostrou vantajosa em relação ao co-cultivo em 2D, além de envolver maior complexidade metodológica e custos. Essa pode ser uma das razões que a maioria das pesquisas de expansão *ex vivo* são realizadas em ambiente 2D, além de serem as únicas fornecendo CTPHs expandidas para uso em pacientes (LIMA, MARCOS DE *et al.*, 2012; ROBINSON, S N *et al.*, 2011).

**Tabela 21.** Dados dos ensaios de formação de colônias (número e proporção de cada tipo) com as células CD34<sup>+</sup> pré e após o co-cultivo destas com CTMs do vilô em P5, em ambiente 2D e 3D.

	BFU-E		UFC-GM		UFC-GEMM		UFC-TOTAL
	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP	% ± DP	n° ± DP
Inicial	180,7 ±15,0	48,1 ±0,76	164,3 ±10,3	43,8 ±0,7	30,30 ±5,1	8,1 ±1,1	375,3 ±28,1
CC 2D	1026,0 ±157,1	41,3 ±2,89	1324,0 ±136,6	53,5 ±3,3	130,9 ±25,4	5,3 ±0,5	2480,9 ±279,9
CC 3D	97,4 ±44,0	18,4 ±8,9	435,0 ±99,9	79,5 ±9,7	10,8 ±3,9	2,0 ±0,8	543,3 ±65,1
3D	8,5 ±6,5	20,1 ±10,4	27,3 ±1,5	72,5 ±12,7	3,0 ±1,7	7,4 ±2,3	38,8 ±9,8

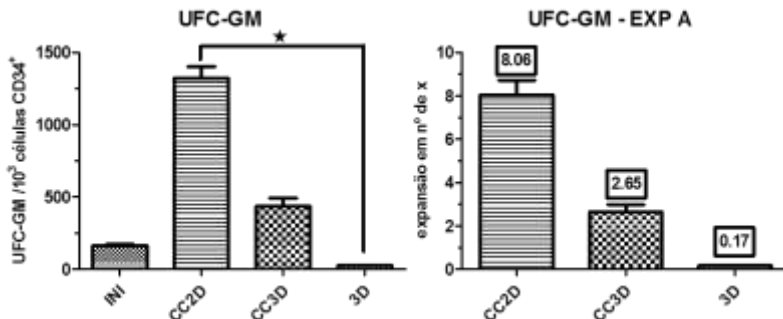
Inicial= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup>, pré expansão; CC 2D= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pós-expansão em co-cultivo com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D. CC 3D= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pós-expansão em co-cultivo com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 3D; 3D= ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> pós-expansão em cultivo sem CTMs, em ambiente 3D. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4437, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

Diversas causas de ordem metodológicas como dificuldades na remoção das CTPHs, na nutrição no interior do arcabouço, organização e propriedades mecânicas do mesmo (REILLY; ENGLER, 2010), podem ter contribuído para os resultados obtidos, além da indução da expressão de genes envolvidos na inibição do ciclo celular e da via da MAPK (DOIDGE et al., 2012; DURIEZ et al., 2002; FEY et al., 2012).



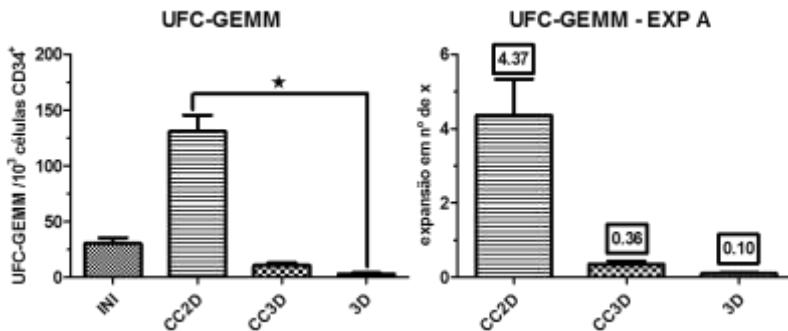
**Figura 50.** Contagem de colônias BFU-E e expansão dos progenitores eritróides do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilô em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias. INI= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CC2D= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D; CC3D= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 3D; 3D= número de progenitores eritróides no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em cultura sem CTMs, em ambiente 2D. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao pré cultivo, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4437, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.





**Figura 51.** Contagem de UFC-GM e expansão dos progenitores GM do SCUP, após 8 dias de co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilô em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias. INI= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CC2D= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D; CC3D= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 3D; 3D= número de progenitores GM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em cultura sem CTMs, em ambiente 2D. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao pré cultivo, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4437, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

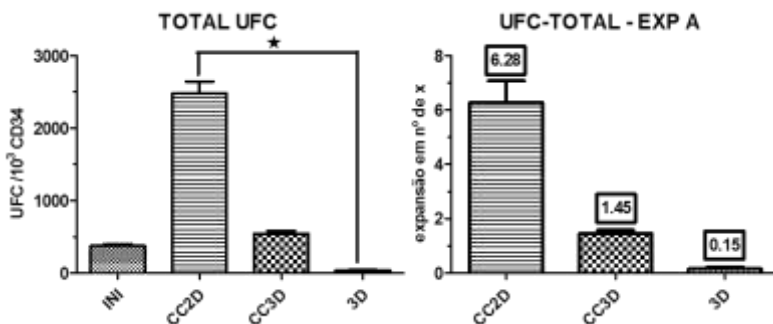
Assim, mais estudos devem ser realizados para aperfeiçoar o uso do arcabouço Integra® na expansão ex vivo de CTPHs do SCUP como avaliação da produção de citocinas pelas CTMs do vilô nesta estrutura 3D, avaliação histológica (em andamento), testagem de diferentes períodos de expansão (3 e 5 dias), remoção da membrana de silicone e movimentação da matriz para melhorar a nutrição e avaliação da expressão dos genes DUSP2 e BTG2/TIS21, visto que a constituição do mesmo parece adequada para mimetizar o microambiente hematopoiético.



**Figura 52.** Contagem de UFC-GEMM e expansão de progenitores GEMM do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilão em P5, em 2D e 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias. INI= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CC2D= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 2D; CC3D= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilão, em P5, em ambiente 3D; 3D= número de progenitores GEMM no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em cultura sem CTMs, em ambiente 2D. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao pré cultivo, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4437, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

Com base nos dados dos ensaios clonogênicos pode-se inferir que o co-cultivo com CTMs do vilão em ambiente 2D se revelou, nas condições metodológicas utilizadas, melhor do que o co-cultivo em ambiente 3D para a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP, pois gerou as maiores taxas de amplificação, mantendo a funcionalidade das mesmas.

Com base nos resultados dos ensaios clonogênicos, da contagem de CNT e os da citometria (CD34<sup>+</sup> e subpopulações CD34<sup>+</sup>38<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup>), ambos obtidos dos co-cultivos, com os dados da expressão gênica de citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs do vilão (item 5.3), pode-se concluir que, nas condições experimentais deste estudo, o co-cultivo de células CD34<sup>+</sup> do SCUP com CTMs do vilão em P5, em ambiente 2D, representa a melhor condição para a expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP.



**Figura 53.** Contagem do total de UFC e expansão dos progenitores hematopoiéticos do SCUP, após 8 dias de cultivo de células CD34<sup>+</sup> com CTMs do vilô em P5, em 2D ou 3D, mensurada pelo ensaio de formação de colônias. INI= número total de UFC no ensaio de formação de colônias, pré expansão; CC2D= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 2D; CC3D= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em co-cultura com CTMs do vilô, em P5, em ambiente 3D; 3D= número total de UFC no ensaio de formação de colônias com células CD34<sup>+</sup> após a expansão em cultura sem CTMs, em ambiente 2D. Resultados expressos por 10<sup>3</sup> células CD34<sup>+</sup> ou o equivalente para as células pós-expansão. Exp A= expansão absoluta, representa a expansão de precursores em relação ao pré cultivo, expresso em número de vezes. Os valores resultam da média de três experimentos independentes, realizados em duplicata, em meio semissólido H4437, por 12 a 14 dias e calculados separadamente para cada replicata e amostra.

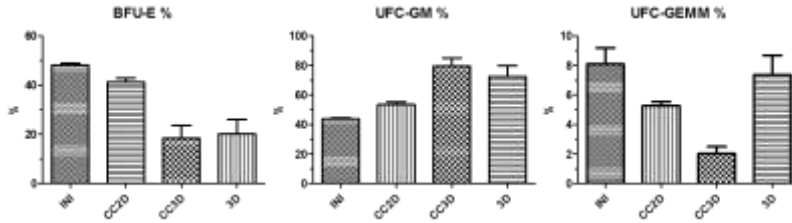


Figura 54. Proporção dos diferentes tipos de colônias obtidas no ensaio de formação de colônias com células CD34+ pré e pós co-cultivo com CTMs do vilo em P5, em 2D e 3D. INI= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com as células CD34+, pré co-cultivo; CC2D= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células do co-cultivo com CTMs do vilo, em P5, em ambiente 2D; CC3D= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células do co-cultivo com CTMs do vilo, em P5, em ambiente 3D; 3D= proporção do respectivo tipo de colônia obtida com células da cultura sem a presença de CTMs, em ambiente 3D.

## 6 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 6.1 CONCLUSÕES

- As células obtidas da MC e do viló apresentam as características morfológicas e imunofenotípicas de CTMs. Estas características se mantiveram nas três passagens estudadas (P1, P5 e P10);
- Não foram detectadas diferenças morfológicas e imunofenotípicas entre as CTMs da MC e do viló, nas condições estudadas;
- As CTMs obtidas da MC e do viló expressam os genes das citocinas hematopoiéticas SCF, Flt3-L, TPO, IL6, IL16 e SDF1, nas passagens P1, P5 e P10;
- As CTMs da MC em P1 e as do viló em P5 demonstraram maior expressão gênica em número maior de citocinas hematopoiéticas, dentre as avaliadas, nos respectivos tecidos e foram definidas como as passagens com melhor perfil para os testes de expansão *ex vivo* das CTPHs, em co-culturas no ambiente 2D;
- Quando comparadas as CTMs da MC em P1 e as do viló em P5, as primeiras demonstraram nível mais elevado na expressão gênica da IL6 que as segundas, enquanto que as segundas expressaram mais SCF, Flt3-L, TPO, IL16 e SDF1 que as primeiras;
- A idade gestacional influenciou positivamente a leucometria global, as MNC, a plaquetometria, o número e proporção de UFC-GEMM, o total de UFC e a taxa de expansão *ex vivo* das UFC-GEMM;
- O peso do RN influenciou positivamente a leucometria global e as MNC;
- A leucometria global influenciou positivamente a proporção de UFC-GEMM, o número de células CD34<sup>+</sup>38<sup>-</sup> por mL e a taxa de expansão *ex vivo* das BFU-E;
- A percentagem e o número de NRBC por mL influenciaram positivamente a percentagem e o número de células CD34<sup>+</sup>, o número de UFC-GM e o total de UFC por mL. A percentagem de NRBC influenciou positivamente, também, a taxa de expansão *ex vivo* das UFC-GEMM;

- O número de células CD34<sup>+</sup> por mL influenciou positivamente o número de BFU-E, UFC-GM e o total de UFC por mL e a taxa de expansão *ex vivo* das UFC-GEMM;
- Os resultados obtidos na pesquisa de correlação entre fatores materno-fetais e parâmetros do SCUP e entre os próprios parâmetros do SCUP, sugerem a seleção de USCUP oriundas de doações com idade gestacional acima de 39,5 semanas, contagens de leucócitos acima de  $13,05 \times 10^6$  por mL, percentagem de NRBC igual ou maior de 2,875% e com contagem de células CD34<sup>+</sup> superiores a  $23,73 \times 10^3$  células por mL, como critérios para obtenção de amostras de melhor conteúdo hematopoiético e mais apropriadas para a expansão *ex vivo*;
- As CTMs demonstraram ser fundamentais para a expansão *ex vivo* das CTPHs obtidas do SCUP e para a manutenção da funcionalidade das mesmas durante os procedimentos de expansão;
- As CTMs obtidas do vilo em P5, demonstraram ser as mais eficazes na expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP, em ambiente 2D, dentre as condições testadas;
- As CTMs do vilo em P5, em ambiente 2D, demonstraram ser mais eficazes na expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP que em ambiente 3D com a MRD Integra<sup>®</sup>;
- A melhor condição para expansão *ex vivo* de CTPHs do SCUP, dentre as avaliadas, compreende a co-cultura de CTPHs oriundas de doações com idade gestacional acima de 39,5 semanas, contagens de leucócitos acima de  $13,05 \times 10^6$  por mL, percentagem de NRBC igual ou maior de 2,875%, com contagem de células CD34<sup>+</sup> superiores a  $23,73 \times 10^3$  células por mL, em ambiente 2D e com suporte de CTMs do vilo em P5.

## 6.2 RECOMENDAÇÕES

- Análises histológicas dos arcabouços 3D (Integra<sup>®</sup>) em culturas com CTMs, com CTPHs e co-cultivos CTMs e CTPHs (em andamento – as amostras encontram-se emblocadas em parafina);
- Análise das lâminas realizadas com as células dos co-cultivos em 2D e 3D e coradas com MGG;

- Quantificação das citocinas de interesse hematopoiético no meio condicionado das culturas de CTMs da MC e do vilo, em 2D (em andamento - colaboração com a FIOCRUZ-PR);
- Avaliação da produção das citocinas de interesse hematopoiético pelas CTMs em ambiente 3D;
- Co-cultivos em 2D e 3D com substituição do SBF por soro autólogo;
- Realizar a expansão de CTPHs do SCUP em co-cultivo com CTMs em diferentes períodos de tempo (5, 7 e 9 dias) e análise da expressão dos genes DUSP2 e BTG2/TIS21.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, C.; LICHTMAN, M. A. Structure of marrow and the hematopoietic microenvironment. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. (org.). **Williams Hematology**. California, 2001.v.1,p. 29-58.

ABTO-Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes: JAN/DEZ 2010**. São Paulo: [s.n.], 2010.Ano XVI – n. 4. Disponível em: <abto.org.br>. Acesso em: 13 novembro 2013.

ABTO-Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Dimensionamento dos transplantes no Brasil e em cada estado (2005-2012)**.São Paulo: [s.n.], 2012. Ano XVIII, n. 4. Disponível em: <abto.org.br>. Acesso em: 13 novembro 2013.

ABUMAREE, M. H.; AL JUMAH, M.A; KALIONIS, B.; et al. Phenotypic and Functional Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Chorionic Villi of Human Term Placenta.**Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 9, n. 1,p. 16-31, fev. 2013.

ACCORSI, P.; PASSERI, C.; IACONE, A.A multiple regression analysis on factors influencing haematopoietic progenitor cell collection for autologous transplantation.**Transfusion and apheresis science**, Philadelphia, v. 47, n. 2, p. 223-7, out. 2012.

AGGARWAL, R.; LU, J.; POMPILI, V.J.; et al.Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. **Current Molecular Medicine**, Omaha, v. 12, n. 1, p. 34-49, jan. 2012.

AL-SWEEDAN, S. A.; MUSALAM, L.; OBEIDAT, B. Factors predicting the hematopoietic stem cells content of the umbilical cord blood. **Transfusion and apheresis science**, Philadelphia, v.48, n.2, p.247-252,abr. 2013.

ALLAN, D.; PETRASZKO, T.; ELMOAZZEN, H.; SMITH, S. A Review of Factors Influencing the Banking of Collected Umbilical Cord Blood Units Cord Blood Transplantation: Implications. **Stem Cells International**, New York, v.2013, n. 463031, p.1-7, jan.2013.

ALVAREZ-SILVA, M.; SALAUN, J.; DIETERLEN-LIEVRE, F. The mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 22, p. 5437-5444, nov. 2003.

ANDRADE, P. Z.; SANTOS, F. DOS; ALMEIDA-PORADA, G.; et al. Systematic delineation of optimal cytokine concentrations to expand hematopoietic stem/progenitor cells in co-culture with mesenchymal stem cells. **Molecular BioSystems**, London, v. 6, n. 7, p. 1207-1215, abr. 2010.

ANDRADE, P. Z.; SILVA, C.L. DA; SANTOS, F. DOS; et al. Initial CD34(+) Cell-Enrichment of Cord Blood Determines Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Yield Upon Ex Vivo Expansion. **Journal of Cellular Biochemistry**, Chichester, v. 112, n. 7, p. 1822-1831, jul.2011.

ARORA, M.; NAGARAJ, S.; WAGNER, JOHN E.; et al. Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) following unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): higher response rate in recipients of unrelated donor (URD) umbilical cord blood (UCB). **Biology of blood and marrow transplantation**, Philadelphia, v. 13, n. 10, p. 1145-52, out. 2007.

AVERY, S.; BARKER, JULIET N. Cord blood transplants: one, two or more units? **Current Opinion in Hematology**, Boston, v. 17, n. 6, p. 531-7, Nov. 2010.

BACAL, N. S.; GUERRA, J. C. C.; KANAYAMA, R. H.; et al. Quantificação de células CD 34 + em sangue periférico , produto de aférese e cordão umbilical: estudo comparativo de três diferentes metodologias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 69-78, maio/ago.2001.

BAIN, B. J. Morfologia das células sanguíneas. In: **Células sanguíneas - um guia prático**. Porto Alegre, 2004.p. 64-169.

BALLEN, K.K.; WILSON, M.; WUU, J. et al. Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 27, n. 1, p. 7-14, jan. 2001.

BALLMAIER, M.; GERMESHAUSEN, M. Advances in the understanding of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. **British Journal of Haematology**, Chichester, v. 146, n. 1, p. 3-16, jun. 2009.

BÁRCENA, A.; KAPIDZIC, M.; MUENCH, M. O. et al. The human placenta is a hematopoietic organ during the embryonic and fetal periods of development. **Developmental Biology**, Philadelphia, v. 327, n. 1, p. 24-33, mar. 2009.

BÁRCENA, A.; MUENCH, M. O.; KAPIDZICA, M. et al. Human placenta and chorion: potential additional sources of hematopoietic stem cells for transplantation. **Transfusion**, Malden, v. 51, Suppl 4, p. 94-105, nov.2011.

BARKER, J.N; WAGNER, J.E. Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. **Current Opinion in Oncology**, Boston, v. 14, p. 160-164, mar. 2002.

BARKER, J. N. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. **Blood**, Washington, v. 97, n. 10, p. 2957-2961, maio. 2001.

BARKER, J.N; SCARADAVOU, A.; STEVENS, C. E. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. **Blood**, Washington, v. 115, n. 9, p. 1843-9, mar. 2010.

BARKER, J.N; WEISDORF, D.J; DEFOR, T.E. et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. **Blood**, Washington, v. 105, n. 3, p. 1343-7, fev. 2005.

BARLOW, S.; BROOKE, G.; CHATTERJEE, K. et al. Comparison of human placenta- and bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, Nova York, v. 17, n. 6, p. 1095-1107, dez. 2008.

**BMDW-BONE MARROW DONOR WORLDWIDE-Welcome to Bone Marrow Donors Worldwide.** Disponível em: <<http://www.bmdw.org>>. Acesso em: 10 maio . 2013.

BENTLEY, T. S.; HANSON, S. G. MILLIMAN. U.S. Milliman Research Report. **Organ and tissue transplant cost estimates and discussion.** [S.l: s.n.], 2011. 20 p.

BERTHO, J. M.; DEMARQUAY, C.; MOUISEDDINE, M. et al. Bone marrow stromal cells spontaneously produce Flt3-ligand: influence of ionizing radiations and cytokine stimulation. **International Journal of Radiation Biology**, Toronto, v. 84, n. 8, p. 659-67, ago. 2008.

BORDEAUX-REGO, P.; LUZO, A.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. O.; CROSARA-ALBERTO, D. P. Both interleukin-3 and interleukin-6 are necessary for better ex vivo expansion of CD133+ cells from umbilical cord blood. **Stem Cells and Development**, Nova York, v. 19, n. 3, p. 413-421, mar. 2010.

BOUZAS, L. F. **Cord blood banking programme BRASILCORD: working group meeting-presentation.** Dublin-Ireland: [s.n.], 2010.43 slides, color. Acompanha texto em pdf. Disponível em: <[http://www.worldmarrow.org/fileadmin/Committees/CBWG/20100617-CBWG-PRES-Brasil\\_Cord.pdf](http://www.worldmarrow.org/fileadmin/Committees/CBWG/20100617-CBWG-PRES-Brasil_Cord.pdf)>. Acesso em: 15 dezembro de 2013.

BRAND, A.; EICHLER, H.; SZCZEPIORKOWSKI, Z. M. et al. Viability does not necessarily reflect the hematopoietic progenitor cell potency of a cord blood unit: results of an interlaboratory exercise. **Transfusion**, Malden, v. 48, n. 3, p. 546-9, mar. 2008.

BRASIL.Ministério da Saúde. Agência Nacional de Saúde Suplementar. **Brasil tem uma das maiores taxas de cesariana na Saúde Suplementar.** 2006. Disponível em: <[http://www.ans.gov.br/portal/site/home2/destaque\\_22585\\_2.asp](http://www.ans.gov.br/portal/site/home2/destaque_22585_2.asp)>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BROUDY, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis.**Blood**, Washington, v. 90, n. 4, p. 1345-64, ago. 1997.

BROXMEYER, H.E.; DOUGLAS, G.W.; HANGOC, G. et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 10, p. 3828-32, maio. 1989.

BRUNSTEIN, C.G.; BARKER, J.N.; WEISDORF, D.J.; et al. Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 43, n. 12, p. 935-40, jun. 2009.

BRUNSTEIN, C.G; BARKER, J.N; WEISDORF, D.J; et al. Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. **Blood**, Washington, v. 110, n. 8, p. 3064-70, out. 2007.

BRUNSTEIN, C.G; NOREEN, H.; DEFOR, T.E; et al. Anti-HLA antibodies in double umbilical cord blood transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Philadelphia, v. 17, n. 11, p.1704-1708, maio. 2011.

BURKE, J. F.; YANNAS, I. V.; QUINBY, W. C.; et al. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Annals of Surgery**, Boston, v. 194, n. 4, p. 413-28, out. 1981.

BUCKNER, C. D.; EPSTEIN, R. B.; RUDOLPH, R. H.; CLIFT, R. A.; THOMAS, E DONNALL. Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. **Blood**, v. 35, n. 6, p. 741-750, 1970.

CAIRO, M. S.; WAGNER, E. L.; FRASER, J. et al. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: a Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. **Transfusion**, Malden, v. 45, n. 6, p. 856-866, jun. 2005.

CALVI, L. M.; LINK, D. C. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. **Calcified tissue international**, New York, v. 94, n. 1, p. 112-24, jan. 2014.

CASTELLO, S.; PODESTÀ, M.; MENDITTO, V. G. et al. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 32, n. 8, p. 782-7, ago. 2004.

CAVALLO, C.; CUOMO, C.; FANTINI, S. et al. Comparison of alternative mesenchymal stem cell sources for cell banking and musculoskeletal advanced therapies. **Journal of Cellular Biochemistry**, Los Angeles, v. 112, n. 5, p. 1418-1430, maio. 2011.

CELSO, C. LO; KLEIN, R.J.; SCADDEN, D.T. Analysis of the hematopoietic stem cell niche. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, Boston, suppl. 3;unit2A.5.,p. 1-31, nov.2007.

CHADIPIRALLA, K.; YOCHIM, J. M.; BAHULEYAN, B. et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 340, n. 2, p. 323-33, maio. 2010.

CHHABRA, A.; LECHNER, A. J.; UENO, M. et al. Trophoblasts Regulate the Placental Hematopoietic Niche through PDGF-B Signaling. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 22, n. 3, p. 651-659, fev. 2012.

CHOI, Y.-W.; PARK, H. H.; OH, D. J. Ex vivo expansion of hematopoietic cells from CD34+ cord blood cells in various culture conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Netherlands, v. 15, n. 1, p. 157-166, mar. 2010.

CHRISTOPHERSON, K. W.; HANGOC, G.; MANTEL, C. R.; BROXMEYER, H.E. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. **Science**, Washington, v. 305, n. 5686, p. 1000-3, ago. 2004.

CSASZAR, E.; COHEN, S.; ZANDSTRA, P. W. Blood stem cell products: Toward sustainable benchmarks for clinical translation. **Bioessays**, Malden, v. 35, n. 3, p. 201-10, nov. 2013.

DAR, A.; KOLLET, ORIT; LAPIDOT, T. Mutual, reciprocal SDF-1/CXCR4 interactions between hematopoietic and bone marrow stromal cells regulate human stem cell migration and development in NOD/SCID chimeric mice. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 34, n. 8, p. 967-75, ago. 2006.

DELANEY, C.; HEIMFELD, S.; BRASHEM-STEIN, C. et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. **Nature Medicine**, New York, v. 16, n. 2, p. 232-236, fev. 2010.

DELANEY, M.; BALLEEN, KAREN K. The role of HLA in umbilical cord blood transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 179-187, jun. 2010.

DIAZ-PRADO, S.; MUINOS-LOPEZ, E.; HERMIDA-GOMEZ, T. et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Amniotic Membrane. **Tissue Engineering Part C**, Nova York, v. 17, n. 1, p. 49-59, jan. 2011.

DOIDGE, R.; MITTAL, S.; ASLAM, A.; WINKLER, G. S. The anti-proliferative activity of BTG/TOB proteins is mediated via the Caf1a (CNOT7) and Caf1b (CNOT8) deadenylase subunits of the Ccr4-not complex. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. e51331, jan. 2012.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 8, n. 4, p. 315-7, jan. 2006.

DOULATOV, S.; NOTTA, F.; EPPERT, K. et al. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. **Nature Immunology**, New York, v. 11, n. 7, p. 585-93, jul. 2010.

DUNCAN, A. W.; RATTIS, F. M.; DIMASCIO, L. N. et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 3, p. 314-22, mar. 2005.

DURIEZ, C.; FALETTE, N.; AUDOYNAUD, C. et al. The human BTG2/TIS21/PC3 gene: genomic structure, transcriptional regulation and evaluation as a candidate tumor suppressor gene. **Gene**, Philadelphia, v. 282, n. 1-2, p. 207-14, jan. 2002.

DZIERZAK, E.; ROBIN, C. Placenta as a source of hematopoietic stem cells. **Trends in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 361-7, ago. 2010.

EAPEN, M.; ROCHA, V.; SANZ, G. et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. **The Lancet Oncology**, Philadelphia, v. 11, n. 7, p. 653-60, jul. 2010.

EMOND, H.; BOYER, L.; ROY, D.-C.; PINEAULT, N. Co-transplantation of ex vivo expanded progenitors with non-expanded cord blood cells improves platelet recovery. **Stem Cells and Development**, Nova York, v. 21, n. 17, p. 3209-19, jul. 2012.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, London, v. 58, n. 1, p. 33-42, set. 2008.

FAILACE, R. R.; FERNANDES, F. B.; FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2009. 424p.

FAN, C. G.; ZHANG, Q. J.; ZHOU, J. R. Therapeutic Potentials of Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord. **Stem Cell Reviews and Reports**, New York, v. 7, n. 1, p. 195-207, mar. 2011.

FAN, J.; DING, X.; JIANG, Y. A novel monoclonal antibody of human stem cell factor inhibits umbilical cord blood stem cell ex vivo expansion. **Journal of Hematology & Oncology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 73, jan. 2012.

FAN, X.; GAY, F. P. H.; ONG, S.-Y. et al. Mesenchymal stromal cell supported umbilical cord blood ex vivo expansion enhances regulatory T cells and reduces graft versus host disease. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 610-9, maio. 2013.



FENG, Q.; CHAI, C.; JIANG, X.-S.; LEONG, K. W.; MAO, H.-Q. Expansion of engrafting human hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional scaffolds with surface-immobilized fibronectin.

**Journal of Biomedical Materials Research**, Malden, v. 78, n. 4, p. 781-791, ago. 2008.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, V.; PELAYO, R.; FLORES-GUZMÁN, PATRICIA; et al. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, Philadelphia, v. 47, n. 4, p. 205-13, dez. 2011.

FERREIRA, E.; DULLEY, F. L.; MORSOLETTI, F.; NETO, J. Z.; PASQUINI, R. Bone marrow transplantation in Brazil. **Human Immunology**, Philadelphia, v. 14, n. 3, p. 324-32, nov. 1985.

FEY, D.; CROUCHER, D. R.; KOLCH, W.; KHOLODENKO, B. N. Crosstalk and signaling switches in mitogen-activated protein kinase cascades. **Frontiers in Physiology**, Switzerland, v. 3, n. 1, p. 355, jan. 2012.

FRIEDMAN, R.; BETANCUR, M.; BOISSEL, L. et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells : Adjuvants for Human Cell Transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Philadelphia, v. 13, n.12, p. 1477-1486, dez.2007.

FUCHS, E.; O'DONNELL, P. V.; BRUNSTEIN, CLAUDIO G. Alternative transplant donor sources: is there any consensus? **Current Opinion in Oncology**, Boston, v. 25, n. 2, p.173-9, mar. 2013.

GAJKOWSKA, A; OLDAK, T.; JASTRZEWSKA, M. et al. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in leukapheresis product and bone marrow for clinical transplantation: a comparison of three methods. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, Poland, v. 44, n. 1, p. 53-60, jan. 2006.

GAMMAITONI, L.; WEISEL, K. C.; GUNETTI, M. et al. Elevated telomerase activity and minimal telomere loss in cord blood long-term cultures with extensive stem cell replication. **Blood**, Washington, v. 103, n. 12, p. 4440-4448, jun. 2004.

GARDERET, L.; DULPHY, N.; DOUAY, C. et al. The umbilical cord blood alphabeta T-cell repertoire: characteristics of a polyclonal and naive but completely formed repertoire. **Blood**, Washington, v. 91, n. 1, p. 340-6, jan. 1998.

GILLILAND, D. G.; GRIFFIN, J. D. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. **Blood**, Washington, v. 100, n. 5, p. 1532-42, set. 2002.

GLUCKMAN, E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. **Blood Reviews**, Philadelphia, v. 25, n. 6, p. 255-259, nov. 2011.

GLUCKMAN, E; BROXMEYER, H E; AUERBACH, A. D.; FRIEDMAN, H. S.; DOUGLAS, G W. 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**, Waltham, v. 321, n. 17, p. 1174-1178, out. 1989.

GLUCKMAN, E; ROCHA, V; BOYER-CHAMMARD, A.; et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 337, n. 6, p. 373-381, ago. 1997.

GLUCKMAN, E; ROCHA, V.; ARCESE, W.; et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 32, n. 4, p. 397-407, abr. 2004.

GLUCKMAN, E; RUGGERI, A; VOLT, F. et al. Milestones in umbilical cord blood transplantation. **British Journal of Hematology**, Malden, v. 154, n. 4, p. 441-447, ago. 2011.

GRATWOHL, A.; BALDOMERO, H.; ALJURF, M. et al. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 303, n. 16, p. 1617-24, 28 abr. 2010.

GRATWOHL, A.; BALDOMERO, H.; GRATWOHL, M. et al. Quantitative and qualitative differences in use and trends of hematopoietic stem cell transplantation: a Global Observational Study. **Haematologica**, Pavia, v. 98, n. 8, p. 1282-90, ago. 2013.

HALLER, M. J.; VIENER, H.; WASSERFALL, C. et al. Autologous umbilical cord blood infusion for type 1 diabetes. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 36, n. 6, p. 710-715, jun. 2008.

HALLER, M. J.; WASSERFALL, C. H.; HULME, M. A. et al. Autologous Umbilical Cord Blood Infusion followed by Oral Docosahexaenoic Acid and Vitamin D Supplementation for C-Peptide Preservation in Children with Type 1 Diabetes. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Philadelphia, v. 19, n. 7, p. 1126-1129, jul.2013.

HANNUM, C.; CULPEPPER, J.; CAMPBELL, D. et al. Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. **Nature**, London, v. 368, n. 6472, p. 643-648, abril.1994.

HAYASHI, N.; TAKAHASHI, KENJI; ABE, Y.; KASHIWAKURA, I. Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34+ cells. **Life Sciences**, Philadelphia, v. 84, p. 598-605, abr. 2009.

HAYFLICK, L. Primeiras tentativas de controlar o envelhecimento. **Como e porque envelhecemos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1996. p. 253-263.

HECK, D. **Avaliação da associação células-tronco mesenquimais de placenta humana em biomateriais baseados em celulose bacteriana**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Desenvolvimento) – Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e em Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

HIETT, A.; BRITTON, K.; HAGUE, N. et al. Comparison of hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood collected from neonatal infants who are small and appropriate for gestational age. **Transfusion**, Malden, v. 35, p. 587-591, jul.1995.

HILLS, M.; LÜCKE, K.; CHAVEZ, E. A; EAVES, C. J.; LANSDORP, PETER M. Probing the mitotic history and developmental stage of hematopoietic cells using single telomere length analysis (STELA). **Blood**, Washington, v. 113, n. 23, p. 5765-75, jun. 2009.

HIRABAYASHI, Y.; HATTA, Y.; TAKEUCHI, J. et al. Novel three-dimensional long-term bone marrow culture system using polymer particles with grafted epoxy-polymer-chains supports the proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 236, n. 11, p. 1342-50, nov. 2011.

HIRANO, TOSHIO; NAKAJIMA, K.; HIBI, MASAHIKO. Signaling Mechanisms Through gp130: A Model of the Cytokine System Toshio Hirano,\* Koichi Nakajima and Masahiko Hibi. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Philadelphia, v. 9, n. 3-4, p. 241-252, dez.1998.

HOFMEISTER, C. C.; ZHANG, J.; KNIGHT, K. L.; LE, P.; STIFF, P. J. Ex vivo expansion of umbilical cord blood stem cells for transplantation : growing knowledge from the hematopoietic niche. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 39, n.1, p. 11-23, jan, 2007.

HOGGATT, J.; SINGH, P.; SAMPATH, J.; PELUS, L. M. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. **Blood**, Washington, v. 113, n. 22, p. 5444-55, maio. 2009.

HOMMES, D. W.; DUIJVESTIEN, M.; ZELINKOVA, Z. et al. Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation for severe refractory Crohn ' s disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, Philadelphia, v. 5, n. 6, p. 543-549, dez.2011.

HORWITZ, E. M.; PRATHER, W. R. Cytokines as the major mechanism of mesenchymal stem cell clinical activity: expanding the spectrum of cell therapy. **The Israel Medical Association journal**, Jabotinsky, v. 11, n. 4, p. 209-11, abr. 2009.

HWANG, J. H.; LEE, M. J.; SEOK, O. S. et al. Cytokine expression in placenta-derived mesenchymal stem cells in patients with pre-eclampsia and normal pregnancies. **Cytokine**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 95-101, jan. 2010.

HWANG, J. H.; SHIM, S. S.; SEOK, O. S. et al. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. **Journal of Korean Medical Science**, Seoul, v. 24, n. 4, p. 547-54, ago. 2009.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Taxa de fecundidade total, por grupos de anos de estudo das mulheres**. Rio de Janeiro: IBGE, 2005. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=1&vcodigo=CD108&t=taxa-fecundidade-total-grupos-anos-estudo>>. Acesso em: 19 de agosto de 2013.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Índice de envelhecimento da população residente**. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=CD88&t=indice-envelhecimento-populacao-residente>>. Acesso em: 19 de agosto de 2013.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Síntese de indicadores sociais - uma análise das condições de vida da população brasileira 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=1&vcodigo=CD108&t=taxa-fecundidade-total-grupos-anos-estudo>>. Acesso em: 19 de agosto de 2013.

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Atlas do Censo demográfico 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2013. 156 p. Disponível em: <[http://biblioteca.ibge.gov.br/d\\_detalhes.php?id=264529](http://biblioteca.ibge.gov.br/d_detalhes.php?id=264529)>. Acesso em: 19 de dezembro de 2013.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K; et al. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 543-553, jan. 2004.

INT ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C. et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, California, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, dez. 2004.

INCA-Instituto Nacional do Câncer. **Brasilcord**. Rio de Janeiro: INCA, 2013. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=2469](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2469)>. Acesso em: 19 de agosto de 2013.

INCA - Instituto Nacional do Cancer. **Estimativas 2012. Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=14>>. Acesso em: 19 de agosto de 2013.

INTEGRA. Integra LifeSciences Corporation. Integra - Dermal regeneration template. Plainsboro , 2012. 12 p.

JAN, R.H.; WEN, S.H.; SHYR, M.H.; et al. Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood. **Pediatric Transplantation**, Malden, v. 12, n. 8, p. 868-73, dez. 2008.

JARAMILLO-FERRADA, P.; WOLVETANG, E.; COOPER-WHITE, J. Differential mesengenic potential and expression of stem cell fate modulators in mesenchymal stromal cells from human term placenta and bone marrow. **Journal of Cellular Physiology**, Malden, v. 226, n.11, p. 3234-42, nov. 2012.

JEREMIAS, T. DA S. **Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas**. 2013. 118 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biologia Celular e Desenvolvimento) – Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

JONES, J.; STEVENS, C. E.; RUBINSTEIN, P.; et al. Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Philadelphia, v. 188, n. 2, p. 503-509, fev. 2003.

KANEMATSU, D.; SHOFUDA, T.; YAMAMOTO, A. et al. Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. **Differentiation**, Philadelphia, v. 82, n. 2, p. 77-88, set. 2011.

KANJI, S.; POMPILI, VINCENT J; DAS, HIRANMOY. Plasticity and maintenance of hematopoietic stem cells during development. **Recent Patents on Biotechnology**, Sharjah, v. 5, n. 1, p. 40-53, abr. 2011.

KASTRINAKI, M.; ANDREAKOU, I.; CHARBORD, P.; et al. Isolation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using Different Membrane Markers: Comparison of Colony/Cloning Efficiency, Differentiation Potential, and Molecular Profile. **Tissue Engineering: Part C**, Malden, v. 14, n. 4, p. 333-339, dez. 2008.

KELLY, S. S.; SOLA, C. B. S.; LIMA, M DE; et al. Ex vivo expansion of cord blood. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 44, n. 10, p. 673-681, nov.2009.

KENT, D. G.; DYKSTRA, B. J.; CHEYNE, J.; MA, E.; EAVES, C. J. Steel factor coordinately regulates the molecular signature and biologic function of hematopoietic stem cells. **Hematopoiesis and Stem Cells**, [S.l.], v. 112, n. 3, p. 560-567, ago. 2008.

KIM, H.-S.; LIM, J. B.; MIN, Y. H. et al. Ex Vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood CD34+ Cells in a Collagen Bead—Containing 3-Dimensional Culture System. **International Journal of Hematology**, Tokio, v. 78, n. 2, p.126-132, ago. 2003.

KIRITO, K.; FOX, N.; KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin stimulates Hoxb4 expression: an explanation for the favorable effects of TPO on hematopoietic stem cells. **Blood**, Washington, v. 102, n. 9, p. 3172-8, nov. 2003.

KISS, J. E.; RYBKA, W. B.; WINKELSTEIN, A. et al. Relationship of CD34+ cell dose to early and late hematopoiesis following autologous peripheral blood stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 19, n. 4, p. 303-10, fev. 1997.

KNUDTZON, S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. **Blood**, Washington, v. 43, n. 3, p. 357-61, mar. 1974.

KOLLET, O.; PETIT, I.; KAHN, J.; AL., ET. Human CD34(+)CXCR4(-) sorted cells harbor intracellular CXCR4, which can be functionally expressed and provide NOD/SCID repopulation. **Blood**, Washington, v. 100, n. 8, p. 2778-2786, out. 2002.

KOPF, M.; RAMSAY, A.; BROMBACHER, F. et al. Pleiotropic Defects of IL-6—deficient Mice Including Early Hematopoiesis, T and B Cell Function, and Acute Phase Responses. **Annals New York Academy of Sciences**, [S.l.], v. 762, p. 308-318, jul.1995.

KROY, D. C.; HEBING, L.; SANDER, L. E. et al. Differential role of gp130-dependent STAT and Rassignalling for haematopoiesis following bone-marrow transplantation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39728, jan. 2012.

KUDO, Y.; MINEGISHI, M.; SEKI, O. et al. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. **International Journal of Hematology**, Tokio, v. 93, n. 6, p. 645-651, jan/jun. 2011.

LANE, T. A; LAW, P.; MARUYAMA, M. et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. **Blood**, Washington, v. 85, n. 1, p. 275-82, jan. 1995.

LANZA, F.; HEALY, L.; SUTHERLAND, D. R. Structural and functional features of the CD34 antigen:an update. **Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents**, [S.l.], v. 15, n. 1, p.1-13, jan-mar.2001.

LAUGHLIN, M. J.; EAPEN, M.; RUBINSTEIN, PABLO; et al. Outcomes after Transplantation of Cord Blood or Bone Marrow from Unrelated Donors in Adults with Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 351, n. 22, p. 2265-2275, nov. 2004.

LEARY, A G.; ZENG, H. Q.; CLARK, S. C.; OGAWA, M. Growth factor requirements for survival in G0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 9, p. 4013-7, maio. 1992.



- LEE, J. M.; JUNG, J.; LEE, H.-J. et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. **International Immunopharmacology**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 219-24, jun. 2012.
- LEISTEN, I.; KRAMANN, R.; VENTURA FERREIRA, M. S. et al. 3D co-culture of hematopoietic stem and progenitor cells and mesenchymal stem cells in collagen scaffolds as a model of the hematopoietic niche. **Biomaterials**, Philadelphia, v. 33, p. 1736-1747, nov. 2011.
- LEVAC, K.; KARANU, F.; BHATIA, M. Identification of growth factor conditions that reduce ex vivo cord blood progenitor expansion but do not alter human repopulating cell function in vivo. **Haematologica**, Pavia, v. 90, p. 166-172, fev. 2005.
- LICHTMAN, M. A.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T. J.; et al. **Williams Manual of Hematology**. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2010. 756 p.
- LIMA, M DE; MCMANNIS, J.; GEE, A; et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 41, n. 9, p. 771-8, maio. 2008.
- LIMA, M. DE; MCNIECE, I.; ROBINSON, S.N; et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 367, n. 24, p. 2305-15, dez. 2012.
- LIU, B.; BUCKLEY, S. M.; LEWIS, I. D. et al. Homing defect of cultured human hematopoietic cells in the NOD/SCID mouse is mediated by Fas/CD95. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 31, n. 9, p. 824-32, set. 2003.
- LIU, M.; YANG, S. G.; SHI, L. et al. Mesenchymal stem cells from bone marrow show a stronger stimulating effect on megakaryocyte progenitor expansion than those from non-hematopoietic tissues. **Platelets**, Oklahoma, v. 21, n. 3, p. 199-210, jan. 2010.
- LYMPERI, S.; FERRARO, F.; SCADDEN, D. T. The HSC niche concept has turned 31. Has our knowledge matured? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1192, p. 12-8, mar. 2010.

- MACMILLAN, M. L.; WEISDORF, D.J; BRUNSTEIN, C.G; et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. **Blood**, Washington, v. 113, n. 11, p. 2410-5, mar. 2009.
- MAJHAIL, N. S.; MOTHUKURI, J. M.; BRUNSTEIN, C.G; et al. Costs of hematopoietic cell transplantation: comparison of umbilical cord blood and matched related donor transplantation and the impact of posttransplant complications. **Biology of blood and marrow transplantation**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 564-73, maio. 2009.
- MANE, V. P.; HEUER, M.A; HILLYER, P.; et al. Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis. **Journal of Biomolecular Techniques**, Georgia, v. 19, n. 5, p. 342-7, dez. 2008.
- MANFREDINI, R.; ZINI, R.; SALATI, S. et al. The Kinetic Status of Hematopoietic Stem Cell Subpopulations Underlies a Differential Expression of Genes Involved in Self-Renewal, Commitment, and Engraftment. **Stem Cells**, Califórnia, v. 23, n. 4, p. 496-506, abr. 2005.
- MARÓSTICA, L.L. **Análise dos efeitos do mesilato de imatinibe em cultura de células-tronco mesenquimais humanas**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-graduação em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
- MATESANZ, R. (org). International figures on organ, tissue & hematopoietics tem cell donation & transplantation activities. **Newsletter Transplant**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 1-75. 2011.
- MATSUNAGA, T.; KATO, T.; MIYAZAKI, H.; et al. Thrombopoietin promotes the survival of murine hematopoietic long-term reconstituting cells: comparison with the effects of FLT3/FLK-2 ligand and interleukin-6. **Blood**, Washington, v. 92, n. 2, p. 452-61, jul. 1998.
- MCNIECE, I. K.; STONEY, G. B.; KERN, B. P.; BRIDDELL, R. A. CD34+ Cell Selection from Frozen Cord Blood Products Using the Isolex 300i and CliniMACS CD34 Selection Devices. **Journal of Hemotherapy**, Nova York, v. 7, n. 5, p. 457-461, out. 1998.
- METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, Washington, v. 111, n. 2, p. 485-91, jan. 2008.

MIKI, T.; MARONGIU, F.; DORKO, K.; et al. Isolation of amniotic epithelial stem cells. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, Boston, suppl.1, Unit 1E.3,p. 11E3.1-11E3.10,jan. 2010.

MINGUELL, J. J.; HARDY, C.; TAVASSOLI, M. Membrane-associated chondroitin sulfate proteoglycan and fibronectin mediate the binding of hemopoietic progenitor cells to stromal cells. **Experimental Cell Research**, Philadelphia, v. 201, n. 1, p. 200-7, jul. 1992.

MONTESINOS, J. J.; FLORES-FIGUEROA, E; CASTILLO-MEDINA, S. et al. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 11, n. 2, p. 163-176, jan. 2009.

MURRAY, L. J.; YOUNG, J. C.; OSBORNE, L. J. et al. Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 27, n. 6, p. 1019-28, jun. 1999.

MUSINA, R. A; BEKCHANOVA, E. S.; SUKHIKH, G. T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 139, n. 4, p. 504-9, abr. 2005.

NARDI, N.B.; ALFONSO, Z. DA C. Células-tronco hematopoéticas. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. (orgs.). **Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: 2006. p. 49-65.

NCBP-National Cord Blood Program. **Comparison between bone marrow or beripheral blood stem cells and cord blood donated for transplantation**. New York: NCBP, 2010. Disponível em: <<http://www.nationalcordbloodprogram.org/qa/comparison.html>>. Acesso em: 10 mar. 2012.

NG, Y. Y.; KESSEL, B. V.; LOKHORST, H. M. et al. Gene-expression profiling of CD34  $\zeta$  cells from various hematopoietic stem-cell sources reveals functional differences in stem-cell activity. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 75, n. 2, p. 314-323, fev. 2004.

NHS- National Health Service. **Bonemarrow donation - How it is performed.** NHS, 2012. Disponível em: <<http://www.nhs.uk/Conditions/Bone-marrow-donation/Pages/How-is-it-performed.aspx>>. Acesso em: 13 set. 2013.

NIH-National Institutes of Health. **Stem cell information. Capítulo 5-Hematopoietic stem cell.** Bethesda: NIH, 2011. Disponível em: <<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter5.aspx>>. Acesso em: 13 set. 2013.

NMDP-National Marrow Donor Program. **Understanding Blood Stem Cell Sources.** NMDP, 2010. Disponível em: <[http://marrow.org/Patient/Support\\_and\\_Resources/Resource\\_Library/Learn\\_resources/Understanding\\_Blood\\_Stem\\_Cell\\_Sources.aspx](http://marrow.org/Patient/Support_and_Resources/Resource_Library/Learn_resources/Understanding_Blood_Stem_Cell_Sources.aspx)> Acesso em: 13 set. 2013

NORKIN, M.; LAZARUS, H M; WINGARD, J R. Umbilical cord blood graft enhancement strategies: has the time come to move these into the clinic? **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 48, n. 7, p. 884-889, set. 2013.

OGAWA, M.; MATSUZAKI, Y.; NISHIKAWA, S. et al. Expression and Function of c-kit in Hemopoietic Progenitor Cells. **Journal of Experimental Medicine.**, New York, v. 174, p. 63-71, jul.1991.

OHTANI, T.; ISHIHARA, K.; ATSUMI, T. et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. **Immunity**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 95-105, jan. 2000.

OJEDA-URIBE, M.; SOVALAT, H.; BOURDERONT, D. et al. Peripheral blood and BM CD34+ CD38- cells show better resistance to cryopreservation than CD34+ CD38+ cells in autologous stem cell transplantation. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 571-83, jan. 2004.

ORAN, B.; SHPALL, E. Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, Houston, v. 2012, p. 215-22, jan 2012.

OSTANIN, A. A.; PETROVSKII, Y. L.; SHEVELA, E. Y.;  
CHERNYKH, E. R. Multiplex Analysis of Cytokines, Chemokines,  
Growth Factors, MMP-9 and TIMP-1 Produced by Human Bone  
Marrow, Adipose Tissue, and Placental Mesenchymal Stromal Cells.  
**Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 151, n.  
1, p. 133-141, maio.2011.

OSWALD, J.; STEUDEL, C.; SALCHERT, K. et al. Gene-expression  
profiling of CD34+ hematopoietic cells expanded in a collagen I matrix.  
**StemCells**, Ohio, v. 24, n. 3, p. 494-500, mar. 2006.

PAFUMI, C.; FARINA, M.; MAGGI, I. et al. Influence of the kind of  
delivery on umbilical cord blood collection. **Haematologia**, [S.l.], v. 31,  
n. 4, p. 341-345. 2002.

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

PAROLINI, O.; ALVIANO, F.; BAGNARA, G. P. et al. Concise  
review: isolation and characterization of cells from human term  
placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta  
Derived Stem Cells. **Stem Cells**, California, v. 26, n. 2, p. 300-311, fev.  
2008.

PASQUINELLI, G.; TAZZARI, P.; RICCI, F. et al. Ultrastructural  
characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from  
bone marrow and term placenta. **Ultrastructural Pathology**, [S.l.], v.  
31, n. 1, p. 23-31. 2007.

PASQUINI, R. Fundamentos e biologia do transplante de células  
hematopoiéticas. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI,  
RICARDO (orgs.). **Hematologia. Fundamentos e Prática**. São Paulo,  
2005. p. 913-934.

PASQUINI, M. C.; WANG, Z. Current use and outcome of  
hematopoietic stem cell transplantation - CIBMTR Summary Slides,  
2012. Available at: <http://www.cibmtr.org>

PATEL, M.; DUNN, T. A.; TOSTANOSKI, S.; FISHER, J. P. Cyclic acetal hydroxyapatite composites and endogenous osteogenic gene expression of rat marrow stromal cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 4, n. 6, p. 422-436, 2010.

PELED, TONI; LANDAU, E.; MANDEL, J. et al. Linear polyamine copper chelator tetraethylenepentamine augments long-term ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 32, n. 6, p. 547-55, jun. 2004.

PELED, TONY; LANDAU, E.; PRUS, E. et al. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 116, n. 3, p. 655-61, mar. 2002.

PELED, TONY; SHOHAM, H.; ASCHENGRAU, D. et al. Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 40, n. 4, p. 342-55.e1, abr. 2012.

PELOSI, E.; CASTELLI, G.; TESTA, U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 20-8, jun. 2012.

PETERS, R.; WOLF, M. J.; BROEK, M.V; et al. Efficient generation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood in stroma-free liquid culture. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 12, p. e15689, jan. 2010.

PETROPOULOU, A. D.; ROCHA, V. Risk factors and options to improve engraftment in unrelated cord blood transplantation. **Stem Cells International**, [S.l.], v. 2011, p. 8, jan. 2011.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 29, n. 9, p. 2002-2007, maio. 2001.

POLONI, A; MAURIZI, G.; SERRANI, F. et al. Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. **Cell Proliferation**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 66-75, fev. 2012.

PRANKE, P.; FAILACE, R. R.; ALLEBRANDT, W. F. et al. Hematologic and immunophenotypic characterization of human umbilical cord blood. **ActaHaematologica**, Switzerland, v. 105, n. 2, p. 71-6, jan. 2001.

PRANKE, P.; HENDRIKX, J.; ALESPEITI, G. et al. Comparative quantification of umbilical cord blood CD34+ and CD34+ bright cells using the ProCount-BD and ISHAGE protocols. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 901-6, jul. 2006.

PRANKE, P.; HENDRIKX, J.; DEBNATH, G. et al. Immunophenotype of hematopoietic stem cells from placental/umbilical cord blood after culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S.l.], v. 38, n. 12, p. 1775-1789, 2005.

PRASAD, V. K.; KURTZBERG, J. Cord blood and bone marrow transplantation in inherited metabolic diseases : scientific basis, current status and future directions. **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 148, n. 3, p. 356-372, fev. 2009.

PRASAD, V. K.; MENDIZABAL, A.; PARIKH, S. H. et al. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. **Blood**, Washington, v. 112, n. 7, p. 2979-89, out. 2008.

QIU, F. H.; RAY, P.; BROWN, K. et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. **The EMBO journal**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 1003-11, abr. 1988.

QIU, L.; MEAGHER, R.; WELHAUSEN, S. et al. Ex vivo expansion of CD34+ umbilical cord blood cells in a defined serum-free medium (QBSF-60) with early effect cytokines. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, [S.l.], v. 8, n. 6, p. 609-18, dez. 1999.

QUEROL, S.; GOMEZ, S. G.; PAGLIUCA, A; TORRABADELLA, M.; MADRIGAL, J. A. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 45, n. 6, p. 970-8, jun. 2010.

QUEROL, S.; RUBINSTEIN, P.; MARSH, S. G. E.; et al. Cord blood banking: providing cord blood banking for a nation. **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 147, n. 2, p. 227-35, out. 2009.

RAMIREZ, P. A; WAGNER, J E; BRUNSTEIN, C G. Going straight to the point: intra-BM injection of hematopoietic progenitors. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 45, n. 7, p. 1127-33, jul. 2010.

RATAJCZAK, M. Z. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. **Current Opinion in Hematology**, [S.l.], v. 15, p. 293-300, mês. 2008.

REGO, E. M. Hematopoese. Regulação e Microambiente. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, RICARDO (orgs.). **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo, 2005. p. 15-22.

REILLY, G. C.; ENGLER, A. J. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. **Journal of Biomechanics**, [S.l.], v. 43, n. 1, p. 55-62, 5 jan. 2010.

REIS, S. L. S. D.; PENTEADO, C. E. M.; CHATKIN, M. N. et al. Parto normal X Parto cesáreo : análise epidemiológica em duas maternidades no sul do Brasil. Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul - **AMRIGS**, Porto Alegre, v. 53, n. 1, p. 7-10, jan/mar. 2009.

ROBIN, C.; BOLLEROT, K.; MENDES, S. et al. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. **Cell Stem Cell**, [S.l.], v. 5, n.4, p. 385-395, out. 2009.

ROBINSON, S N; SIMMONS, P J; YANG, H; et al. Mesenchymal stem cells in ex vivo cord blood expansion. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 83-92. 2011.



ROCHA, V.; LOCATELLI, F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. **Bone Marrow Transplantation**, London, v. 41, n. 2, p. 207-14, jan. 2008.

ROCHA, V. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. **Blood**, Washington, v. 97, n. 10, p. 2962-2971, maio. 2001.

RODRÍGUEZ-PARDO, V. M.; VERNOT, J. P. Mesenchymal stem cells promote a primitive phenotype CD34+c-kit+ in human cord blood-derived hematopoietic stem cells during ex vivo expansion. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 18, n. 1, p. 11-33, out. 2013.

ROELEN, D. L.; MAST, B. J. V.D.; ANKER, P. S. et al. Differential immunomodulatory effects of fetal versus maternal multipotent stromal cells. **Human Immunology**, Philadelphia, v. 70, n. 1, p. 16-23, jan. 2009.

ROFANI, C.; LUCHETTI, L.; TESTA, G. et al. IL-16 can synergize with early acting cytokines to expand ex vivo CD34+ isolated from cord blood. **Stem Cells and Development**, Nova York, v. 18, n. 4, p. 671-82, maio. 2009.

ROSNET, O.; BÜHRING, J.; MARCHETTO, S. et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. **Leukemia**, Paris, v. 10, n. 2, p. 238-248, fev.1996.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: KRAWETZ, S.; MISENER, S. (orgs.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**. Totowa, 2000. p. 365-386.

RUBINSTEIN, P. A.; ARRIER, A. C.; URTZBERG, A. S. S. J. K. et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 339, n. 22, p. 1565-1577, nov.1998.

RUS CIUCĂ, D.; SORIȚĂU, O.; SUȘMAN, S. et al. Isolation and characterization of chorionic mesenchymal stem cells from the placenta. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Craiova, v. 52, n. 3, p. 803-808, jan. 2011.

RUSTEN, L. S.; LYMAN, S. D.; VEIBY, O. P.; et al. E. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of the growth of primitive and committed human CD34+ bone marrow progenitor cells in vitro. **Blood**, Washington, v. 87, n. 4, p. 1317-25, fev. 1996.

SANTOS, S. V.; MARTI, L.; RIBEIRO, A. A. F.; CONTI, F.; BARROS, S. M. A cross-sectional study of umbilical cord blood donor profiles and their influence on umbilical cord blood collection in a Brazilian hospital. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 13, n. 9, p. 1120-, out. 2011.

SCARADAVOU, A.; BRUNSTEIN, C.G; EAPEN, M. et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. **Blood**, Washington, v. 121, n. 5, p. 752-8, jan. 2013.

SEMENOV, O. V.; KOESTENBAUER, S.; RIEGEL, M. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, [S.l.], v. 202, n. 2, p. 1-13, fev. 2010.

SERIKOV, V.; HOUNSHELL, C.; LARKIN, S. et al. Human term placenta as a source of hematopoietic cells. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 234, n. 7, p. 813-23, jul. 2009.

SILVA, C. L. DA; GONÇALVES, R.; PORADA, C. D. et al. Differences amid bone marrow and cord blood hematopoietic stem/progenitor cell division kinetics. **Journal of Cellular Physiology**, Malden, v. 220, n. 1, p. 102-11, jul. 2009.

SILVA MEIRELLES, L.; NARDI, N B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco**, Oxfordshire, v. 14, n. 7, p. 4281-4298, jan.2009.

SMAGUR, A; MITRUS, I.; GIEBEL, S. et al. Impact of different dimethyl sulphoxide concentrations on cell recovery, viability and clonogenic potential of cryopreserved peripheral blood hematopoietic stem and progenitor cells. **VoxSanguinis**, Malden, v.104, n.3, p.240-7, abr. 2013.

SOLANILLA, A; GROSSET, C.; LEMERCIER, C. et al. Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell. **Leukemia**, Paris, v. 14, n. 1, p. 153-62, jan. 2000.

SOLVES, P.; PERALES, A.; MIRABET, V. et al. Optimizing donor selection in a cord blood bank. **European Journal of Haematology**, Malden, v. 72, n. 2, p. 107-12, fev. 2004.

SOLVES, P.; PERALES, A.; MORAGA, R. et al. Maternal, neonatal and collection factors influencing the haematopoietic content of cord blood units. **ActaHaematologica**, Switzerland, v. 113, n. 4, p. 241-6, jan. 2005.

SONCINI, M.; VERTUA, E.; GIBELLI, L. et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine of Tissue Engineering**, Malden, v. 1, n.4, p. 296-305, jul./ago. 2007.

SONG, K.; SUN, Z.; LIU, H. et al. Primary research on unrelated double umbilical cord blood transplantation and implantation kinetics. **Hematology**, [S.l.], v. 18, n.5, p. 253-259, set.2013.

STEEN, R.; TJONNFJORD, G. E.; EGELAND, T. Comparison of the Phenotype and Clonogenicity of Normal CD34+ Cells from Umbilical Cord Blood, Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Peripheral Blood, and Adult Human Bone Marrow. **Journal of Hematotherapy**, Nova York, v. 3, n. 4, p. 253-262, winter.1994.

STEMCELL TECHNOLOGIES. **Human Colony-Forming Cell (CFC) Assays Using MethoCult: technical manual**. Vancouver, 2009. 48 p.

STEVENS, C. E.; GLADSTONE, J.; TAYLOR, P. E. et al. Placental/umbilical cord blood for unrelated-donor bone marrow reconstitution: relevance of nucleated red blood cells. **Blood**, Washington, v. 100, n. 7, p. 2662-4, out. 2002.

STORB, R. Edward Donnall Thomas (1920-2012) Immunologist who won Nobel prize for bone-marrow transplants. **Nature**, London, v. 491, n.7424, p. 334, nov. 2012.

SUTHERLAND, D. R.; STEWART, A. K.; KEATING, A. CD34 antigen: molecular features and potential clinical applications. **Stem Cells**, California, v. 11, Suppl 3, p. 50-57, out. 1993.

SUTHERLAND, R. D.; ANDERSON, L.; KEENEY, M.; et al. The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry. **Journal of Hematotherapy**, Nova York, v. 5, n.2, p. 213-226, jun.. 1996.

SZILVASSY, S. J.; BASS, M. J.; ZANT, G. VAN; et al. Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by Ex vivo expansion. **Blood**, Washington, v. 93, n. 5, p. 1557-66, mar. 1999.

TAN, J.; LIU, T.; HOU, L. et al. Maintenance and expansion of hematopoietic stem/progenitor cells in biomimetic osteoblast niche. **Cytotechnology**, London, v. 62, n. 5, p. 439-448, out. 2010.

TAVASSOLI, M.; HARDY, C. L. Molecular basis of homing of intravenously transplanted stem cells to the marrow. **Blood**, Washington, v. 76, n. 6, p. 1059-70, set. 1990.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 291-5, out. 1999.

THEUNISSEN, K.; VERFAILLIE, C. M. A multifactorial analysis of umbilical cord blood, adult bone marrow and mobilized peripheral blood progenitors using the improved ML-IC assay. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 165-72, fev. 2005.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L.; LU, W. C.; FERREBEE, J. W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 257, n. 11, p. 491-496, set. 1957.

TRAYCOFF, C. M.; ABOUD, M. R.; LAVER, J.; CLAPP, D. W.; SROUR, E. F. Rapid exit from G0/G1 phases of cell cycle in response to stem cell factor confers on umbilical cord blood CD34+ cells an enhanced ex vivo expansion potential. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 22, n. 13, p. 1264-1272, dec. 1994.

VAZIRI, H.; DRAGOWSKA, W.; ALLSOPP, R. C. et al. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 21, p. 9857-60, out. 1994.

WAGNER, J.E; BARKER, J.N; DEFOR, T. E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. **Blood**, Washington, v. 100, n. 5, p. 1611-8, set. 2002.

WAGNER, W.; RODERBURG, C.; WEIN, F. et al. Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. **Stem Cells**, California, v. 25, n. 10, p. 2638-47, out. 2007.

WALENDA, T.; BORK, S.; HORN, P.; WEIN, F.; SAFFRICH, R. Co-Culture with Mesenchymal Stromal Cells Increases Proliferation and Maintenance of Hematopoietic Progenitor Cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 14, n. 1-2, p. 337-350, jan. 2010.

WALKA, M. M.; SONNTAG, J.; KAGE, A.; et al. Complete Blood Counts from Umbilical Cords of Healthy Term Newborns by Two Automated Cytometers. **Acta Haematologica**, Switzerland, v. 100, n. 4, p. 167-173, fev. 1999.

WEEKX, S. F.; BOCKSTAELE, D. V.; PLUM, J. et al. CD34++CD38- and CD34+CD38+ human hematopoietic progenitors from fetal liver, cord blood, and adult bone marrow respond differently to hematopoietic cytokines depending on the ontogenic source. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 26, n. 8, p. 1034-1042, out.1998.

WEI, B.; YUAN, S.; GAO, YINGMAO; BING, L. Hematopoietic potential of mouse placenta with the application of placenta flushing. **Biological Research**, Thessaloniki, v. 41, n. 3, p. 261-70, jan. 2008.

WEN, S.H.; ZHAO, W.L.; LIN, P.Y.; et al. Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. **Transfusion and Apheresis Science**, Philadelphia, v. 46, n. 1, p. 39-45, fev. 2012.

WHO.- World Health Organization. IARC-International Agency for Research on Cancer –GLOBOCAN 2008. Geneva: WHO, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp#BOTH>>. Acesso em 19 de agosto de 2013.

WHO. World Health Organization. **Haematopoietic Stem Cell Transplantation**. Disponível em: <<http://www.who.int/transplantation/hsctx/en/>>. Acesso em: 15 maio. 2013a.

WHO. World Health Organization. **Stem cells are daily circulating around the World**. Disponível em: <[http://www.who.int/transplantation/stem\\_cells/en/index.html](http://www.who.int/transplantation/stem_cells/en/index.html)>. Acesso em: 15 maio. 2013b.

WU, J. Y.; LIAO, C.; XU, Z. P. et al. Banking and transplantation of umbilical cord blood in Guangzhou, China. **Cytotherapy**, Philadelphia, v. 8, n. 5, p. 488-97, jan. 2006.

WULFFRAAT, N. M.; BRINKMAN, D.; FERSTER, A. et al. Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation for refractory juvenile idiopathic arthritis. **Bone Marrow Transplantation**, London, suppl.1, n. 32, p. s61-s64, ago. 2003.

XU, R.; REEMS, J. A. Umbilical cord blood progeny cells that retain a CD34+ phenotype after ex vivo expansion have less engraftment potential than unexpanded CD34+ cells. **Transfusion**, Malden, v. 41, n. 2, p. 213-218, fev.2001.

YANG, H.; LOUTFY, M.R.; MAYERHOFER, S.; et al. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation. **Transfusion**, Malden, v. 51, n. 2, p. 284-92, fev. 2011.

YAO, C.L.; CHU, I.M.; HSIEH, T.B.; et al. A systematic strategy to optimize ex vivo expansion medium for human hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood mononuclear cells. **Experimental Hematology**, Philadelphia, v. 32, n. 8, p. 720-7, ago. 2004.

YI, H.; MORTON, C.; WEREMOWICZ, S.; MCBRIDE, O.; KELLY, K. Genomic organization and chromosomal localization of the DUSP2 gene, encoding a MAP kinase phosphatase, to human 2p11.2-q11. **Genomics**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 92-96, jul.1995.

YODOI, Y.; SASAHARA, M.; KAMEDA, T.; et al. Circulating Hematopoietic Stem Cells in Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration AND. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Washington, v. 48, n. 12, p. 5464-5472, dez. 2007.

YUAN, W.; ZONG, C.; HUANG, Y. et al. Biological, immunological and regenerative characteristics of placenta-derived mesenchymal stem cell isolated using a time-gradient attachment method. **Stem Cell Research**, Philadelphia, v. 9, n. 2, p. 110-23, set. 2012.

YUAN, Y.; SIN, W.-Y.; XUE, B. et al. Novel alginate three-dimensional static and rotating culture systems for effective ex vivo amplification of human cord blood hematopoietic stem cells and in vivo functional analysis of amplified cells in NOD/SCID mice. **Transfusion**, Malden, v. 53, n. 9, p. 2001-2011, fev. 2013.

ZHANG, Y.; CHAI, C.; JIANG, X.-S.; et al. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering**, London, v. 12, n. 8, p. 2161-70, ago. 2006.






# APÊNDICES

## APÊNDICE A

Certificado Page 1 of 1



**CONSELHO FEDERAL DE EDUCAÇÃO**  
 Fundação de Amparo à Pesquisa  
 Conselho de Educação do Estado de São Paulo

**CERTIFICADO** Nº 1962


O Conselho de Educação do Estado de São Paulo (CEESP) do Poder Público de Pesquisa e Ensino de Universidade [Estado de São Paulo, instituído pela LEI Nº 10.648 DE 09 DE 01 DE ABRIL DE 1956, com suas alterações para a reestruturação e funcionamento do CEESP, instituído e anexo ao Regulamento Interno do CEESP, CEREDE/CE, que se previu em seu art. 1º, inciso III, bem como as regras de funcionamento, desde que respeitadas as normas de funcionamento estabelecidas pelo Conselho Nacional de Educação - CNE/CES

**APROVADO**

PROCESSO: 1962      FE: 42740

TÍTULO: *Atividade de pesquisa e desenvolvimento de atividades complementares de planejamento em educação de crianças*

AUTOR: *Marcos Antonio de Sá, Maria Helena de Sá e Paulo Sá*

  
 Elioriano Pires de Souza  
 Presidente do CEESP/CE

Elioriano Pires de Souza, 01 de Outubro de 2011

[http://sistema.cep.ufsc.br/certificado/certificado.php?id\\_pesquisa=1962](http://sistema.cep.ufsc.br/certificado/certificado.php?id_pesquisa=1962) 10/10/2011

## APÊNDICE B



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão  
Departamento de Projetos e Extensão  
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPESH

Campus Prof. João David Ferreira Lima - CEP 88040-900  
Trindade - Florianópolis - Santa Catarina - Brasil | [cepesh@ufsc.br](mailto:cepesh@ufsc.br) / +55 (48) 3721-9206

#### PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 318/2008

##### I - Identificação

Título do Projeto: Avaliação de recursos terapêuticos em doenças crônicas prevalentes: Acidente Vascular Cerebral

Pesquisador Responsável: Marcio Alvarez da Silva

Instituição onde se realizará: Este Projeto será desenvolvido em vários Departamentos da UFSC, envolvendo Laboratórios de Pesquisa, o Hospital Universitário, além da participação do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HFMO/SC) e do Governo do Estado de Santa Catarina, assim como no Hospital Universitário Emanoel Polydoro São Thiago. O ponto base será o Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética

##### II - Objetivos:

###### Geral:

O presente projeto pretende obter e amplificar *ex vivo* CTMs humanas de cordão placentar de neonatos a termo, assim como obter, caracterizar e re-programar as CTMs obtidas. Este ponto é importante para compor a metodologia de utilização de enxerto de CTMs obtidas da placenta, no tratamento para AVC com a terapêutica de reabilitação hospitalar pós AVC através de fisioterapia específica.

###### Específicos:

1. Testar a eficácia do enxerto, através da comparação de diferentes vias de administração, em recipientes camundongos submetidos a lesão isquêmica cerebral, através da administração do enxerto, por via intravenosa, intratecal ou no sítio de lesão por estereotaxia. Esse ponto é importante pois para a difusão no SUE, entendemos que quanto mais simples a via de administração do enxerto, mais fácil será sua incorporação na rotina terapêutica.
2. Estudar as melhores condições para a amplificação de CTMs *in vitro*, para geração de uma matriz de larga utilização.
3. Avaliar a expressão de fatores de transcrição importantes em quanto o estado indiferenciado das CTMs, nos experimentos *in vitro* do item anterior, sendo alguns deles descritos com expressos em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana: Oct3/4, Rex1, Nanog, FoxD2, Sox2

III- Sumário do Projeto: Para a obtenção das células-tronco mesenquimais (CTMs) serão coletadas a placenta de recém-natos a termo em associação com HU/UFSC. As células serão obtidas por dissociação mecânica do tecido na presença de 0,2% de colagenase (Sigma). Células serão purificadas a partir de frção contendo células mononucleares preparadas centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque (densidade 1077, Amersham Biosciences). As células serão lavadas e plaquetadas em IMDM suplementado com 10% FBS. As células assim preparadas serão utilizadas em camundongos C57/BL6 adultos serão anestesiados e submetidos a isquemia cerebral, por electrocauterização de um ramo distal da artéria cerebral média. Todos os animais recebem antibiótico cefazolin (Lilly) na dose de 1mg/dia por 48 horas após a lesão. No 21º dia os animais serão submetidos à sutura com triopental sódico (Cristalia) na dose de 100mg/kg (i.p.).

seguida de perfusão intracardíaca com solução fisiológica até a completa exsanguinação. Para visualizar a área de lesão deste modelo, fatias fincas de 2 mm de espessura do endotélio serão obtidas para a reação histoquímica com solução de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 0,5% em Tampão Fosfato 0,1M, a 37°C, durante 20 min. Testaremos aos camundongos os seguintes parâmetros:

- 1- Quantidade de CTMs humanas injetadas: variando de 500 a 3000 CTMs por animal, divididas para tal em diversos grupos experimentais, divididos entre controle placebo e enxerto;
- 2- Via de inoculação: testaremos o enxerto administrado em grupos separados para injeção intravenosa, intramuscular, intratecal e por estereotaxia no sítio da lesão, os animais serão divididos para tal em diversos grupos experimentais, divididos entre controle placebo e enxerto;

**IV- Comentários:** O presente estudo está bem escrito, bem delimitado e tem relevância acadêmica. O pesquisador responsável tem o currículo adequado e a documentação exigida pela legislação pertinente foi atendida. No entanto, informações relevantes para a apreciação deste CEP não são explicitadas no corpo do projeto de pesquisa, mas no "Resumo do Projeto...". Assim, nos interessamos de que serão três amostras a cada 2 semanas, durante dois anos. Não está referido como vai ser obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) nem por quem. Além disso, o TCLE elaborado está criado de terminologia técnica, informando mas não esclarecendo. Outro ponto que necessita de esclarecimento é qual o papel dos pesquisadores cujo currículo é acrescentado, mas não mencionado no projeto.

**V- Parecer:** Pelo exposto, somos de parecer que o presente estudo fique em pendência até que sejam esclarecidos os pontos mencionados nos "Comentários".

**Com pendências ( x )**

**VI - Parecer final:** tendo em vista o andamento das pendências, somos de parecer que o presente projeto, assim como o TCLE, seja aprovados por este Comitê.

Florianópolis, 03 de novembro de 2008

Aprovado "ad referendum" (X)

Florianópolis, 19 de novembro de 2008

  
Wellington Furtado de Souza  
Coordenador

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

