



**FERNANDA GONÇALVES PEREIRA CUNHA**

**ESTUDO DOS SUBTIPOS CELULARES DO SANGUE DE  
CORDÃO UMBILICAL E SUA VIABILIDADE ANTES DO  
PROCESSAMENTO E APÓS O DESCONGELAMENTO:  
ARMAZENAMENTO À TEMPERATURA AMBIENTE POR  
96 HORAS**

***STUDY OF UMBILICAL CORD BLOOD CELL SUBTYPES  
AND ITS VIABILITY PRE-FREEZING AND POST-THAW:  
STORED PRE-FREEZING AT ROOM TEMPERATURE FOR 96  
HOURS***

**CAMPINAS**

**2014**





---

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**FERNANDA GONÇALVES PEREIRA CUNHA**

**ESTUDO DOS SUBTIPOS CELULARES DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL  
E SUA VIABILIDADE ANTES DO PROCESSAMENTO E APÓS O  
DESCONGELAMENTO:  
ARMAZENAMENTO À TEMPERATURA AMBIENTE POR 96 HORAS**

***STUDY OF UMBILICAL CORD BLOOD CELL SUBTYPES AND ITS VIABILITY  
PRE-FREEZING AND POST-THAW: STORED PRE-FREEZING AT ROOM  
TEMPERATURE FOR 96 HOURS***

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Clínica  
Médica, área de Concentração Clínica Médica.

Orientação: Profa. Dra. Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze  
Co-orientação: Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

*PhD thesis submitted to the Postgraduate Course of Internal Medicine, School of Medical  
Sciences, University of Campinas to obtain the title of PhD in Internal Medicine,  
concentration area of clinical sciences.*

Este exemplar corresponde à versão final  
da tese defendida por Fernanda Gonçalves  
Pereira Cunha, e orientada pela Profa. Dra.  
Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze

**CAMPINAS**  
**2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P414e Pereira-Cunha, Fernanda Gonçalves, 1968-  
Estudo dos subtipos celulares do sangue de cordão umbilical e sua viabilidade antes do processamento e após o descongelamento: armazenamento à temperatura ambiente por 96 horas / Fernanda Gonçalves Pereira Cunha. – Campinas, SP: [s.n.], 2014.

Orientador: Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze.

Coorientador: Ângela Cristina Malheiros Luzo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Sangue fetal. 2. Sobrevivência celular. 3. Criopreservação. 4. Transplante. 5. Medicina regenerativa. I. Lorand-Metze, Irene, 1945-. II. Luzo, Ângela Cristina Malheiros. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of umbilical cord blood cell subtypes and its viability pre-freezing and post-thaw: stored pre-freezing at room temperature for 96 hours

**Palavras-chave em inglês:**

Fetal blood Cell

survival

Cryopreservation

Transplantation

Regenerative

medicine

**Área de concentração:** Clínica Médica

**Titulação:** Doutora em Clínica Médica

**Banca examinadora:**

Irene Gyongyver Heidemarie Lorand Metze [Orientador]

Alfredo Mendrone Junior

Fábio Rodrigues Kerbauy

Carmino Antonio de Souza

Cristina Pontes Vicente

**Data de defesa:** 20-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Médica

---

## BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

FERNANDA GONÇALVES PEREIRA CUNHA

---

ORIENTADORA: PROF. DR. IRENE GYONGYVER HEIDEMARIE LORAND METZE  
COORIENTADORA: ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

---

### MEMBROS:

---

1. PROF. DR. IRENE GYONGYVER HEIDEMARIE LORAND METZE 

2. PROF. DR. ALFREDO MENDRONE JUNIOR 

3. PROF. DR. FÁBIO RODRIGUES KERBAUY 

4. PROF. DR. CARMINO ANTONIO DE SOUZA 

5. PROF. DR. CRISTINA PONTES VICENTE 

---

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 20 de fevereiro de 2014

---



Dedico este trabalho as mães e pais solidários  
que doam o cordão umbilical de seus bebês com  
a intenção de ajudar a salvar vidas!





## **Agradecimentos**

A Deus, pelo presente da vida, pela permissão de poder dar um passo à frente na minha carreira profissional e aprender mais a cada momento, pelo amor e proteção a mim concedidos que me trouxeram coragem, persistência e paciência para que chegasse até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Irene Lorand-Metze, pela oportunidade e confiança, pelo exemplo de profissional, pela competência e dedicação a medicina e a ciência.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo, mentora desse projeto, pela dedicação, cuidado e paciência, por acreditar nessa parceria e pela relação que contruímos ao longo desse período.

À Adriana, que participou e colaborou diretamente com esse trabalho, doando seu tempo e conhecimento em cultura de células, fornecendo os dados de CFU.

À Suiellen, amiga e companheira de doutorado, pelas ajudas incontáveis, dicas, sugestões, conselhos e muito mais! Por oferecer e ceder o Laboratório de Criopreservação para que as alíquotas fossem devidamente congeladas e armazenadas até a segunda etapa do projeto, o descongelamento.

Ao Felipe, pela dedicação, troca de idéias, paciência, pelos congelamentos das alíquotas, por toda a ajuda concedida neste projeto.

À Rosângela, meu braço direito e esquerdo dentro do laboratório. Por toda a dedicação e empenho dispensados para que eu pudesse me dedicar muitas vezes ao doutorado deixando grande parte da rotina sobre sua responsabilidade. Pelo incentivo e paciência em vários momentos difíceis. Pelo companheirismo e certeza de poder contar com você.

À Andréa e Alexandra, tão dedicadas ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical da Unicamp, separando as bolsas não contempladas para serem armazenadas no Banco e disponibilizando-as para realização de várias pesquisas.

Ao Prof. Konradin pela revisão estatística do segundo artigo.

À Sandrinha, que tanto nos ajudou na confecção dos posters enviados aos congressos, formatação e envio dos artigos, tese, etc. pela amizade, sempre com um sorriso no rosto e um jeitinho carinhoso de tudo fazer.

Às estagiárias Lílian e Raquel, pela amizade, dedicação e incentivo. Certa de ter conseguido ensinar algo a vocês, mesmo diante de nossa atribulada rotina, desejo muito sucesso em suas carreiras.

À Raquel que fez a revisão do Inglês dos posters apresentados e dos artigos publicados.

À equipe do Laboratório de Rotinas Hematológicas que sempre mantém as portas abertas para nossas contagens de hemograma, pela amizade e boas risadas.

Aos responsáveis pelas mães doadoras que participaram deste trabalho, à equipe de coleta do sangue de cordão umbilical e a toda equipe do Banco de Sangue de Cordão Umbilical da Unicamp, por acreditarem nessa alternativa terapêutica.

À Taís Mazzola, pela amizade, carinho e dicas da tese!

À Nicete, secretária da Coordenadoria do Hemocentro, sempre prestativa, disposta a ajudar.

Ao Bruno, secretário da Pós Graduação da FCM, sempre prestativo, instruindo, auxiliando e ajudando os alunos nas questões burocráticas da tese.

Ao Instituto Nacional o Sangue (INCTS) por fornecer auxílio para a realização desse projeto. À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente e servidor.

À amiga e Dra. Eliane Borges de Almeida pela amizade, carinho e pela avaliação deste trabalho realizada na minha Qualificação.

Ao Dr. Afonso Celso Vigorito pela avaliação e sugestões dadas na minha Qualificação.

A todos meus amigos do Hemocentro, amigas e amigos de longa data, que sempre me incentivaram e torceram por mim. Pessoas que vieram e depois tomaram outro rumo, mas que permanecem perto, mesmo que fisicamente distantes. Pessoas que convivemos diariamente ou não, mas que estão sempre em nossos pensamentos e corações. Obrigada pelo carinho e amizade.

Aos meus amigos de fé que tanto oraram, incentivaram e me deram força para chegar até aqui, toda minha gratidão!

A toda minha família de perto e de longe, de sangue e agregados, pelo amor, carinho e amizade a mim concedidos por toda minha vida.

Às minhas cunhadas e cunhados, irmãos de coração, obrigada pelo apoio, carinho e atenção.

À minha sogra, Maria José, por confiar seu filho a mim, pelas orações e incentivo.

Aos meus sobrinhos e afilhados Marcela, Rafaela, Heitor, Ulisses, Caio, Lucca, Ester, Augusto e Sofia pelos momentos de amor e alegria que passamos juntos. Prometo estar mais perto a partir de agora! Vocês são meus filhos de coração!

À minha irmã Claudia e ao meu irmão Flávio André, pelo amor, preocupação, torcida e paciência com meu tempo cada vez mais curto para dedicar à família. Pela nossa história construída juntos, com erros e acertos, mas sempre com muito amor.

Aos meus pais, Ednaldo (*in memoriam*) e minha mãe Zeilah, pelo amor, exemplo, cuidado, preocupação, dedicação, incentivo. Sem vocês eu não existiria, sem vocês eu nada seria. Minha eterna gratidão.

Ao meu esposo, Carlos Alberto, meu companheiro para vida inteira, que sempre me apóia e me incentiva. Obrigada pelo seu amor, sua paciência em tempos que a tese passa a ser prioridade. Obrigada pela sua compreensão e força. Obrigada por existir na minha vida.

“Eu não ensino e não mando.

Ensinando sai cópia.

Mandando sai escravo.

Eu transmito meu espírito.”

Mestre Sato





# RESUMO





## Resumo

O sangue de cordão umbilical (SCU) é uma fonte de células-tronco para terapia celular e transplante de medula óssea. Devido a grande extensão territorial do Brasil, muitas vezes acontecem problemas logísticos na coleta de unidades de SCU (USCU).

Nosso objetivo foi estudar a mudança de proporções e a viabilidade dos diversos subtipos celulares do SCU, especialmente das células-tronco CD34<sup>+</sup> até 96 horas após a coleta de amostras mantidas à temperatura ambiente (T.A.). Avaliamos ainda a modificação destes dados após o descongelamento das amostras. Cada subtipo celular foi identificado fenotipicamente usando citometria de fluxo. A viabilidade celular foi estudada utilizando o corante 7-aminoactinomicina (7-AAD). A funcionalidade das células-tronco CD34<sup>+</sup> foi examinada através de ensaios clonogênicos.

Num primeiro estudo foram analisadas trinta e seis USCU em 24, 48 e 96 horas após a coleta. As células-tronco CD34<sup>+</sup> e os linfócitos T maduros aumentaram a porcentagem durante o período de estocagem. Os linfócitos B maduros e as células mesenquimais diminuíram, mantendo a viabilidade. Os granulócitos diminuíram a porcentagem com perda da viabilidade. Os monócitos e precursores B mantiveram-se estáveis. Os ensaios clonogênicos demonstraram diminuição no número de unidades formadoras de colônias (CFU) nas USCU estocadas até 96 horas (média 194/ 24 horas e 168/ 96 horas), mas todas as USCU apresentaram bom número de colônias.

No segundo estudo foram analisadas vinte USCU em 24 e 96 horas após a coleta. Essas amostras foram congeladas e descongeladas após seis meses para serem reavaliadas.

Os resultados das amostras pré-congelamento foram semelhantes aos encontrados no primeiro estudo. Os resultados pós-descongelamento demonstraram que as células CD34<sup>+</sup> diminuíram, mas não significativamente, quando comparamos amostras estocadas 24 e 96 horas antes de processar. As células-tronco mesenquimais, precursores B, linfócitos B maduros e monócitos não apresentaram alterações estatisticamente significantes. Os linfócitos T e granulócitos diminuíram. Houve crescimento de *CFU* em todas as amostras, embora o número de colônias tenha sido menor nas amostras estocadas 96 horas pré-congelamento quando comparadas às processadas após 24 horas (mediana 68 x 57; p <0.0001). No entanto, a maior diminuição foi observada pós-descongelamento (mediana 36 x 27 respectivamente). A diminuição do número de *CFU* estocadas 96 horas apresentou correlação com a porcentagem de células CD34<sup>+</sup> inviáveis antes do congelamento.

As células-tronco CD34<sup>+</sup> e mesenquimais apresentaram boa viabilidade até 96 horas à T.A., mesmo pós-descongelamento. O processo de descongelamento diminuiu a porcentagem, mas não a viabilidade dessas células. O crescimento de *CFU* durante todo o período analisado comprovou a funcionalidade das células CD34<sup>+</sup>.

A manutenção da viabilidade e funcionalidade das células-tronco do SCU estocados até 96 horas após a coleta à T.A., provendo número considerável de *CFU* mesmo após o descongelamento poderá possibilitar a coleta de USCU de lugares mais distantes dos Bancos Públicos de SCU (BSCUP). Portanto, elas poderiam ser manipuladas até 4 dias após a coleta quando necessário. Isto aumentaria consideravelmente o recrutamento de bolsas de SCU nos BSCUP, mantendo a segurança da fonte de células-tronco para uso na medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** sangue de cordão umbilical, células mononucleares, CD34<sup>+</sup>, viabilidade celular, 7-AAD, criopreservação, transplante, banco de sangue de cordão umbilical, medicina regenerativa.





# ABSTRACT



## **Abstract**

Umbilical cord blood (UCB) is a good source of stem cells for cell therapy and has been successfully used for bone marrow transplantation.

In 2004, the Brazilian Public Network of Cord Blood Banks was established. However, because our country is large, logistic problems could hamper the collection of numerous samples. Our aim was to evaluate the variation in proportion and viability of several UCB cell subsets, especially CD34<sup>+</sup> stem-cells and their viability until 96 hours after collection of samples stored at room temperature. We also evaluated all cell subtypes and their viability and functionality kept frozen for 6 months and then thawed. Each cell subtype was identified by immunophenotyping and the viability was studied by 7-AAD incorporation and CD34<sup>+</sup>. Stem-cell functionality was studied by clonogenic assay.

In the first study we analysed thirty-six UCB units at 24, 48 and 96 hrs after collection and we demonstrated that CD34<sup>+</sup> stem cells and mature T lymphocytes increased during this period. Mature B lymphocytes and mesenchymal stem cells (MSCs) decreased, maintaining viability. Granulocytes decreased with loss of viability. Monocytes and B-cell precursors remained stable. Clonogenic assays showed a decrease in colony-forming unit (CFU) number in UCB units stored for 96 hours. But even so, an acceptable number CFU was maintained.

In the second study we analysed twenty UCB units at 24 and 96 hrs after collection, frozen for 6 months and thawed for reevaluation. Pre freezing (PF) results were similar to those found in the first study. Post-thaw (PT) results showed that the number of CD34<sup>+</sup>

cells tended to decrease if kept 96 hrs at room temperature before processing. Post-thaw there was no significant decrease of MSCs, B-cell precursors, mature B cells and monocytes. T lymphocytes and granulocytes showed a significant decrease. CFU growth was observed in all samples. Delay of 96 hrs PF was associated with a decrease in CFU number (median 68 x 57; p <0.0001). Moreover, a larger decrease was observed in PT samples (median 36 x 27 respectively). CFU loss at 96 hrs PF showed a correlation with the proportion of non-viable CD34<sup>+</sup> before processing.

CD34<sup>+</sup> and MSCs stem-cells remained viable until 96 hrs after collection at room temperature even after freezing and thawing. CFU growth during all period analyzed was observed, so confirming functionality of CD34<sup>+</sup> cells.

The maintenance of viability and functionality of UCB stem cells stored until 96 hrs after collection at room temperature, providing a good number of colonies even after freezing and thawing could possibly allow the collection of UCUBUs from places far away from UCB Banks, which would be of great value for increasing the number of Units in Umbilical Cord Blood Banks.

**Key words:** umbilical cord blood, mononuclear cells subsets, CD34<sup>+</sup>, cell viability, 7-AAD, cryopreservation, transplantation, umbilical cord blood bank, regenerative medicine.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	35
<b>CAPÍTULOS</b> .....	39
Capítulo I.....	41
Artigo publicado em: Transfusion 2013; 9:2034-42.....	41
Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection.....	41
Abstract .....	42
Introduction .....	43
Materials and Methods .....	45
Results .....	49
Discussion .....	50
References .....	55
Capítulo II.....	67
Artigo submetido a: Vox sanguinis em 7 de março de 2014 .....	67
CD34+ stem cells and other mononuclear cell subtypes from umbilical cord blood manipulated up to 96 hours collection stored at room emperature: pre-freezing and post-thaw viability and functionality analyses .....	67
Abstract .....	68
Introduction .....	69
Materials and Methods .....	71
Results .....	75
Discussion .....	77
References .....	81
<b>DISCUSSÃO</b> .....	95
<b>CONCLUSÕES</b> .....	103
<b>REFERÊNCIAS GERAIS</b> .....	107
<b>ANEXOS</b> .....	115





# INTRODUÇÃO



Células-tronco são células pluripotentes que possuem capacidade de auto-renovação, sendo capazes de se multiplicarem mantendo seu estado indiferenciado. Elas também possuem capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares, podendo regenerar a hematopoiese, o tecido linfóide bem como outros tecidos.

As células-tronco embrionárias são totipotentes podendo se diferenciar em todas as linhagens celulares, assim como em gametas e anexos, quando utilizadas antes da fase de mórula e blastocisto. A partir de então são pluripotentes, e não originam gametas ou anexos. Nos últimos anos, os estudos sobre a terapia celular vêm demonstrando a possibilidade de regeneração de tecidos e órgãos, sendo possível visualizar a evolução de uma medicina translacional onde passaremos do estágio pré-clínico ou de experimentos com animais para os ensaios clínicos terapêuticos.

Há cerca de 73 anos, os estudos com medula óssea (MO) veem demonstrando a sua importância como fonte de obtenção de células-tronco de linhagem hematopoiética (CD34<sup>+</sup>), que estão presentes em 1% a 4% das células da MO e são responsáveis pela reconstituição do tecido hematopoiético e linfóide. Imunofenotipicamente, essas células são identificadas através da expressão dos antígenos CD34, CD133 e da fraca expressão de CD45. A medula também é a sede de vários outros tipos de células-tronco, como: as células-tronco somáticas irrestritas; células-tronco pequenas semelhantes às embrionárias; células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais. Friedenstein e colaboradores <sup>1</sup>, em 1968 identificaram as células estromais precursoras, descreveram o isolamento de células clonogênicas provenientes da medula óssea, aderentes ao substrato em culturas de monocamadas, que definiram como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (*CFU-Fs*), provendo um microambiente que suporta a hematopoiese.

Posteriormente, essas células foram denominadas de células-tronco mesenquimais devido à sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação para outras linhagens além da mesodérmica, como osteócitos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos entre outras. Essas células constituem 0,01% a 0,0001% das células nucleadas da MO fresca. Fenotipicamente, elas se caracterizam pela ausência de expressão de CD34 e CD45 e pela expressão de CD73, CD90 e CD105 <sup>2</sup>. Apresentam capacidade imunomoduladora e regenerativa, podendo ser usadas em terapia celular de doenças autoimunes e inflamatórias <sup>3,4</sup>.

Por muitos anos, a MO foi o tecido mais estudado como fonte de células-tronco hematopoiéticas para reconstituição medular de pacientes com doenças hematológicas. Recentemente, os produtos de leucoaférese e o sangue de cordão umbilical (SCU) passaram também a serem utilizados.

Em 1989 foi relatada a primeira reconstituição da MO após transplante de SCU com antígeno leucocitário humano idêntico (HLA-idêntico) em uma criança com anemia de Fanconi, realizado pelo grupo francês <sup>5</sup>. Assim deu-se início a uma série de transplantes com doadores relacionados HLA-idêntico ou não. Em 1992 tiveram início os transplantes com doadores não-relacionados e dentro de um ano foram realizados os dois primeiros transplantes de SCU não-relacionados em crianças com leucemia aguda <sup>6</sup>. O número de transplantes de SCU foi aumentando consideravelmente a cada ano.

As maiores vantagens em se utilizar SCU para transplante são: ser facilmente obtido; apresentar baixa prevalência de doenças infecto-contagiosas; poder ser transplantado sem total compatibilidade aos antígenos HLA, assim como serem infundidas duas bolsas de SCU de doadores diferentes compatíveis com o doador mas não

necessariamente entre si; apresentar imaturidade linfocitária e presença de células Natural Killer (NK), proporcionando baixa incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro e a reação enxerto versus leucemia <sup>7</sup>.

Apesar de o SCU poder ser usado para transplante sem total compatibilidade HLA, o que é uma vantagem, estudos têm mostrado que a sobrevida livre de doença é maior nos pacientes com HLA compatível <sup>8,9</sup>. Embora possam ser infundidas duas bolsas de SCU de doadores diferentes em um mesmo paciente, estudos recentes têm mostrado que o transplante de uma bolsa é apropriado para a maioria das crianças e o transplante em adultos requer mais estudos <sup>8,10,11</sup>.

Células de SCU, como linfócitos, células NK e células-tronco mesenquimais podem ser isoladas e cultivadas para uso em terapia celular ou imunoterapia. Além disso, as células imaturas do SCU têm sido usadas para a geração de células-tronco pluripotentes (iPSCs), que futuramente poderá permitir a expansão do número de células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras e essas, gerarem outras células para uso na medicina regenerativa <sup>11-16</sup>. Estudo recente mostrou que mesmo as células-tronco mesenquimais congeladas apresentam a mesma capacidade de diferenciação após o descongelamento <sup>17</sup>.

O New York Umbilical Cord Blood Bank foi fundado em 1993, desde então, vários outros Bancos Públicos foram desenvolvidos. A Rede Pública Brasileira de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) foi criada em 2004 (portaria 2381/GM). Hoje, após 25 anos do primeiro transplante de SCU, mundialmente, mais de 600.000 unidades de SCU estão armazenadas e mais de 30.000 transplantes já foram

realizados <sup>12</sup>, mostrando que atualmente, o SCU tem sido uma fonte segura e importante de obtenção de células-tronco hematopoiéticas para transplante e terapia celular.

Com a instalação de vários Bancos de SCU, fez-se necessário o desenvolvimento de normas de controle de qualidade, como as descritas pela Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB), pela Fundação para Acreditação em Terapia Celular (FACT) e Netcord <sup>18,19</sup> e pelo Comitê de Acreditação Joint ISCT & EBMT (JACIE) <sup>20,21</sup>.

Todo o processo de coleta, manipulação e congelamento devem estar de acordo com as normas estabelecidas, incluindo cuidados antes do congelamento, como: a contagem total de células nucleadas (*TCNs*); a quantificação de células-tronco CD34<sup>+</sup>; ensaios clonogênicos para quantificação das unidades formadoras de colônias (*CFU*), incluindo progenitores da linhagem mielomonocítica (*CFU-GM*), progenitores da linhagem eritróide (*BFU-E / CFU-E*) e progenitores de todas as séries granulocítica/ eritróide/ monocítica/ megacariocítica (*CFU-GEMM*); avaliação da viabilidade celular; tipagem HLA, tipagem sanguínea ABO, testes sorológicos, incluindo HIV1-2, HTLV-I e II, sífilis, hepatites B e C, Toxoplasmose, Citomegalovirose e Doença de Chagas. Após o descongelamento, outros são necessários como: integridade da bolsa, testes microbiológicos e culturas para fungos: contagem e viabilidade de células CD34<sup>+</sup> e ensaios clonogênicos garantindo assim, bons resultados no transplante de SCU.

O processamento e criopreservação do cordão umbilical têm sido melhorados durante as duas últimas décadas, introduzindo o uso da redução de volume através da depleção das células vermelhas do sangue e/ou do plasma, economizando espaço para criopreservação, diminuindo o custo para os Bancos. A estocagem de uma única unidade



em duas alíquotas permite a expansão *in-vitro* de uma alíquota antes do transplante para proliferação de subtipos de células para imunoterapia pós-transplante<sup>22-24</sup>.

Durante o processo de coleta e manipulação celular, as bolsas devem ser congeladas num intervalo até 48 horas após a coleta, segundo a normatização do Brasilcord/Fact Netcord (RDC nº 56/2010 e RDC nº 9/2011).

Visto que o Brasil é um país de grande território, com população étnica diversa e grande diversidade de HLA, seria necessário colher bolsas de SCU de todas as regiões do país. Muitas vezes, as bolsas chegam de regiões distantes, o que dificulta o processo de congelamento ou o torna impossível de ser realizado durante o período de 48 horas, que é o recomendado pelas Agências Regulatórias Internacionais. A manutenção da viabilidade e funcionalidade dessas células, principalmente das células-tronco CD34<sup>+</sup> por mais dias permitiria o transporte de bolsas de SCU vindas de regiões mais distantes até os Bancos Públicos de SCU sem perder sua efetividade terapêutica.

A doação do SCU para o Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP cumpre todas as normas em relação aos aspectos éticos, determinados nas normas da ANVISA, RDC 153/2004, licença de funcionamento 350950210-864-000058-1-9. As bolsas de sangue de cordão que serão utilizadas serão aquelas já doadas pela gestante, que não atendam ao volume ou celularidade mínimas, exigidas pela ANVISA, para armazenamento e que seriam descartadas. Os termos de consentimento se encontram no Anexo.





# **OBJETIVOS**



## **Objetivo geral**

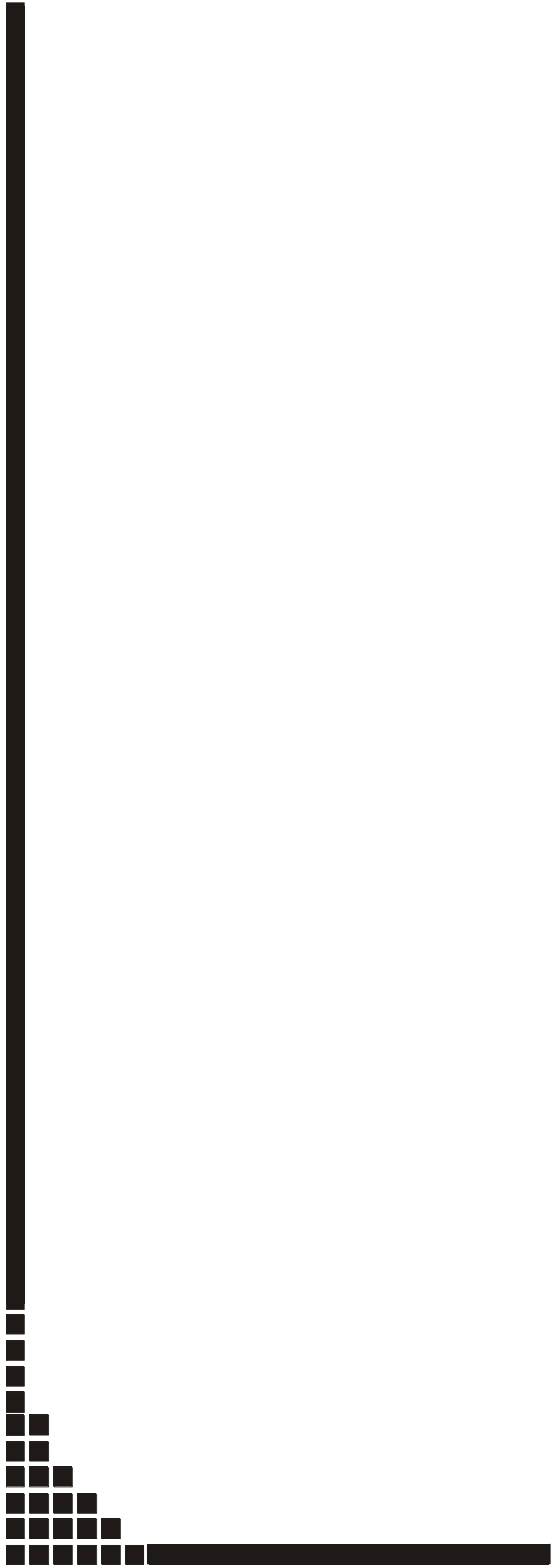
Estudar as células-tronco CD34<sup>+</sup> e outros subtipos de células mononucleares presentes no sangue de cordão umbilical, avaliando a viabilidade através da técnica de 7-AAD de amostras de SCU mantidas em temperatura ambiente, até 96 horas após a coleta, durante o período de pré-congelamento. Estudar a funcionalidade das células-tronco CD34<sup>+</sup> nas diversas fases através de ensaio clonogênico. Descongelar essas amostras e reavaliá-las após 6 meses de congelamento.

## **Objetivos específicos**

Artigo 1 – Avaliar a variação da proporção e viabilidade das células-tronco CD34<sup>+</sup>, bem como as demais células mononucleares de SCU até 96 horas após a coleta, mantidas a temperatura ambiente (20 – 22<sup>o</sup>C).

Artigo 2 – Avaliar se as células-tronco CD34<sup>+</sup> e os outros subtipos de células mononucleares de SCU manipuladas até 96 horas após a coleta, submetidas ao congelamento mantém boa viabilidade e funcionalidade após o descongelamento.





# CAPÍTULOS





## Capítulo I

**Artigo publicado em: Transfusion 2013; 9:2034-42.**

### **Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection**

Fernanda G. Pereira-Cunha, <sup>1</sup>Adriana S. S. Duarte, <sup>2</sup>Fernando F. Costa, <sup>3</sup>Sara T. O. Saad, <sup>3</sup>  
Irene Lorand-Metze, <sup>3</sup>Angela C. M. Luzo <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Haemathology Hemotherapy Center, Flow Cytometry Laboratory, State University of  
Campinas

<sup>2</sup> Haemathology Hemotherapy Center, Public Umbilical Cord Blood Bank, State University  
of Campinas

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of  
Campinas

#### **Address for correspondence:**

Ângela C M Luzo

Public Umbilical Cord Blood Bank, Haematology Hemotherapy Center, State University  
of Campinas, Rua Carlos Chagas 480, Zip code: 13083-970 Campinas-SP Brazil;

email: luzo@unicamp.br.

## **Abstract**

**Background and Objectives:** Umbilical cord blood (UCB) is a good source of hematopoietic stem cells for transplantation and cell therapy. In 2006, the Brazilian Public Network of Cord Blood Banks was founded; however, because our country is large, logistic problems could hamper the collection of numerous samples. Our aim was to evaluate the viability of several UCB cell subsets until 96 hours after collection, to examine whether this delay would be acceptable for processing and freezing the samples.

**Study Design and methods:** Two experiments were performed: in the first one, volume reduction of the UCB units was carried out before analysis. In the second one, analysis was carried out with no previous manipulation. Samples were stored at room temperature and one aliquot was taken daily for analysis. We examined CD34<sup>+</sup> cells, B-cell precursors, mature B and T lymphocyte, monocyte, granulocyte and mesenchymal stem cells (MSCs) concentration.

**Results:** Thirty-six UCBUs were analyzed. CD34<sup>+</sup> cells and mature T lymphocytes increased (viability 99%). Mature B-lymphocytes and MSCs decreased, maintaining viability. Granulocytes decreased with loss of viability. Monocytes and immature B lymphocytes remained stable. Clonogenic assays showed a decrease in colony-forming unit (CFU) number in UCB units stored for 96 hours.

**Conclusion:** UBC manipulation did not influence cell viability. All cell subsets remained viable until 96 hours after collection. CD34<sup>+</sup> cells and T lymphocytes increased, probably due to loss of other subsets. CFU growth during the period analyzed confirmed stem cell functionality, despite the decrease at 96 hours. Results demonstrated that UCB units could probably be processed up to 96 hours after the collection.

**Keywords:** umbilical cord blood, mononuclear cells subsets, CD34<sup>+</sup>, cell viability, 7-AAD, transplantation, umbilical cord blood bank.

## **Introduction**

Umbilical cord blood (UCB) is a safe and important source of hematopoietic stem cells for transplantation and cell therapy. It is being increasingly used for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with good results<sup>1-6</sup>. UCB contains several different stem cell types such as hemopoietic stem cells, unrestricted somatic stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs), and endothelial progenitors cells, among others. During the past 6 years they have been subject to exhaustive experimental investigation for use in regenerative therapy and will probably, in the future, become a good source of stem cells for regenerative medicine<sup>7-10</sup>.

UCB is easily obtained. There is a low incidence of transmissible infectious diseases when used for therapeutic purposes. Because their lymphocytes are almost naïve, in spite of the presence of the natural killer cells, they may be used for transplantation without total compatibility to human leukocyte antigens (HLA), presenting a low incidence of graft-versus-host disease (GVHD) and presence of graft versus leukemia<sup>11</sup>.

Since the first transplant, in 1988, approximately 14,000 cord blood transplants (CBTs) have been performed worldwide, using UCB units supplied by Public Umbilical Cord Banks. Nowadays, 400,000 units are available for allogeneic CBT. Cord blood processing and cryopreservation have been improved during the past two decades, introducing the use of volume reduction by red blood cells (RBCs) and/or plasma depletion, to save expensive cryogenic space. The storage of a single unit in multiple aliquots could allow the in vitro expansion of one aliquot before transplant or preserve one

aliquot to be manipulated and differentiated to MSCs in order to induce immunomodulation and treat GVHD.

Clinical procedures and policies have also been developed to overcome the impact of limited cell doses. Currently, collection, manipulation, and cryopreservation are well standardized and are regulated by the FACT/Netcord accreditation process<sup>12-13</sup>.

The quality control (QC) schedule includes measures before freezing and assays performed on cryotubes attached to the bags postthaw to obtain good results in CBTs<sup>14-15</sup>.

Different methods for enumeration and viability of CD34<sup>+</sup> cells have been published recently<sup>16-19</sup>. Solomon and colleagues<sup>20</sup> observed different degrees of viability of these cells when transported at different temperatures (4, 22-24, and 37°C). The viability analysis was performed by three different methods: trypan blue, acridine orange/propidium iodide, and 7-aminoactinomycin (7-AAD). Exclusion of 7-AAD was better than the other techniques, due to greater reproducibility and capability of detecting cells in early apoptosis. Viability was maintained for 72 hours when samples were kept at 4 and 22 to 24°C. At 37°C, colony-forming cell (CFC) recovery declined over time and was completely abolished after 72 hours. This was accompanied by a rapid decrease in viable CD34<sup>+</sup> cells. These authors suggest that, although FACT and AABB recommend processing within 48 hours after collection, this period could be extended to 80 hours.

Recently, Pamphilon and colleagues<sup>21</sup> in a multicenter study, analyzed the influence of temperature (4°C and room temperature) of cord blood hematopoietic stem cells stored up to 96 hours. They analyzed total nucleated cells (TNCs), mononuclear cells (MNCs), and

CD34<sup>+</sup> cell counts and viability, as well as colony-forming unit-granulocyte-macrophage (CFU-GM) counts and concluded that UCB units maintained at 4°C retained higher TNCs, MNC counts, and CD34<sup>+</sup> cell viability over the 72 to 96 hours storage period. However, they did not examine other cell subsets.

Brazil is a large country, with a mixed ethnic population, showing a great HLA diversity. In 2006, the organization of a Public Cord Blood Bank Network was founded, to cover all the HLA diversity, the collection of UCB units from all regions of the country would be necessary. Sometimes, arrive from distant locations, which would render the entire procedure of collection, manipulation, and freezing within 48 hours after collection, as standardized by international regulatory agencies, extremely difficult and, at times, impossible. We believe that this is the type of problem that could also exist in other countries. The aim of this study was to evaluate the CD34<sup>+</sup> cell viability as well as other MNC subtypes daily up to 96 hours after collection, at room temperature (20-22°C).

## **Materials and Methods**

The experiments were performed with UCB units donated to the Public UCB Bank at the University of Campinas, which did not comply with the criteria for being banked (UCB volume <70 mL, discounted the bag anticoagulant volume or initial TNCs below  $8.0 \times 10^8$ ), despite fulfilling all maternal criteria (absence of family history of genetic disorders, negative testing for viral or bacterial infections, absence of maternal fever during labor or delivery, gestation over 35 weeks, and delivery occurring under 24 hr after

rupture of membranes). Free informed consent was obtained from all mothers before the UCB unit collection. UCB units were submitted to all FACT/NetCord requirements.

### **UCB collection and volume reduction**

The collection of CB was performed by a staff that undergoes continuous training (e.g., midwives and physicians), without affecting the delivery. After delivery and with the placenta still “in utero,” the umbilical cord was clamped off. Thorough cleaning and disinfection was carried out to prevent contamination with maternal blood or germs. Subsequently, the umbilical vein was punctured, under sterile conditions, with a 16-gauge needle and cord blood was collected by gravity into a standard 250-mL collection UCB bag (Griffols, Barcelona, Spain) containing CPD as an anticoagulant. The procedure continued until the blood flow stopped.

The first experiment was performed with UCB bags submitted to volume reduction. RBC depletion was carried out to obtain the buffy coat fraction enriched in hematopoietic stem cells.

Volume reduction was performed either by the automated cell processing system device (SEPAX S 100, Biosafe SA, Geneva, Switzerland) or manually, through double centrifugation. Briefly, hydroxyethyl starch was added to the bag at a 5:1 ratio and was well mixed in an orbital shaker apparatus at room temperature for 30 minutes. The bag was then submitted to the automated process or to the double centrifuge. After the first centrifugation at 59 x g for 8 minutes, the plasma fraction with the enriched buffy coat was collected in a closed system and then submitted to a second centrifugation at 1500 x g for 30 minutes. Thereafter, the exceeding plasma was drained.

After volume reduction, one aliquot was aspirated and led at room temperature (20-22°C). The experiment was performed in the fractions obtained daily from this aliquot. The second experiment was performed with total UCB, where one aliquot was aspirated and led at room temperature (20-22°C) and then fractioned daily to perform the experiment.

### **Flow cytometry analysis**

UCB specimens were analyzed using a whole blood lysis technique. We used four-color combinations of monoclonal antibodies (MoAbs) to identify each cell population. All the antibodies used were purchased from BD Pharmingen (San Diego, CA), except for CD34 (Becton Dickinson, San Jose, CA) and CD105 (Invitrogen - Camarillo, CA).

The specific combinations used were: FITC-CD3/PE-CD19/PerCP-CD45/APC-CD34; FITC-HLA-DR/PE-CD123/PerCP-CD45/APC-CD4; FITC-HLA-DR/PE-CD14/PerCP-CD45/APC-CD33; FITC-CD71/PE-CD105/PerCP-CD45/APC-CD34.

For the analysis at 48 and 96 hours, that included the viability test with 7-AAD the combinations were: FITC-CD3/PE-CD19/7AAD/APC-CD34; FITC-HLA-DR/PE-CD123/7AAD/APC-CD4; FITC-HLA-DR/PE-CD14/7AAD/APC-CD33; FITC-CD71/PE-CD105/7AAD/APC-CD34.

The specimens were diluted to a concentration of  $5 \times 10^6$ /ml. Cell suspensions were incubated with the conjugated MoAbs at room temperature in the dark for 20 minutes. RBCs were lysed (FACS Lysing Solution, Becton Dickinson) for 10 minutes at room temperature in the dark. Cells were then centrifuged and the pellet was washed in phosphate-buffered saline (PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Finally, the cells were resuspended in PBS until the analysis was performed.

Data acquisition was performed by flow cytometry (FACSCalibur, CellQuest software, Becton Dickinson). At least 100,000 nongated events were collected and analyzed, selecting an appropriate gate on each cell population on the CD45/SSC plot (Infinicyt software, Euroflow, Cytognos, Salamanca, Spain). The expression of each antigen was recorded as the percentage from the total cell number. The strategy of analysis using CD45 to characterize hematopoietic cells and viability analysis from UCB MNC cells subsets using 7-AAD is shown in Fig. 1.

### **Clonogenic culture assays**

Clonogenic assays were performed with diluted CB samples containing  $1 \times 10^5$  cells/mL added to 3 mL of semisolid methylcellulose medium (Methocult GF H3343, StemCell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canada). Then, 1.5 mL of the medium was plated in two separate wells of a six-well plate in the first experiment. The second experiment was performed with  $1 \times 10^4$  cells/mL. The plates were incubated in a 37°C humidified (>95%) incubator ambient 5% CO<sub>2</sub>. After being incubated for 14 days, CFCs (BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, and CFU-E) with more than 50 cells were counted in situ with an inverted microscope and expressed as CFCs/ $10^5$  TNCs. All cultures were performed in duplicate. CFC was carried out at 24 hours postcollection during the first experiment and at 24 and 96 hours during the second one.

### **Statistical analysis**

A descriptive analysis was performed for all cell subsets. The changes of each cell population along the observation period (24-96 hrs) were calculated by the T-dependent test (WinStat software, R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany) in both experiments.



Comparisons among groups were made using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test (WinStat software). The results of the clonogenic assays were expressed as the arithmetical mean of the duplicates.

## **Results**

### **UCB analyzed units**

Thirty-six UCB units were analyzed. During the first experiment 20 UCB units were collected, 16 after normal vaginal full-term delivery and four after cesarean section delivery. The second experiment was performed with 16 UCB units, six after normal vaginal full-term delivery and 10 after cesarean section delivery.

### **Clonogenic assays**

During the analyzed period all the samples showed growing of CFUs (Table 1). There were a higher number of colonies during the first experiment. During the second experiment, a significant decrease of colonies was found in the samples examined after 96 hours postcollection ( $p < \square 0.001$ ).

### **Flow cytometry analysis**

During the period of observation, the proportion of CD34<sup>+</sup> cells increased during the first experiment and was stable in the second one (Table 2). The number of mature B lymphocytes decreased and T cells increased during both experiments (Table 2). There was also a loss of mature granulocytes and MSCs.

Concerning viability, none of these cell subsets had a considerable proportion of nonviable elements at all periods examined, except for granulocytes that presented a mean

of 7.2% (2.59% – 11.97%) after 48 hours of storage and 10.87% (4.76% – 17.15%) after 96 hours during the first experiment and a mean of 9.79% (4.86% - 55.13%) during the second one.

Concerning UBC cell subsets, at 24 hours the distribution of the studied subsets was similar (Table 3) except for immature B precursors that were more numerous ( $p < 0.001$ ) in the first experiment, when volume reduction was performed.

The analysis of cell subsets at 96 hours showed a significant decreased of mature and immature B lymphocytes ( $p < 0.001$ ). CD34<sup>+</sup> and MSCs also diminished, however with no significance in the second experiment (Table 4). Mature T lymphocytes and monocytes were almost the same and granulocytes increased, however with no significance in the second experiment (Table 4).

There were no significant differences related to flow cytometry and CFU assay results when normal vaginal full term deliveries were compared with cesarean section ones (data not shown).

## **Discussion**

In this study we analyzed the cell subsets composition of UCB units donated to the Public UCB Bank at the University of Campinas, with blood volume under 70 mL, not suitable for banking. The analysis was performed during the storage period of 24, 48, and 96 hours, at room temperature (20-22°C), before freezing, under two conditions. In the first experiment we studied units that had already been subjected to volume reduction, which led to concentrate the amount of cell subsets. In the second, we analyzed

nonmanipulated UCB units, whole blood. In both conditions, UCB composition was similar and presented a similar cell loss during the storage period analyzed. The little differences observed were secondary to cell subset concentration due to volume reduction in the first experiment.

During the period analyzed there was an increase in CD34<sup>+</sup> stem cells, probably due to the decrease of the mature granulocytes that were a major subset. The viability was around 100%, similar to other studies<sup>20,21</sup>. The analysis was performed by flow cytometry, using 7-AAD, which is actually considered the best technique for viability analysis for detecting early apoptosis. Duggleby and colleagues<sup>22</sup> have shown that when apoptosis is also measured using annexin V, the size of the apoptotic population of CD34<sup>+</sup> cells improved the prediction of CFU results. We could show that CD34<sup>+</sup> stem cells are resistant to a delay of 4 days between collection and processing at room temperature. This would facilitate transport from more distant places to one of the network cord banks.

Mature T lymphocytes increased significantly during the period of storage. This could be related to the loss of granulocytes, representing only a relative increase; however this should be investigated in further detail. A larger number of lymphocytes are known to be found in UCB and in peripheral blood of neonates with a large proportion of naïve cells<sup>23-26</sup>. Comparing lymphocyte subsets in UCB and adult peripheral blood, Lopes and coworkers<sup>26</sup> found two subsets according to their expression of CD45. Mature CD45<sup>high</sup> lymphoid populations had a similar distribution in UCB and adult peripheral blood. But CD45<sup>dim</sup> cells contain predominantly NK cells. As NK cells are innate immune cells, not requiring antigenic selection, they are likely to develop earlier than T cells<sup>26</sup>. This further

supports the premise that the CD45<sup>dim</sup> cells generally represent less mature populations. Perhaps, cells in the CD45<sup>dim</sup> region will only achieve full maturity after birth. Therefore, CD31/CD41/CD25<sup>high</sup> cells and CD31/CD81/CD25<sup>high</sup> cells expressing GITR, as well as NKT and NK cells among CD45<sup>dim</sup> lymphocytes probably represent naive populations. UCB T cells also produce interleukin (IL)-10, an important anti-inflammatory cytokine that could reduce severity of acute GVHD when produced by donor T cells during transplantation<sup>11</sup>. Accordingly, UCB also contains a larger number of CD5<sup>+</sup> mature B lymphocytes<sup>27-28</sup>. We could confirm the low but persistent number of immature B cells; however, the number of mature ones fell over storage time before processing.

Monocytes did not present significant changes in number and cell viability during the 96 hours of storage. UCB monocytes give rise to immature dendritic cells, weakly stimulated by T cells in mixed lymphocyte reaction, less susceptible to complete maturation, defective in IL-12 production, and impaired ability to elicit interferon- $\gamma$ , suggesting that UCB monocytes have an intrinsic limitation in their differentiation into fully mature dendritic cells<sup>11</sup>.

Taken together, all these data may be an additional important factor related to the low incidence of GVHD in UCB transplants. Thus, the maintenance of viable monocytes and lymphocytes during the analyzed period was very important.

The major loss of cells in the 4 days of storage was represented by mature granulocytes, presenting a lower viability when compared with other cell types. It has been stressed that release of granule content of granulocytes in the stem cell products for

transplantation increases the concentration of elastase, matrix metalloproteinase-9, IL-1 $\beta$ , and IL-6, impairing the stem cells' homing and engraftment in the transplant recipients<sup>29</sup>.

MSCs appeared in a low number, decreasing with the time of storage. However, their viability persisted around 100%. The remained presence of MSCs is important as they have immunomodulatory properties and great capacity of differentiation to others lineages as osteocytes, chondrocytes, adipocytes, cardiomyocytes and neuronal<sup>11,29</sup>. MSCs are capable of self-renewal and have a high proliferative capacity. They have been suggested as potential cell source for tissue engineering and cell-based therapy<sup>30-32</sup>. They are able to suppress immune responses, primarily suppressing T cell proliferation and cytokine production<sup>29-33</sup> being useful in the treatment of GVHD<sup>33</sup>. Despite the fact that the MSC number at 96 hours was very low, it would be necessary to analyze their proliferative and differentiation capacities at that time. If these properties persisted despite the lower percentage, UCB manipulation until 96 hours would probably not interfere with MSC functionality.

The results concerning clonogenic assays showed that the CD34<sup>+</sup> stem cells were able to differentiate into the hematopoietic lineages during all the analyzed time points, until 96 hours after collection. Despite the decrease observed in the second experiment, that could be explained by the different cell seeding concentration performed (1 x 10<sup>5</sup> cells/mL, first experiment, and 1 x 10<sup>4</sup> cells/mL, in the second), the amount of counted colonies was still high and almost the same until 96 hours. These results were similar to those recommended as normal according to the stem cells CFU-C assay manual (1-330 colonies), which is based on Helgason and Miller<sup>34</sup>. Diminishing the number of

colonies improved the reading. At the first concentration, the culture dish became crowded, rendering colony counting and reading difficult.

Recently, the importance of the CFC analysis as QC for transplantation has been highlighted. Page and coworkers<sup>35</sup> analyzed 435 cases of CBT confirming that the clonogenic assays (total number of CFUs) are a strong independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated UCB transplantation. The same group recently described a novel scoring system to optimize UCB unit selection for transplantation, analyzing TNCs, MNCs, CFUs, and CD3<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> content<sup>36,37</sup>.

The obtained results were comparable with previous studies from other groups that observed a good proportion of viable cells in UCB units beyond 48 hours (80 and 72-96 hr, respectively)<sup>19-21</sup> after collection. These authors also observed a decrease in the number of MNCs, but they did not examine which cell subsets had decreased. We observed a decrease of mature B lymphocytes, granulocytes, and MSCs but all, except granulocytes, maintained a high viability until 96 hours at room temperature (22- 24°C), according to exclusion of 7-AAD. This is an important finding as MSCs are becoming very important for transplantation and cell therapy. We could also demonstrate that CD34<sup>+</sup> stem cells were viable and able to differentiate into hematopoietic lineages until 96 hours postcollection.

When the type of delivery was taken into account, there was no significance concerning all the variables analyzed, similar to data found by others<sup>38</sup>.

Despite these results that lead to the assumption that UCB could be processed up to 96 hours after collection, further analyses confirming the data are necessary before this novel

processing method can actually be put safely into use for cord blood banking, in terms of transplantation procedure.

## References

1. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:635-642.
2. Broxmeyer HE, Cooper S, Hass DM, et al. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:627-633.
3. Arcese W, Buccisano F, Cerretti R, Picardi A for the Rome Transplant Network. Cord blood transplantation in adults with acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23:197-206.
4. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, et al. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Blood* 2011; 118:282-288.
5. Ruggeri A, Eapen M, Scaravadou A, et al for the Eurocord Registry; Center for International Blood and Marrow Transplant Research; New York Blood Center. Umbilical cord blood transplantation for children with thalassemia and sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1375-1382.
6. Fukunaga A, Nakamura F, Yoshinaga N, et al. Successful treatment with combined chemotherapy of two adult cases of hemophagocytic lymphohistiocytosis in recipients of umbilical cord blood cell transplantation. *Int J Hematol* 2011; 93: 551-554.

7. Kogler G, Critser P, Trapp T, et al. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 683-697.
8. Kaner T, Karadag T, Cirak B, et al. The effects of human umbilical cord blood transplantation in rats with experimentally induced spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2010; 13:543-551.
9. Boltze J, Schmidt UR, Reich DM, et al. Determination of the therapeutic time window for human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation following experimental stroke in rats. *Cell Transplant* 2011; Dec 13. [Epub ahead of print]
10. Lim JY, Jeong CH, Jun JA, et al. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2:38.
11. Kim YJ, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011; 79:12-126.
12. Wagner E, Duval M, Dalle JH, et al. Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion* 2006; 46: 1190–1198.
13. Querol S, Gomez SG, Pagliuca A, et al. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45:970–978.
14. Picardi A, Arcese W. Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: A Transplant Center perspective. *Transfus Apher Sci* 2010; 42:289-297
15. Kudo Y, Minegishi M, Seki O, et al. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol* 2011; 93:645-651.

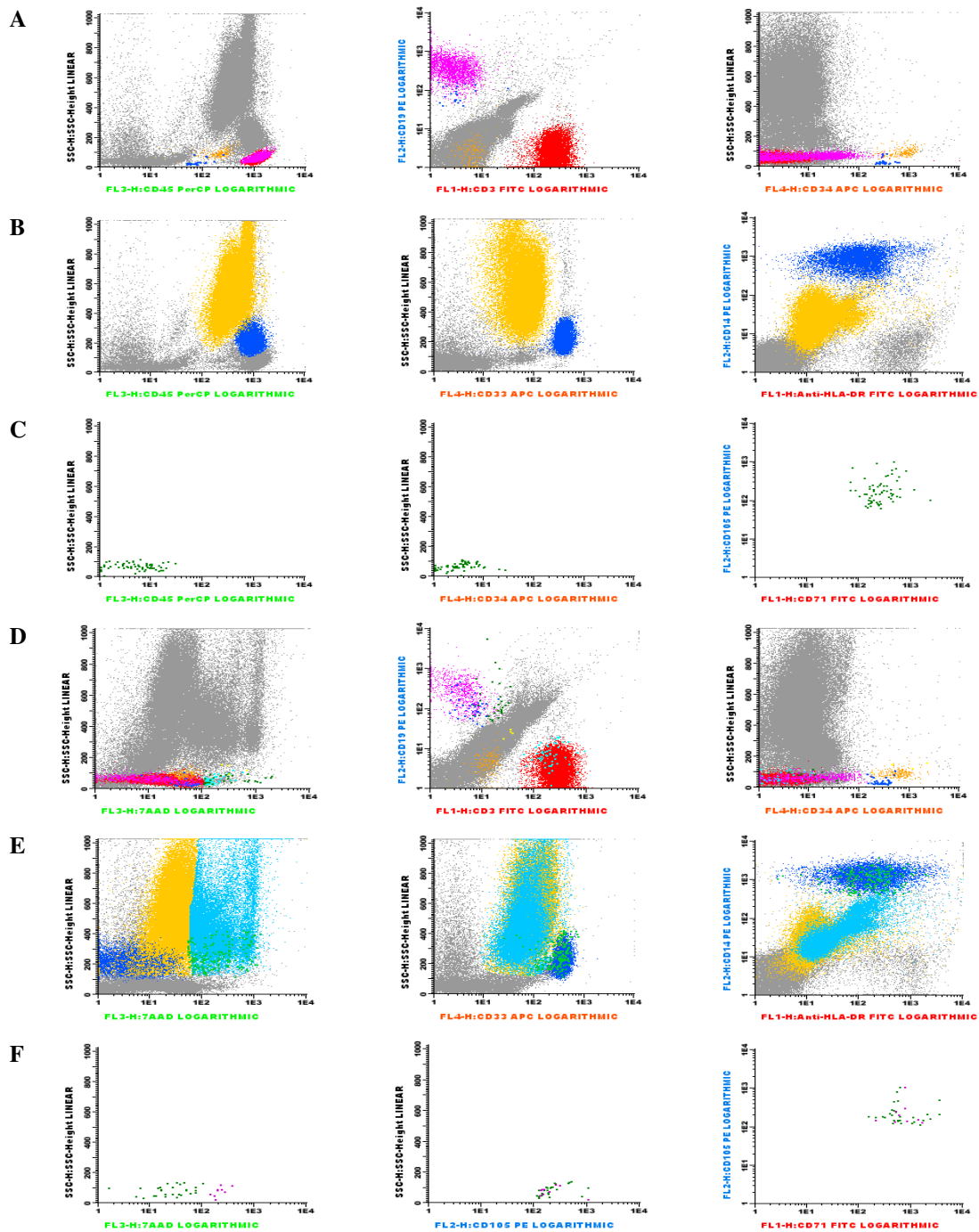


16. Flores AI, McKenna DH, Montalbán MA, et al. Consistency of the initial cell acquisition procedure is critical to the standardization of CD34<sup>+</sup> cell enumeration by flow cytometry: results of a pair wise analysis of umbilical cord blood units and cryopreserved aliquots. *Transfusion* 2009; 49:636-647.
17. Brand A, Eichler H, Szczepiorkowski ZM, et al. Viability does not necessarily reflect the hematopoietic progenitors cell potency of a cord blood unit: results of an interlaboratory exercise. *Transfusion* 2008; 48:546-549.
18. Lopes MC, Lawrence DA. Proficiency testing experience for viable CD34<sup>+</sup> stem cell analysis. *Transfusion* 2008; 48:1115-1121.
19. Pamphilon DH, Selogie E, Szczepiorkowski ZM. Transportation of cellular therapy products: report of a survey by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) collaborative. *Vox Sang* 2010; 99:168-173
20. Solomon M, Wofford J, Johnson C, et al. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion* 2010; 50:820-830.
21. Pamphilon D, Curnow E, Belfield H, et al. Storage characteristics of cord blood progenitor cells: report of a multicenter study by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Transfusion* 2011; 51:1284-1290.
22. Duggleby RC, Querol S, Davy RC, et al. Flow cytometry assessment of apoptotic CD34<sup>+</sup> cells by annexin V labeling may improve prediction of cord blood potency for engraftment. *Transfusion* 2012; 52:549-559.

23. Schmutz N, Henry E, Jopling J, et al. Expected ranges for blood neutrophil concentrations of neonates: the Manroe and Mouzinho charts revisited. *J Perinatol* 2008; 28:275-281.
24. Proytcheva MA. Issues in Neonatal Cellular Analysis. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 560-573.
25. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, et al. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:5: 973-980.
26. Lopez MC, Palmer BE, Lawrence DA. Phenotypic differences between cord blood and adult peripheral blood. *Cytometry Part B (Clin Cytometry)* 2009; 76B:37–46.
27. Borges-Almeida E, Milanez H MBPM, Vilela MMS, Cunha FGP, Abramczuk BM, Reis-Alves SC, Metze K, Lorand-Metze I. The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infectious Diseases*, 2011, 11: 38.
28. Durandy A, Thuillier L, Forveille M, et al. Phenotypic and functional characteristics of human newborns' B lymphocytes. *J Immunol* 1990; 144:60-65.
29. Trébédén-Negre H, Rosenzwajg M, Tanguy ML, Lefrer F, Azar N. Delay recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potencial effect of a high number of total nucleated cell in the graft. *Transfusion*. 2010; 50: 2649-59.
30. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells* 2007;25: 2739–2749.

31. Locatelli F, Maccario R, Frassoni F. Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica* 2007; 92:873-877.
32. Doorn J, Moll G, Le Blanc K, et al. Therapeutic Applications of Mesenchymal Stromal Cells: Paracrine Effects and Potential Improvements. *Tissue Eng Part B Rev* 2012; 18: 11-115.
33. Svensson B, Nagubothu SR, Cedervall J, et al. Injection of human mesenchymal stem cells improves healing of vocal folds after scar excision--a xenograft analysis. *Laryngoscope* 2011; 121:2185-2190.
34. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*, vol.290. Totowa (NJ): Humana Press; 2005.
35. Page KM, 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. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17:1362-1374.
36. Le Blanc K, Tammika C, Rosendahl K, et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003; 31: 890–896.
37. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, *et al.* The Cord Blood Apgar: a novel scoring system to optimize selection of banked cord blood grafts for transplantation (CME). *Transfusion* 2012; 52: 272-283.
38. Thornton CA, Capristo CC, Power LL, et al. The effect of labor on neonatal T-cell phenotype and function. *Pediatr Res* 2003; 54:120-124.

Figure 1. Flow Cytometry strategy analyses and 7-AAD viability analyses.



**Legend:** Strategy of analysis using CD45 to characterize hematopoietic cells and viability analysis at 96 hours from UCB MNC cells subsets using 7-AAD. **A:** Orange dots represent CD34<sup>+</sup> stem cells (CD34<sup>+</sup>C19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>); B-cell precursors (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) are identified as blue dots; Mature B (CD34<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) (pink dots) and T (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) (red dots) lymphocytes. **B:** Monocytes (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) (blue dots) and Granulocytes (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>) (orange dots). **C:** Mesenchymal stem cells (CD45<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD105<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>) (green dots). **D:** Live cells (7-AAD<sup>-</sup>): CD34<sup>+</sup> stem cells are identified as orange dots; B-cell precursors (blue dots); Mature B (pink dots) and T (red dots) lymphocytes. Dead cells (7-AAD<sup>+</sup>): CD34<sup>+</sup> stem cells (yellow dots); Mature B (green dots) and T (cyan dots) lymphocytes. **E:** Live cells: Monocytes (blue dots) and Granulocytes (orange dots). Dead cells: Monocytes (green dots) and Granulocytes (light blue dots). **F:** Live cells: Mesenchymal stem cells (green dots). Dead cells: Mesenchymal stem cells (pink dots).

**Table 1. Clonogenic assays analysis results from the first and second experiments.**

1 <sup>st</sup> experiment		2 <sup>nd</sup> experiment	
UCB units analyzed	24 hrs, mean of counted CFUs	24 hrs, mean of counted CFUs	96 hrs, mean of counted CFUs
1	567.0 (578-556)	242.0 (257-228)	238.0 (242-235)
2	468.0 (477-459)	213.0 (215-211)	204.0 (209-200)
3	723.0 (737-709)	126.0 (125-127)	111.0 (113-109)
4	618.0 (625-611)	217.0 (196-239)	171.0 (170-173)
5	633.0 (639-627)	109.0 (96-123)	91.0 (89-94)
6	539.0 (524-554)	186.0 (188-184)	166.0 (164-169)
7	500.5 (498-503)	177.0 (177-178)	155.0 (157-153)
8	466.5 (456-477)	257.0 (254-261)	219.0 (220-218)
9	700.5 (710-691)	224.0 (220-228)	199.0 (201-197)
10	535.5 (543-528)	143.0 (140-147)	146.0 (151-142)
11	607.5 (604-611)	142.0 (139-145)	130.0 (123-137)
12	490.5 (495-486)	203.0 (212-195)	186.0 (187-185)
13	633.0 (639-627)	166.0 (171-162)	158.0 (153-164)
14	711.0 (708-714)	217.0 (211-223)	193.0 (195-192)
15	643.5 (645-642)	174.0 (180-169)	157.0 (151-163)
16	628.0 (619-637)	206.0 (203-209)	203.0 (201-205)
17	581.5 (589-574)		
18	634.0 (624-644)		
19	680.5 (685-676)		
20	448.5 (445-452)		
<b>CFU Mean</b>	585.5 (448-723)	194 (109-257)	168 (91-238)

**Legend:** Clonogenic assays analysis was performed with methocult medium;  $1 \times 10^5$  cells/ mL were seeded in the first experiment and  $1 \times 10^4$  cells/ mL in the second one. Colonies were read and counted on 14th day of culture. Colony scoring, minimum cell number for CFU counting was 50 cells. Results were considered as been the mean of the duplicates. CFC number diminished at 96 hrs, in the second experiment ( $p < 0.001$ ).

**Table2. UCB MNC subsets results in the analyzed periods (first experiment on the left and the second, on the right side).**

Cell subsets	24 hrs cell percentage	48 hrs cell percentage	96 hrs cell percentage	p value (24-48 hs)	p value (24-96 hs)	24 hrs cell percentage	96 hrs cell percentage	p value
CD34 <sup>+</sup> stem cells	0.26 (0.05-0.77)	0.30 (0.04-0.87)	0.39 (0.03-1.10)	<0.001	<0.001	0.26 (0.12-0.68)	0.28 (0.13-0.99)	0.01
Immature B cell	0.02 (0.002-0.09)	0.02 (0.0-0.10)	0.03 (0.003-0.09)	0.05	0.02	0.005 (0.00-0.41)	0.001 (0.00-0.05)	0.35
Mature B lymphocytes	5.59 (2.68-8.85)	4.69 (1.70-7.51)	1.63 (0.34-3.33)	<0.001	<0.001	5.51 (2.88-10.62)	0.86 (0.08-1.92)	<0.001
Mature T lymphocytes	16.89 (10.48-33.48)	21.41 (11.95-34.75)	26.96 (6.08-42.03)	<0.001	<0.001	23.04 (11.36-31.93)	28.13 (14.70-47.43)	0.003
Monocytes	9.21 (4.06-14.63)	9.5 (2.39-15.71)	8.28 (0.65-15.72)	0.16	0.16	7.68 (4.77-12.69)	7.37 (2.76-12.98)	0.16
Granulocytes	38.15 (25.04-55.58)	26.00 (16.58-50.67)	21.11 (4.75-45.73)	<0.001	<0.001	39.52 (11.63-59.52)	36.11 (17.37-58.13)	0.16
MSCs	0.02 (0.01-0.05)	0.01 (0.001-0.03)	0.006 (0.0-0.04)	0.001	0.004	0.02 (0.003-0.08)	0.002 (0.001-0.02)	<0.001

**Legend:** The UCB MNCs and subsets analysis were performed at 24, 48 and 96 hours after CB collection. Results from the first and second experiments were described by median (minimum - maximum); statistic analysis by p values obtained through T-dependent test, CD34<sup>+</sup> cells increased in the first experiment and were stable in the second one. Mature B lymphocytes and MSCs decreased maintaining viability. Granulocytes decreased with loss of viability. Monocytes and immature B Lymphocytes remained stable.

**Table 3: Analysis of cell subsets results in both experiments at 24 hours.**

Cell subsets	1 <sup>st</sup> experiment (n=20)	2 <sup>nd</sup> experiment (n=16)	p value
CD34 <sup>+</sup> stem cells	0.26 (0.05-0.77)	0.26 (0.12-0.68)	0,28
Immature B cell	0.02 (0.002-0.09)	0.005 (0.00-0.41)	<0.001
Mature B lymphocytes	5.59 (2.68-8.85)	5.51 (2.88-10.62)	0,19
Mature T lymphocytes	16.89 (10.48-33.48)	23.04 (11.36-31.93)	0,09
Monocytes	9.21 (4.06-14.63)	7.68 (4.77-12.69)	0,14
Granulocytes	38.15 (25.04-55.58)	39.52 (11.63-59.52)	0,26
MSCs	0.02 (0.01-0.05)	0.02 (0.003-0.08)	0,32

**Legend:** The distribution of the UCB cell subsets studied was similar at 24 hours except for immature B precursors that were more numerous ( $p < 0.001$ ) in the first experiment, when volume reduction was performed.



**Table 4: Analysis of cell subsets results in both experiments at 96 hours.**

Cell subsets	1 <sup>st</sup> experiment (n=20)	2 <sup>nd</sup> experiment (n=16)	p value
CD34 <sup>+</sup> stem cells	0.39 (0.03-1.10)	0.28 (0.13-0.99)	0,12
Immature B cell	0.03 (0.003-0.09)	0.001 (0.00-0.05)	<0.001
Mature B lymphocytes	1.63 (0.34-3.33)	0.86 (0.08-1.92)	<0.001
Mature T lymphocytes	26.96 (6.08-42.03)	28.13 (14.70-47.43)	0,35
Monocytes	8.28 (0.65-15.72)	7.37 (2.76-12.98)	0,14
Granulocytes	21.11 (4.75-45.73)	36.11 (17.37-58.13)	0,002
MSCs	0.006 (0.0-0.04)	0.002 (0.001-0.02)	0,02

**Legend:** The distribution of UCB cell subsets at 96 hours showed a significant decrease of mature and immature B lymphocytes ( $p < 0.001$ ); in the second experiment both CD34<sup>+</sup> cells and MSCs also diminished, but with no significance. Mature T lymphocytes and monocytes were almost the same and granulocytes increased without significance in the second experiment.



## Capítulo II

### Artigo submetido a: *Vox sanguinis* em 7 de março de 2014

**CD34+ stem cells and other mononuclear cell subtypes from umbilical cord blood  
manipulated up to 96 hours collection stored at room emperature: pre-freezing  
and post-thaw viability and functionality analyses**

Fernanda G. Pereira-Cunha<sup>1</sup>, Adriana S. S. Duarte<sup>2</sup>, Suiellen C. Reis-Alves<sup>3</sup>, Sara T. Olalla Saad<sup>4</sup>, Konradin Metze<sup>5</sup>, Irene Lorand-Metze<sup>4</sup>, Ângela C. M. Luzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Flow Cytometry Laboratory, Haematology Hemotherapy Center, University of Campinas

<sup>2</sup> Public Umbilical Cord Blood Bank, Haematology Hemotherapy Center, University of Campinas

<sup>3</sup> Cryopreservation Laboratory, Haematology Hemotherapy Center, University of Campinas

<sup>4</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas

<sup>5</sup> Department of Pathology, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas

#### **Address for correspondence:**

Fernanda G. Pereira Cunha

Flow Cytometry Laboratory, Haematology Hemotherapy Center, University of Campinas,

Rua Carlos Chagas 480,

13083-970 Campinas-SP Brazil;

Tel: 55-19-35218671; Fax: 55-19-35218600;

email: markcel@unicamp.br

## **Abstract**

**Background and Objectives:** Umbilical cord blood (UCB) is a good source of stem cells for cell therapy. We recently demonstrated that cord blood mononuclear cell subtypes (MNCs) analyzed by 7-AAD and clonogenic assays were viable and functional up to 96 hours after collection, even when stored at room temperature (RT). The present study analyzed the viability and functionality of these cells before and after cryopreservation.

**Study design and methods:** Samples from twenty UCB units, not suitable for banking, were analyzed at 24 and 96 hrs after collection, frozen (6 months) and thawed for reevaluation. MNCs were analyzed by flow cytometry. Cell viability was tested by 7-AAD and clonogenic assays were performed. **Results:** Pre freezing (PF) results were similar to those previously published. Post-thaw (PT) CD34<sup>+</sup> /24 hrs and CD34<sup>+</sup> /96 hrs decreased without statistic significance. PT /24 and 96 hrs results of mesenchymal stem cells (MSCs), immature and mature B and monocytes had no statistic significance. Both, T lymphocytes and granulocytes decreased with  $p = 0.001$ . Colony Forming Unit (CFU) growth was observed in all samples. Delay of 96 hrs PF showed CFU number decreased (median 68 x 57;  $p < 0.0001$ ), moreover PT decreased was larger (median 36 x 27 respectively). Lost of CFU number at 96 hrs PF was related to the proportion of non-viable CD34<sup>+</sup>, as expected. **Conclusion:** CD34<sup>+</sup> and MSCs remained viable until 96 hrs after collection at RT even frozen and thawed when demonstrated scarcely decreased of the percentages. CFU growth during all periods confirmed CD34<sup>+</sup> functionality.

**Keywords:** umbilical cord blood, mononuclear cells subsets, CD34<sup>+</sup>, cell viability, 7-AAD, cryopreservation, transplantation, umbilical cord blood bank regenerative medicine

## **Introduction**

Umbilical cord blood (UCB) is an essential therapeutic product for hematopoietic reconstitution and expansion and is being increasingly used for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with good results. UCB has also been under intense experimental investigation in regenerative medicine. Several cord blood subpopulations such as mesenchymal stromal cells, unrestricted somatic stem cells and endothelial cells have been studied in distinct assays<sup>1-11</sup>. Moreover, cord blood cells are being applied for standardized induced pluripotent stem cells (iPSC) generation<sup>12</sup>.

Major advantages of using UCB for transplantation includes the fact that the procedure may be carried out regardless of total compatibility to human leukocyte antigens (HLA) and two different UCB units (UCBU) can be infused in the same adult patient, due to the presence of naïve lymphocytes and natural killer cells, with a low incidence of graft versus host disease (GVHD) in the presence of graft versus leukemia effect (GVL)<sup>13</sup>.

Cord blood processing and cryopreservation have been modified during the last two decades, increasing the use of UCBU volume reduction by red blood cells and /or plasma depletion, as a cost saving alternative compensating for the expensive cryogenic space. All these progresses demand standardized procedures for collection, manipulation and cryopreservation that must be in agreement with the FACT/Netcord accreditation process<sup>14,15</sup>.

The quality assessment plan includes tests before freezing and assays performed on cryotubes attached to the bags after thaw to assure good results in cord blood

transplantation, required for Transplant Centres. The ideal aim is quantity, but with quality<sup>16,17</sup>.

Many investigations comparing different methods of CD34<sup>+</sup> stem cells enumeration, viability evaluation, and even a comparison between different UCB Bank methodologies of these tests have been recently published<sup>18-21</sup>. In a previous study<sup>22</sup> we demonstrated that cord blood CD34<sup>+</sup> stem cells, mature T lymphocytes, immature B lymphocytes, monocytes and MSCs remained viable up to 96 hrs after collection, even when stored at room temperature (RT) (20–22<sup>0</sup>C). Only mature B lymphocytes and granulocytes decrease significantly over time. There were no differences detected between whole blood versus volume reduced blood. Viability was tested using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) through flow cytometry and clonogenic assays were further used to confirm CD34<sup>+</sup> functionality. The results corroborated the findings of other authors<sup>23, 24</sup>.

Studies regarding post-thaw CD34<sup>+</sup> stem cell viability have been also published. Xiao and Dooley<sup>25</sup> studied fresh and thawed UCB MNC and demonstrated that the frequencies of apoptotic cells using 7-AAD in both samples were similar, revealing 2-3% dead cells when manipulated up to 48 hrs after collection. The cell deterioration was higher in the samples manipulated up to 72 hrs after collection. Recently, Castelhana et al.<sup>26</sup> evaluated loss of post-thaw CD34<sup>+</sup> stem cells from peripheral blood hematopoietic cell (PBHPCs) products, collected by leukapheresis for autologous bone marrow transplantation (BMT) and demonstrated that post-thaw viability decreased to a median of 95.6%.

Brazil is the largest of the Latin American countries, occupying an expansive territory; the country has a greatly mixed ethnic population, showing substantial HLA

diversity. In 2006, the organization of a Public Cord Blood Bank Network took place, however in order to cover the entire HLA diversity, UCBU would necessarily have to be collected from all the regions in the country. However, sometimes these units come from distant locations, rendering the cryopreservation process very difficult, as the end to end procedure, including collection, manipulation and freezing should be carried out up to 48 hrs after collection, as standardized by international regulatory agencies.

The aim of this study was to evaluate whether CD34<sup>+</sup> stem cells and other MNC subtypes of UCBU manipulated up to 96 hrs after collection and submitted to cryopreservation process, could maintain good viability and functionality after thaw.

## **Materials and Methods**

The experiments were performed with twenty UCB units donated to the Public UCB Bank at the University of Campinas, which did not comply with the criteria for being banked (UCB volume less than 70 mL, discounted the bag anticoagulant volume or initial TNCs below  $8.0 \times 10^8$ ), despite fulfilling all maternal criteria (absence of family history of genetic disorders, negative testing for viral or bacterial infections, absence of maternal fever during labor or delivery, gestation over 35 weeks, and delivery occurring under 24 hrs after rupture of membranes). All mothers provided free informed consent before UCB unit collection. UCB units were submitted to all FACT/NetCord requirements.

## **Umbilical cord blood collection**

Collection of CB was carried out without affecting the delivery by a staff that undergoes continuous training (e.g., midwives and physicians). After delivery and with the placenta still “in utero”, the umbilical cord was clamped off. Thorough cleaning and disinfection was carried out to prevent contamination with maternal blood or germs. Subsequently, the umbilical vein was punctured, under sterile conditions, with a 16-gauge needle and cord blood was collected by gravity into a standard 250-mL collection UCB bag (Griffols, Barcelona, Spain) containing CPD as an anticoagulant. The procedure continued until the blood flow stopped.

## **Study design**

One aliquot of the collected UCBU was aspirated, with no volume reduction, left at room temperature (20-22°C) and fractioned at 24 and 96 hrs after collection, in order to perform the experiments. The samples were frozen and stored for six months, and then thawed and reanalyzed.

The aliquots stored at 24 and 96 hours after collection before freezing and after thawing were immunophenotyped by flow cytometry analyses to CD34<sup>+</sup> stem cells, mature T lymphocytes (CD4 and CD8), mature B lymphocytes, monocytes, granulocytes, immature B-cell precursors and mesenchymal stem cells (MSCs). Cells viability was tested in all aliquots using 7-AAD exclusion technique.

In parallel, clonogenic assays of all samples were performed for BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM and CFU-E.



## **Flow cytometry analysis**

UCB specimens were analyzed using a whole blood lysis technique. A six-color combination of monoclonal antibodies (MoAbs) were used to identify the cells populations.

The antibodies used were purchased from BD Pharmingen, San Diego, CA, USA, except for CD34 (Becton Dickinson – San Jose, CA, USA) and CD105 (Invitrogen - Camarillo, CA, USA).

The specific combinations used at 24 and 96 hrs pre-freezing (PF) and post-thaw (PT) were: FITC-CD3/PE-CD8/7AAD/APC-CD4/APC-CY7-CD45, FITC-CD3/PE-CD19/7AAD/APC-CD34/APC-CY7-CD45, FITC-HLADR/PE-CD14/7AAD/APC-CD33/APC-CY7-CD45, FITC-CD90/PE-CD73/PE-Cy7-CD34/7AAD/APC-CD105/APC-CY7-CD45.

The specimens were diluted to a concentration of  $5 \times 10^6$ /mL. Cell suspensions were incubated with the conjugated MoAbs at room temperature in the dark for 20 minutes. Erythrocytes were lysed using BD Pharm Lyse (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), containing no fixative agent for 15 minutes in the dark at room temperature. Cells were centrifuged and the pellet was washed in phosphate buffered saline (PBS) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Finally, cells were resuspended in PBS until the analysis was performed.

Data acquisition was performed on a FACSCanto II (Becton Dickinson, CA, USA) flow cytometer using FACSDiva software (Becton Dickinson). At least 100,000 non gated events were collected and analyzed, selecting an appropriate gate on each cell population on the CD45/SSC plot and 7-AAD to exclude non-viable cells using the Infinicyt software

(Cytognos S.L., Salamanca, Spain). The expression of each antigen was recorded as the percentage from the total cell number to highlight the qualitative composition of the UCB (Fig. 1). The same analysis strategy was performed on the pre-freezing and immediately post-thaw samples.

### **Clonogenic assays**

Clonogenic assays were performed on pre-frozen and immediately post-thawed samples. Diluted UCB MNCs ( $1.0 \times 10^4$  cells/ mL), obtained by Ficoll–Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) density 1077 procedure, was added to 3 mL of methylcellulose medium (Methocult GF H3343, StemCell Technologies Vancouver, BC Canada) and 1.5 mL plated into two separate wells of a six well plate. The plates were incubated for 14 days at 37°C, in 5% CO<sub>2</sub>/95% air. CFU (BFU-E, CFU-GM, CFU-GEMM, and CFU-E) with over fifty cells counted and expressed as CFUs/10<sup>5</sup> TNCs by adding the total CFU count in two separated wells.

### **Freezing and thawing procedure**

UCBUs were centrifuged for 20 min at 3000 rpm for plasma depletion. The preserving solution containing 20% RPMI (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) and 10% DMSO (Origen Biomedical, Austin, Texas, USA) was added to UCB MNC pellet to achieve a final concentration of 1:1. Two aliquots of 1 mL in polypropylene cryotubes were cryopreserved through controlled-rate freezing in the Cryo-Med cooling chamber. The cells were cooled at 1°C/min to -30°C, 5°C/min to -70°C and 10°C/min to -90°C. Frozen cryotubes were then stored into liquid nitrogen containers. This procedure was performed

with samples of 24 and 96 hrs after collection. Cells were kept frozen up to 6 months. The thawing procedure was carried out quickly in a water bath at 37°C and processed immediately to perform flow cytometry analyses and clonogenic assays.

### **Statistical analysis**

A descriptive analysis was performed for all cell subsets and the data were presented as the median of positive cell percentages. The changes that occurred in each cell population throughout the observation period (24 - 96 hrs) for pre-freezing, post-thaw samples and in between them were calculated by t-dependent test. The correlation among CFU number and the other cell subsets were performed by Spearman correlation (WinStat software, R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). The results from the clonogenic assays were expressed as the arithmetical mean of the duplicates and submitted to t-dependent test analyses.

## **Results**

### **Flow cytometry analysis**

Comparing the samples processed 24 hrs and 96 hrs pre-freezing, percentages of mature T lymphocytes (both CD3/CD4 and CD3/CD8) increased significantly ( $p < 0.001$ ). Mature B lymphocytes diminished significantly ( $p < 0.001$ ). Immature B-cells, monocytes and MSCs remained unaltered during the interval between collections and processing. CD34<sup>+</sup> stem cells percentages increased ( $p < 0.001$ ). However, the number of granulocytes was much lower in those processed after 96 hrs ( $p < 0.0001$ ) (Table 1 and Fig. 2).

Comparing the pre-freezing and post-thaw samples, granulocytes presented the most important decrease, followed by mature T lymphocytes (both CD3/CD4 and CD3/CD8) (Table 1 and Fig. 2). The proportion of all other sub-populations remained stable post-thaw after the storage period of 6 months.

Concerning viability, PF and PT mature T lymphocytes and granulocytes showed the most important viability loss. Despite of the decrease in number of mature B lymphocytes, the remaining cells maintained a good viability. Immature B cells, monocytes and MSCs maintained viability approximately 99%. The viability of the CD34<sup>+</sup> cells PF and PT was approximately 99% (Table 2).

### **Clonogenic assays**

CFU growth was observed in all samples. However, the delay samples of 96 hrs after collection during the pre-freezing period showed a significant decreased in the counted number of colonies ( $p < 0.0001$ ). As expected, when comparing the pre-freezing and post-thaw periods, there was an additional and considerable loss in CFU number (Fig 3). Despite of this, a remaining significant number of CFU was always present, confirming CD34<sup>+</sup> functionality even when UCB samples were stored at room temperature and submitted to a cryopreservation procedure (Table 3).

The relative loss in CFU number occurred in UCB samples processed 96 hrs after collection, during the pre-freezing period had a median of 12% (0 - 22%) demonstrated by “(CFU 24 hrs - CFU 96 hrs) / CFU 24 hrs”. These findings showed a significant positive correlation with the proportion of non-viable CD34<sup>+</sup> stem cells measured at 24 hrs and at

96 hrs after collection ( $r = 0.41$ ;  $p = 0.03$  and  $r = 0.36$ ;  $p = 0.05$  respectively), as expected, and had no correlation with any other viable or non-viable cell subset (Fig 4).

The decrease in the post-thaw colony numbers for the samples processed at 24 hrs after collection had a median of 50% (42% - 77%) and for those processed after 96 hrs the median was 43% (27% - 62%).

## **Discussion**

UCB-based therapies have been used with considerable success mainly for transplantation of hematopoietic stem cells in the treatment of blood disorders. More recently however, they have been increasingly used for novel applications in non-hematopoietic diseases, as cellular regenerative therapy or immune modulation<sup>27</sup>. Moreover UCB is a promising stem cell source for induced pluripotent stem cells (iPSCs) procedures.

The Brazilian Public Network of Cord Blood Banks was founded in 2006. Brazil is a large country and logistic problems could hamper the collection of numerous units. In a previous study we analyzed MNC cord blood cells, including viability and functionality of CD34<sup>+</sup> stem cells up to 96 hrs after collection, stored at room temperature<sup>22</sup>. In the present study we analyzed whether these cells, mainly CD34<sup>+</sup> stem cells, maintain their viability and functionality when maintained under the same conditions, submitted to cryopreservation and thawed after a storage period of 6 months. We analyzed twenty samples stored at room temperature (20 - 22°C) and processed at 24 and 96 hrs after collection. Pre-freezing and post-thaw cell viability and functionality were analyzed and performed with whole UCB without volume reduction. The progressive loss of membrane

permeability was evaluated only by 7-AAD incorporation. Despite annexin V being an excellent method to detect early phases of cell apoptosis, the same population is also detected by 7-AAD<sup>low</sup> with a reduced FSC<sup>28</sup>.

The percentage of CD34<sup>+</sup> cells increased during the delay of 96 hrs in processing. Their viability was approximately 100%, similar to other studies <sup>23,24</sup>. Castelhana et al.<sup>26</sup> analyzing CD34<sup>+</sup> stem cell loss in peripheral blood progenitor cells from leukapheresis products found a small but significant loss of viable CD34<sup>+</sup> stem cells between collection and post-thaw, but despite of this fact, the cells demonstrated good viability. In this study, CD34<sup>+</sup> stem cells maintained viability and functionality after 96 hrs post-collection even stored at room temperature. There was a slightly decrease of CD34<sup>+</sup> stem cells percentage post-thaw, without statistic significance. In spite the fact that CFU number have demonstrated a statistically significant diminished pre freezing and post thawing, the remained amount of colonies were within the range recommended by the Stem Cells CFU-C assays manual (presence of 1-330 colonies).<sup>29</sup> CFU number is a strong independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated UCB transplantation<sup>30</sup>.

Mature B lymphocytes diminished significantly during the period pre-freezing. In this concern, Kessel et al.<sup>31</sup> described that cord blood B cells presented spontaneous apoptosis when compared to peripheral adult B cells. These cells had a lower expression of Bcl-2 that plays a pivotal role in modulating membrane integrity and the release of apoptogenic factors from mitochondria. Bcl-2 is an anti-apoptotic protein localized predominantly in the mitochondria. Bax, a pro-apoptotic protein, resides in the cytoplasm and stimulates cell death after translocation to the mitochondria. It appears that the equilibrium between anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins expression determine the

vulnerability of the cell to apoptogenic stimuli<sup>32</sup>. Cord blood B cells show a low bcl-2/bax ratio. The great majority of umbilical cord blood B cells also express CD5, which is known to protect B cells from activation-induced cell death and also maintain tolerance in anergic B cells in vivo<sup>33</sup>. CD5 has been demonstrated to provide B cells with survival signals through the down-regulation of BCR-mediated early events and enhanced IL-10 production. IL-10 then induces Bcl-2, thereby providing a survival factor to B cells<sup>34</sup>. Indeed, CD5<sup>+</sup> B cells in cord blood and in adult life are also protected from spontaneous apoptosis when compared to CD5<sup>-</sup> B cells. This may be due to spontaneous IL-10 secretion by fresh CD5<sup>+</sup> B cells that was found to be higher than that of their CD5<sup>-</sup> counterparts<sup>34</sup>. However, cord blood CD5<sup>+</sup> B cells undergo increased apoptosis in comparison to adult CD5<sup>+</sup> B cells<sup>31-36</sup>. Lecoecur et al.<sup>28</sup> have shown that living CD19<sup>+</sup> B lymphocytes may have a low expression of this antigen, and consequently the phenotyping of apoptotic B cells could be misleading. Another hypothesis is that CD19<sup>+</sup> B cells show a high sensibility to temperature variations as demonstrated by Paxton and Bendele<sup>37</sup>. Post thaw mature B cells maintained the percentage.

Immature B Cells maintained similar proportions in pre-freezing period as found in our previous study. Post-thaw they showed a scarcely decreased without statistic significance.

As expected, mature T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) increased significantly with the delay of 96 hrs after collection, pre freezing as no mitogen was added to the sample. Aggarwal et al.<sup>38</sup> demonstrated that there was an increased T cell death in cord blood when compared to adult peripheral blood. This was attributed to either a low Bcl-2 expression or a low bcl-2/bax ratio. Lecoecur et al.<sup>28</sup> demonstrated that there was a decrease in CD8 expression

when cells undergo apoptosis. This occurs rapidly, since early apoptotic cells exhibit a 50% decrease in the mean fluorescence intensity. This drop was even more pronounced at a later stage of apoptosis. CD4 expression was also dramatically decreased in early apoptotic cells. Post thawing T lymphocytes percentage decreased significantly.

Monocytes maintained similar percentages in pre-freezing and post-thaw samples. UCB monocytes give rise to immature dendritic cells, weakly stimulated by T cells in mixed lymphocyte reaction, less susceptible to complete maturation, defective in IL-12 production, and impaired in the ability to secrete interferon- $\gamma$ , suggesting that UCB monocytes have an intrinsic limitation in their differentiation into fully mature dendritic cells<sup>13</sup>.

Taken together, all these data may be an additional important factor related to the low incidence of GVHD in UCB transplants. Thus, the maintenance of viable monocytes and lymphocytes during the analyzed period was very important.

Mesenchymal stem cells maintained almost the same percentages as in the pre-freezing samples, showed a tendency to decrease post-thaw maintaining their viability. Moreover, MSCs must necessarily be analyzed to verify whether they would be able to maintain their great capacity of proliferation and differentiation into other cell lineages.

Post-thaw maintenance of viability and functionality of UCB stem cells up to 96 hrs even when stored at room temperature could possibly allow the collection of UCBUs from places remote from UCB Banks which would be of great value for the banking in Umbilical Cord Blood Banks of important stem cells sources used in regenerative medicine.



## References

1. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:635-42.
2. Broxmeyer HE, Cooper S, Hass DM, Hathaway JK, Stehman FB, Hangoc G. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:627-33.
3. Arcese W, Buccisano F, Cerretti R; Picardi. A for the Rome Transplant Network. Cord blood transplantation in adults with acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23:197-206.
4. Brunstein CG, Fuchs EJ, Carter SL, Karanes C, Costa LJ, Wu J, Devine SM, Wingard JR, Aljittawi OS, Cutler CS, Jagasia MH, Ballen KK, Eapen M, O'Donnell PV. Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Alternative donor transplantation after reduced intensity conditioning: results of parallel phase 2 trials using partially HLA-mismatched related bone marrow or unrelated double umbilical cord blood grafts. *Blood* 2011; 118:282-8.
5. Ruggeri A, Eapen M, Scaravadou A, Cairo MS, Bhatia M, Kurtzberg J, Wingard JR, Fasth A, Lo Nigro L, Ayas M, Purtill D, Boudjedir K, Chaves W, Walters MC, Wagner J, Gluckman E, Rocha V. Eurocord Registry; Center for International Blood and Marrow Transplant Research; New York Blood Center. Umbilical cord blood transplantation for children with thalassemia and sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17:1375-82.
6. Fukunaga A, Nakamura F, Yoshinaga N, Inano S, Maruyama W, Hirata H, Arima N. Successful treatment with combined chemotherapy of two adult cases of

- hemophagocytic lymphohistiocytosis in recipients of umbilical cord blood cell transplantation. *Int J Hematol* 2011; 93:551-4.
7. Kogler G, Critser P, Trapp T, Yoder M. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44: 683-97.
  8. Kaner T, Karadag T, Cirak B, Erken HA, Karabulut A, Kiroglu Y, Akkaya S, Acar F, Coskun E, Genc O, Colakoglu N. The effects of human umbilical cord blood transplantation in rats with experimentally induced spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2010; 13:543-51.
  9. Boltze J, Schmidt UR, Reich DM, Kranz A, Reymann KG, Strassburger M, Lobsien D, Wagner DC, Förschler A, Schäbitz WR. Determination of the therapeutic time window for human umbilical cord blood mononuclear cell transplantation following experimental stroke in rats. *Cell Transplant* 2012; 21:1199-211.
  10. Lim JY, Jeong CH, Jun JA, Kim SM, Ryu CH, Hou Y, Oh W, Chang JW, Jeun SS. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2:38.
  11. Falkenberg H, Radke TF, Kogler G, Stuhler K. Proteomic profiling of ex vivo expanded CD34-positive haematopoietic cells derived from umbilical cord blood. *Stem Cells Int* 2013; 2013: 245695. doi: 10.1155/2013/245695.
  12. Wang J, Gu Q, Hao J, Bai D, Liu L, Zhao X, Liu Z, Wang L, Zhou Q. Generation of induced pluripotent stem cells with high efficiency from human umbilical cord blood mononuclear cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013; 11:304-11
  13. Kim YJ, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their

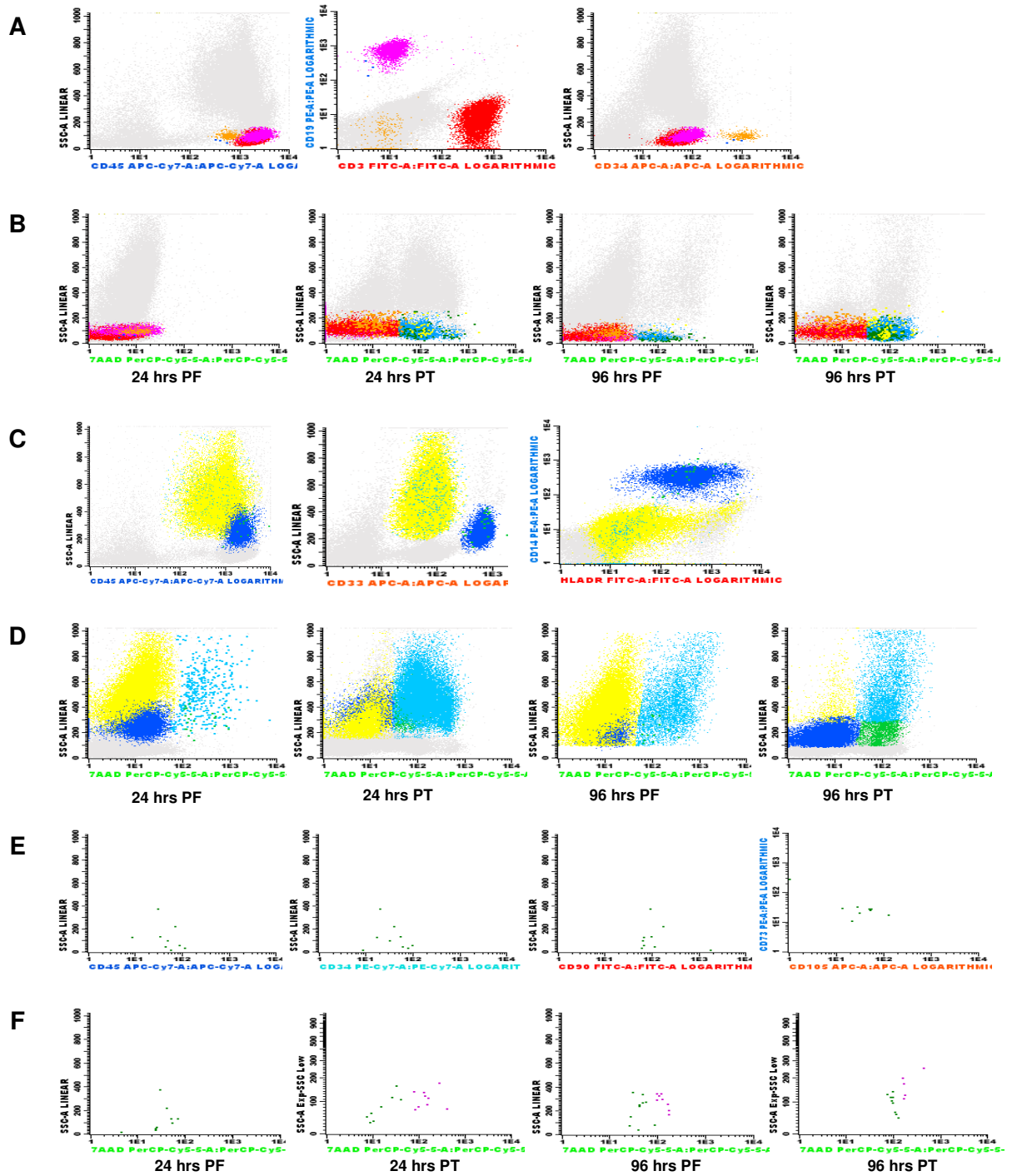
- potential roles in transplantation tolerance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 79:112-126.
14. Wagner E, Duval M, Dalle JH, Morin H, Bizier S, Champagne J, Champagne MA. Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion* 2006; 46:1190-8.
  15. Querol S, Gomez SG, Pagliuca A, Torrabadella M, Madrigal JA. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45:970-8.
  16. Picardi A, Arcese W. Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective. *Transfus Apher Sci* 2010; 42:289-97.
  17. Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, Sato Y, Abe M, Ishioka N, Harigae H, Tsuchiya S. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol* 2011; 93:645-51.
  18. Flores AI, McKenna DH, Montalbán MA, De la Cruz J, Wagner JE, Bornstein R. Consistency of the initial cell acquisition procedure is critical to the standardization of CD34<sup>+</sup> cell enumeration by flow cytometry: results of a pair wise analysis of umbilical cord blood units and cryopreserved aliquots. *Transfusion* 2009; 49:636-47.
  19. Brand A, Eichler H, Szczepiorkowski ZM, Hess JR, Kekomaki R, McKenna DH, Pamphilon D, Reems J, Sacher RA, Takahashi TA, van de Watering LM. Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. Viability does not necessarily reflect the hematopoietic progenitor cell potency of a cord blood unit: results of an interlaboratory exercise. *Transfusion* 2008; 48: 546-9.
  20. Lopes MC, Lawrence DA. Proficiency testing experience for viable CD34<sup>+</sup> stem cell analysis. *Transfusion* 2008; 48:1115-21.
  21. Pamphilon DH, Selogie E, Szczepiorkowski ZM. Transportation of cellular therapy

- products: report of a survey by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) collaborative. *Vox Sang* 2010; 99:168-73.
22. Pereira-Cunha FG, Duarte AS, Costa FF, Saad ST, Lorand-Metze I, Luzo AC. Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection. *Transfusion* 2013; 9:2034-42.
  23. Solomon M, Wofford J, Johnson C, Regan D, Creer MH. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion* 2010; 50:820-30.
  24. Pamphilon D, Curnow E, Belfield H, Reems JA, McMannis J, Lecchi L, Szczepiorkowski Z, McKenna D. Storage characteristics of cord blood progenitor cells: report of a multicenter study by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Transfusion* 2011; 51:1284-90.
  25. Xiao M, Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. *J Hematother Stem Cell Res* 2013; 12:115-22.
  26. Castelhana MV, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA, Lorand-Metze I. Quantifying loss of CD34<sup>+</sup> cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfus Apher Sci* 2013; 48:241-46.
  27. Lafolla MAJ, Tay J, Allan DS. Transplantation umbilical cord blood-derived cells for novel indications in regenerative therapy or immune modulation: a scoping review of clinical studies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013. doi:pii: S1083-8791(13)00409-6. 10.1016/j.bbmt.2013.09.010. [Epub ahead of print]
  28. Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD

- cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods* 1997; 209:111-23.
29. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*, vol.290. Totowa (NJ): Humana Press; 2005.
  30. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, Balber AE, Kurtzberg J. 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. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17:1362-74.
  31. Kessel A, Yehudai D, Peri R, Pavlotzky E, Bamberger E, Tov N, Toubi E. Increased susceptibility of cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis. *Clin Exp Immunol* 2006; 145:563-70.
  32. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.
  33. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med* 2000; 191:883-90.
  34. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood* 2002; 100:4537-43.
  35. Borges-Almeida E, Milanez HM, Vilela MM, Cunha FG, Abramczuk BM, Reis-Alves SC, Metze K, Lorand-Metze I. The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis* 2011; 11:38.
  36. Durandy A, Thuillier L, Forveille M, Fischer A. Phenotypic and functional characteristics of human newborns' B lymphocytes. *J Immunol* 1990; 144:60-5.

37. Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 677:440-3.
38. Aggarwal S, Gupta A, Nagata S, Gupta S. Programmed cell death (apoptosis) in cord blood lymphocytes. *J Clin Immunol* 2005; 17:63-73.

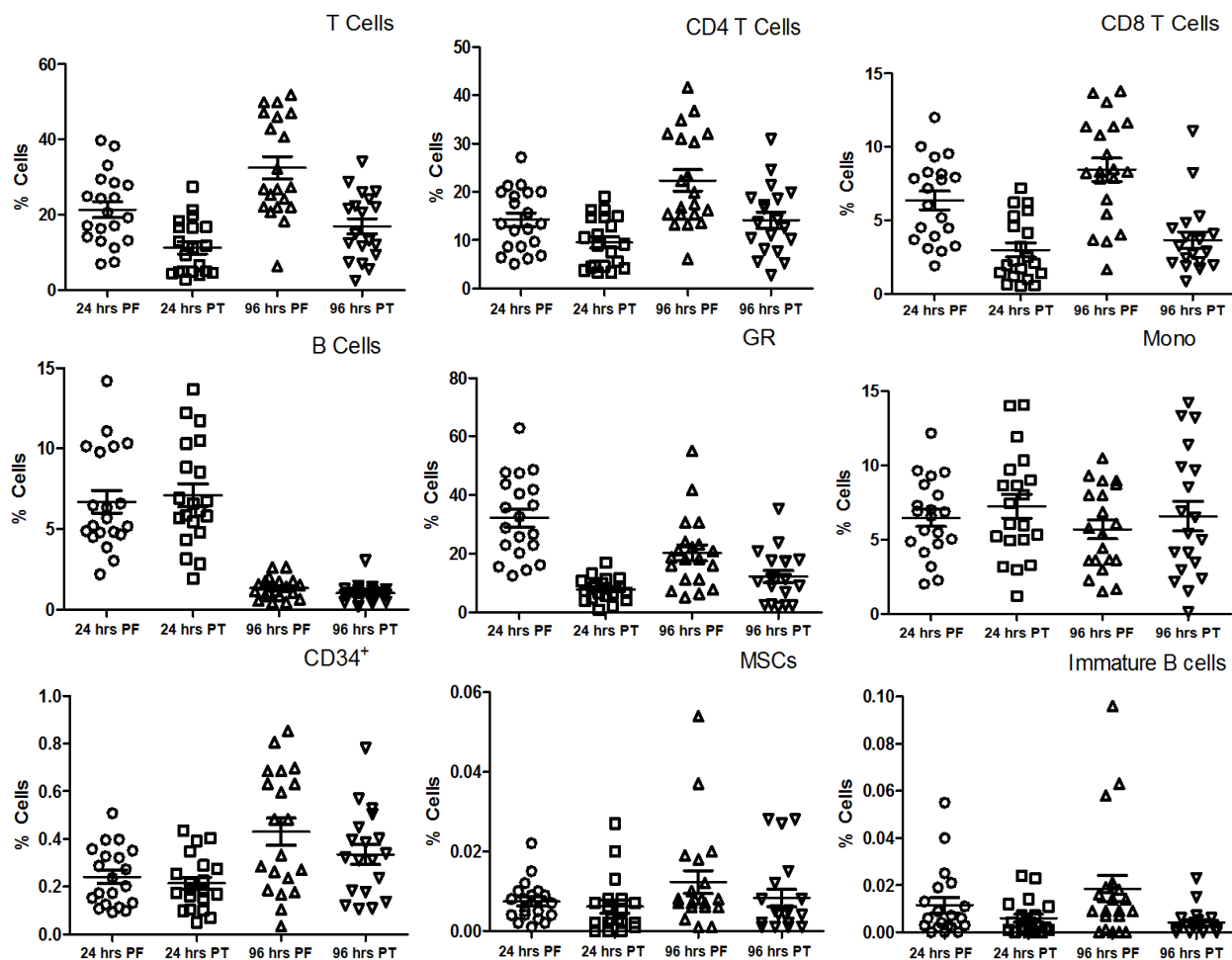
Figure 1. Flow Cytometry strategy analyses and 7-AAD viability analyses.



**Legend:** Analysis strategy of UCB MNC subsets using CD45 to characterize hematopoietic cells and 7-AAD to viability analysis at 24 and 96 hrs PF and PT. **(A)** Orange dots represent CD34<sup>+</sup> stem cells (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>); immature B (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) are identified as blue dots; B cells (CD34<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), pink dots; and T cells (CD34<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>), red dots. **(B)** Live cells (7-AAD<sup>-</sup>): CD34<sup>+</sup> stem cells are identified as orange dots; immature B, blue dots; B cells, pink dots; and T cells, red dots. Dead cells (7-AAD<sup>+</sup>): CD34<sup>+</sup> stem cells, yellow dots; B cells, green dots; and T cells, cyan dots. **(C)** Monocytes (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>+</sup>), blue dots; and granulocytes (CD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>), yellow dots. **(D)** Live cells: monocytes, blue dots; and granulocytes, orange dots. Dead cells: monocytes, green dots; and granulocytes, light blue dots. **(E)** MSCs (CD45<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD105<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>), green dots. **(F)** Live cells: MSCs, green dots. Dead cells: MSCs, pink dots.

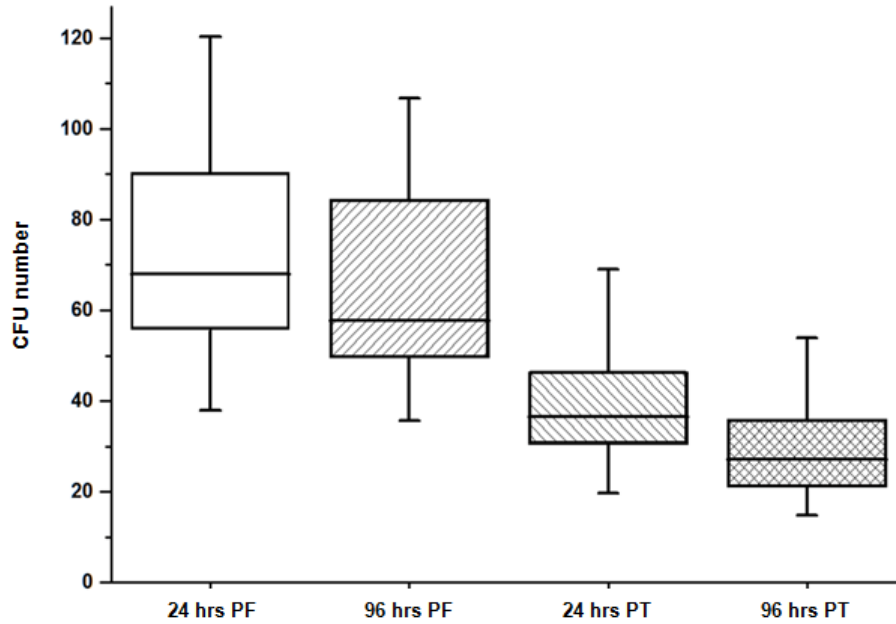


**Figure2. Comparison of UCB MNC subsets distribution at 24 and 96 hrs pre freezing and post-thawing (results described by percentage).**



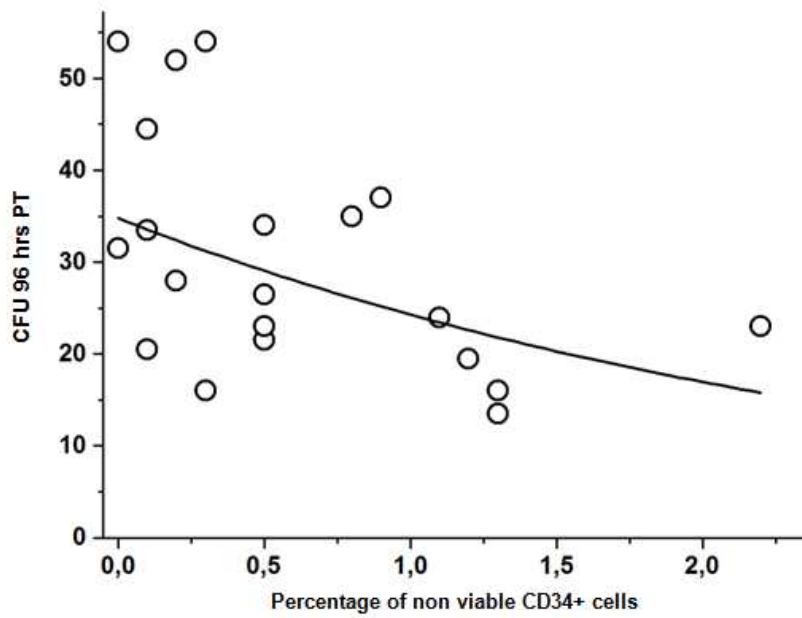
**Legend:** T Cells = mature T Lymphocytes; CD4 T Cells = T Lymphocytes CD4<sup>+</sup>; CD8 T Cells = T Lymphocytes CD8<sup>+</sup>; B Cells = mature B Lymphocytes; GR = Granulocytes; Mono = Monocytes; CD34<sup>+</sup> = CD34<sup>+</sup> stem cells; MSCs = Mesenchymal stem cells; Immature B Cells = Immature B lymphocytes.

**Figure 3: Distribution CFU number of samples stored at room temperature 24 and 96 hrs after collection, pre-freezing and post-thaw**



**Legend:** An important decrease was observed post-thaw when compared with pre-freezing samples.

**Figure 4: Relationship among CFU number and non-viable CD34<sup>+</sup> stem cells.**



**Legend:** The decrease in CFU number is related to the increase of non viable CD34<sup>+</sup> stem cell percentages.

**Table 1. UCB MNC subsets analyses results 24 and 96 hrs after collection, pre freezing and post-thawing.**

UCB MNC subtypes	Pre Freezing (PF)		Post Thawing (PT)		p value			
	24 h cell percentage	96 h cell percentage	24 h cell percentage	96 h cell percentage	24 h PF - 96 h PF	24 h PF - 24 h PT	96 h PF - 96 h PT	24 h PT - 96 h PT
CD34 <sup>+</sup> stem cells	0.21 (0.09-0.51)	0.40 (0.03-0.85)	0.18 (0.05-0.43)	0.32 (0.11-0.78)	<0.001	0.33	0.21	0.006
Immature B-cell	0.006 (0.00-0.05)	0.009 (0.00-0.09)	0.003 (0.00-0.02)	0.002 (0.00-0.02)	0.11	0.11	0.03	0.32
Mature B lymphocytes	5.43 (2.19-14.19)	1.27 (0.45-2.63)	6.36 (1.91-13.66)	0.99 (0.19-3.04)	<0.001	0.70	0.05	<0.001
Mature T lymphocytes	19.90 (6.94-39.77)	27.10 (6.36-51.89)	10.23 (2.77-27.40)	14.87 (2.52-34.15)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
CD3/CD4 T cells	13.39 (5.10-27.13)	18.72 (6.16-41.59)	9.06 (3.26-18.96)	13.66 (2.73-30.88)	<0.001	0.01	0.005	<0.001
CD3/CD8 T cells	6.61 (1.91-12.02)	8.29 (1.65-13.81)	2.15 (0.54-7.20)	2.89 (0.86-11.08)	0.002	<0.001	<0.001	0.20
Monocytes	6.73 (2.01-12.18)	5.59 (1.51-10.50)	6.76 (1.21-14.09)	5.43 (0.14-14.23)	0.32	0.41	0.50	0.64
Granulocytes	30.72 (12.52-62.88)	18.50 (5.16-55.07)	7.73 (0.83-16.96)	11.45 (1.77-35.30)	<0.001	<0.001	0.001	0.008
MSCs	0.007 (0.001-0.02)	0.008 (0.001-0.05)	0.003 (0.00-0.02)	0.004 (0.001-0.02)	0.10	0.44	0.31	0.43

**Legend:** Analyses were performed at 24 and 96 hrs after collection. Samples were stored at room temperature, then frozen and thawed in order to be reanalyzed. Results were described by median (minimum - maximum), statistical analysis used was the *t*-dependent test (Winstat software).

**Table 2. UCB MNC subsets viability analyses results at 24 and 96 hrs, pre freezing and post-thawing.**

UCB MNC subsets	Unviable Cells (median) PF		Viable Cells %	Unviable Cells (median) PT		Viable Cells %
	24 hrs	96 hrs		24 hrs	96 hrs	
CD34 <sup>+</sup> stem cells	0.005 (0.00-0.02)	0.008 (0.00-0.02)	99.99-99.99	0.041 (0.05-0.21)	0.034 (0.00-0.34)	99.98-99.96
Immature B-cell	0.00 (0.00-0.004)	0.00 (0.00-0.006)	100 - 100	0.00 (0.00-0.004)	0.00 (0.00-0.003)	100-100
Mature B lymphocytes	0.004 (0.00-0.05)	0.03 (0.00-0.22)	99.99 - 99.97	0.46 (0.09-2.22)	0.26 (0.05-1.17)	99.54-99.74
Mature T lymphocytes	0.012 (0.00-0.10)	0.11 (0.01-0.75)	99.98-99.89	13.53 (3.96-33.69)	24.76 (18.8-47.61)	86.47-75.24
CD3/CD4 T cells	0.013 (0.00-0.05)	0.059 (0.01-0.51)	99.98-99.94	8.81 (3.10-22.86)	17.32 (8.33-30.15)	91.19-82.68
CD3/CD8 Tcells	0.002 (0.00-0.01)	0.001 (0.00-0.06)	99.99-99.99	2.85 (0.06-6.42)	4.96 (0.36-11.20)	97.15-95.04
Monocytes	0.028 (0.00-0.07)	0.23 (0.06-0.80)	99.97-99.77	0.51 (0.08-3.11)	0.66 (0.05-4.47)	99.49-99.34
Granulocytes	1,56 (0.00-4.60)	3.61 (0.83-9.97)	98.44-96.39	13.21 (2.51-34.11)	5.02 (2.79-22.13)	86.79-94.98
MSCs	0.005 (0.00-0.02)	0.002 (0.00-0.01)	99.99-99.99	0.004 (0.00-0.02)	0.004 (0.00-0.04)	99.99-99.99

**Legend:** Viable and unviable cells results were expressed as median of their percentage.

**Table3. Clonogenic assays analyses results at 24 and 96 hrs pre freezing and post-thawing.**

UCB units	CFU number (mean)			
	24 hrs PF	24 hrs PT	96 hrs PF	96 hrs PT
1	62.5 (60-65)	47.0 (48-46)	49.5 (52-47)	37.0 (39-35)
2	54.5 (56-53)	42.5 (40-45)	49.5 (51-48)	34.0 (37-31)
3	69.0 (65-73)	31.0 (29-33)	59.5 (57-62)	21.5 (18-25)
4	119.0 (126-112)	67.5 (69-66)	103.5 (98-109)	54.0 (59-49)
5	67.0 (70-64)	33.5 (35-32)	54.5 (57-52)	24.0 (26-22)
6	52.0 (46-58)	22.0 (19-25)	40.5 (41-40)	16.0 (17-15)
7	103.5 (109-98)	68.5 (71-66)	91.5 (95-88)	52.0 (59-45)
8	80.5 (72-89)	37.5 (38-37)	84.5 (87-82)	28.0 (32-24)
9	113.0 (119-107)	61.0 (63-59)	92.5 (90-95)	44.5 (48-41)
10	84.0 (81-87)	40.5 (39-42)	82.0 (80-84)	31.5 (35-28)
11	32.0 (31-33)	17.5 (18-17)	31.0 (29-33)	13.5 (13-14)
12	56.5 (50-63)	26.0 (22-30)	51.0 (45-57)	16.0 (13-19)
13	81.5 (77-86)	39.0 (41-37)	66.5 (65-68)	33.5 (35-32)
14	63.5 (58-69)	30.0 (27-33)	51.5 (53-50)	19.5 (21-18)
15	82.5 (86-79)	35.5 (36-35)	69.5 (71-68)	23.0 (24-22)
16	121.5 (126-117)	69.5 (63-76)	110.0 (109-111)	54.0 (57-51)
17	96.5 (99-94)	46.0 (47-45)	84.5 (87-82)	35.0 (36-34)
18	52.0 (54-50)	34.5 (33-36)	48.0 (47-49)	26.5 (29-24)
19	44.0 (45-43)	26.5 (29-24)	44.0 (48-40)	20.5 (21-20)
20	63.5 (61-66)	32.0 (31-33)	56.0 (59-53)	23.0 (22-24)
<b>Total CFU mean</b>	74.9 (32-121)	40.3 (17-69)	65.9 (31-110)	30.3 (13-54)

**Legend:** Clonogenic assays were performed with methocult medium,  $1 \times 10^4$  cells/ mL were seeded. Colonies were read and counted on the 14<sup>th</sup> day of culture. Colony scoring, minimum cell number for CFU counting was 50 cells. Results were considered as the average of the duplicates and statistical analysis used was the *t*-dependent test (Winstat software).



## DISCUSSÃO





O SCU tem sido utilizado, com sucesso, principalmente em transplantes de células-tronco hematopoiéticas no tratamento de doenças hematológicas. Sua aplicação também tem se tornado cada vez maior em doenças não hematológicas e na terapia celular regenerativa ou imunomodulação <sup>16</sup>. Além disso, o SCU é uma fonte promissora para indução de células-tronco pluripotentes <sup>14</sup>.

O Brasil, assim como outros países, com grande extensão territorial, pode apresentar problemas de logística entre a coleta e a manipulação de muitas unidades de SCU, já que as normas de controle de qualidade preconizam que o congelamento deve ser realizado em até 48 horas após a coleta.

Baseado nisso, foram avaliadas a viabilidade e funcionalidade das células-tronco CD34<sup>+</sup> e a viabilidade de outros subtipos de células mononucleares de SCU até 4 dias após a coleta. No primeiro momento, foram avaliadas amostras pós-manipulação – pré-congelamento, com redução de volume em 24, 48 e 96 horas após a coleta e amostras sem redução de volume em 24 e 96 horas após a coleta, todas mantidas à temperatura ambiente (20 - 22°C). Num segundo momento, foram avaliadas amostras em 24 e 96 horas após a coleta, sem redução de volume, também mantidas a temperatura ambiente. Essas amostras foram submetidas ao congelamento por seis meses e foram reavaliadas após o descongelamento. Os resultados pré-congelamento do segundo trabalho corroboraram os do primeiro.

Cada subtipo celular foi identificado através da imunofenotipagem por citometria de fluxo que é uma análise multiparamétrica que permite a identificação e quantificação de antígenos celulares através de anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo. Essa

técnica teve início nos anos 80, causando uma revolução na imunologia, e expandindo-se para a análise de monócitos, macrófagos, células-tronco etc.

Pudemos observar que não houve diferença entre amostras manipuladas com redução de volume e amostra de sangue total. Em uma amostragem total de 56 unidades de SCU avaliadas em até 96 horas após a coleta pré-congelamento, as células-tronco CD34<sup>+</sup> e os linfócitos T aumentaram, provavelmente em função da perda significativa dos granulócitos. Os linfócitos B maduros diminuíram consideravelmente. Os monócitos, as células B imaturas e as células-tronco mesenquimais mantiveram praticamente a mesma porcentagem.

Os resultados de 20 unidades de SCU pós-descongelamento, mostraram que as células-tronco CD34<sup>+</sup> tendem a diminuir, mas não significativamente. Os linfócitos T e os granulócitos diminuíram significativamente. Os linfócitos B maduros e os monócitos mantiveram a porcentagem. As células B imaturas e as células-tronco mesenquimais tendem a diminuir, mas não significativamente.

Embora o número de CFU tenha diminuído significativamente durante o período pré-congelamento avaliado, com perda expressiva de funcionalidade pós-descongelamento, ainda assim, esta funcionalidade das células CD34<sup>+</sup> foi suficiente para o crescimento de colônias em todas as amostras e dentro do número recomendado pelas agências reguladoras (presença de 1-330 colônias)<sup>25</sup>. O ensaio clonogênico é o melhor teste para demonstrar a capacidade hematopoiética das células-tronco CD34<sup>+</sup>, onde é avaliada a quantidade de unidades formadoras de colônias (CFU) importantes para o sucesso do transplante<sup>23,24</sup>. O número de CFU é um forte preditor do número de neutrófilos e plaquetas do enxerto após o transplante de SCU não-relacionado<sup>26</sup>.

Após o descongelamento, os linfócitos T e os granulócitos foram as células que apresentaram maior taxa de morte celular. Os demais subtipos apresentaram boa viabilidade, inclusive as células-tronco CD34<sup>+</sup>. Outros autores também estudaram a viabilidade dessas células e apresentaram resultados semelhantes <sup>27-30</sup>. Embora a Anexina V seja muito utilizada para o estudo da apoptose celular, a viabilidade foi avaliada utilizando o corante 7-AAD. A apoptose é um processo ativo de autodestruição celular associada com profundas mudanças estruturais incluindo alterações morfológicas, aumento da permeabilidade da membrana e colapso nuclear caracterizado pela condensação da cromatina e fragmentação do DNA. A progressiva perda da permeabilidade da membrana pode ser avaliada pela incorporação de 7-AAD, que é um corante de viabilidade capaz de atravessar a membrana das células em apoptose ou necrose e intercalar ao DNA das mesmas. É utilizado na técnica de citometria de fluxo para distinguir as células viáveis das inviáveis, identificando também as células em início de apoptose, através da fraca marcação de 7-AAD e da diminuição do tamanho celular <sup>31</sup>.

Os resultados obtidos dos linfócitos B maduros podem ser explicados pelo fato dos linfócitos B do SCU apresentarem maior índice de apoptose do que os de sangue periférico. Eles apresentam baixa expressão de Bcl-2 que é uma proteína anti-apoptótica. Bax é uma proteína pró-apoptótica. Essas células, também apresentam baixa relação bcl-2/bax <sup>32</sup>. Embora as células B de SCU expressem CD5, que as protege da ativação induzida pela morte celular, elas apresentam maior índice de apoptose do que as células B de adultos <sup>32-37</sup>. Lecoeur e colaboradores <sup>31</sup> demonstraram que os linfócitos B CD19<sup>+</sup> apresentam naturalmente baixa expressão desse antígeno, e conseqüentemente a imunofenotipagem das

células B apoptóticas fica prejudicada. Outra hipótese é que essas células apresentam maior sensibilidade a variações de temperatura, como demonstrado por Paxton e Bendele <sup>38</sup>.

Após o descongelamento, houve uma diminuição significativa dos linfócitos T. Aggarwal e colaboradores <sup>39</sup> demonstraram que os linfócitos T do SCU morrem mais do que os do sangue periférico. Isto pode ser atribuído à baixa expressão de Bcl-2 ou baixa relação Bcl-2/Bax. Lecoeur e colaboradores <sup>31</sup> demonstraram que há uma diminuição na expressão de CD4 e CD8 quando as células entram em apoptose, o que dificulta sua identificação.

Os monócitos do SCU dão origem às células dendríticas imaturas, eles são fracamente estimulados pelas células T e menos suscetíveis a completar sua maturação, devido a um defeito na produção de IL-12, além de uma deficiência na capacidade de secretar interferon- $\gamma$ , sugerindo que os monócitos do SCU têm uma limitação intrínseca na diferenciação em células dendríticas totalmente maduras <sup>7</sup>.

Isso pode explicar a baixa incidência da doença do enxerto contra o hospedeiro nos transplantes de SCU. Assim, a manutenção da viabilidade dos monócitos e linfócitos durante o período analisado foi muito importante.

As células-tronco mesenquimais aparecem em pequena quantidade, apresentaram uma tendência à diminuição, mas se mantiveram viáveis. Sua presença é importante devido sua propriedade imunomoduladora e grande capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares. Seria necessário avaliar se elas mantêm a capacidade de proliferação e diferenciação neste período de 96 horas e após o descongelamento, embora Choudhery e

colaboradores <sup>17</sup> tenham demonstrado a manutenção dessa capacidade após o descongelamento dessas células.





# CONCLUSÕES





## **Conclusões específicas**

Artigo 1 - As células CD34<sup>+</sup> e os demais subtipos celulares analisados se mantiveram viáveis e funcionais após 96 horas de coleta mesmo quando mantidas em temperatura ambiente.

Artigo 2 - A análise do descongelamento destas células quando congeladas por um período de 6 meses demonstrou que elas se mantiveram viáveis e as células CD34<sup>+</sup> continuaram funcionais.

## **Conclusão geral**

As células-tronco CD34<sup>+</sup> mantiveram boa viabilidade e funcionalidade mesmo quando mantidas à temperatura ambiente por 96 horas após a coleta e também após o descongelamento, sugerindo que unidades de sangue de cordão umbilical poderiam ser coletadas em lugares mais distantes dos Bancos Públicos, podendo ser manipuladas mesmo até 4 dias após a coleta quando necessário. Os bancos poderiam se tornar fontes seguras de células-tronco para uso tanto na reconstituição da linhagem hematopoiética quanto na medicina regenerativa.





## REFERÊNCIAS GERAIS



## Referências

1. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of boné marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6:230-247.
2. Horwitz EM, Maziarz RT, Kebriaei P. MSCs in hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011; 17:S21-S29.
3. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med*. 2007 Nov; 262(5):509-25.
4. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012 Apr 25; 12(5):383-96.
5. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman H, Douglas GW, De Vergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321:1174-1178.
6. Kutzberg J, Gram. M, Casey J, Olson J, Stevens CE, Rubinstein P. The use of umbilical cord blood in mismatched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Clls*. 1994; 20:275-283.
7. Kim YJ, Broxmeyer HE. Immune regulatory cells in umbilical cord blood and their potential roles in transplantation tolerance. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011; 79:12-126.
8. Rocha V, Labopin M, Ruggeri A, et al. Outcomes after double cord blood transplant compared to single cord blood transplant in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2012; 120(21):242a.
9. Van Rood JJ, Stevens CE, Smits J, Carrier C, Carpenter C, Scaradavou A.

Reexposure of cord blood to noninherited maternal HLA antigens improves transplant outcome in hematological malignancies. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2009;106(47):19952-19957.

10. Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Blood*. 2013; 121(5):752-758.

11. Van Besien K. Advances in umbilical cord blood transplantation – a summary of the 11<sup>th</sup> International Cord Blood Symposium San Francisco June 6<sup>th</sup>-8<sup>th</sup> 2013. *Leuk Lymphoma*. 2013 Nov 3. [Epub ahead of print]

12. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013 Jul 25; 122 (4):491-498.

13. Flores-Guzmán P, Fernández-Sánchez V, Mayani H. Concise review: ex vivo expansion of cord blood-derived hematopoietic stem and progenitor cells: basic principles, experimental approaches, and impact in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Nov;(11):830-8.

14. Wang J, Gu Q, Hao J, Bai D, Liu L, Zhao X, Liu Z, Wang L, Zhou Q. Generation of induced pluripotent stem cells with high efficiency from human umbilical cord blood mononuclear cells. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013; 11:304-11.

15. Harris DT. Umbilical cord tissue mesenchymal stem cells: characterization and clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2013 Sep; 8(5):394-9.

16. Lafolla MAJ, Tay J, Allan DS. Transplantation umbilical cord blood-derived cells for novel indications in regenerative therapy or immune modulation: a scoping review of clinical studies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013. doi:pii: S1083-8791(13)00409-6.

10.1016/j.bbmt.2013.09.010. [Epub ahead of print]

17. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Harris DT. Utility of cryopreserved umbilical cord tissue for regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Sep; 8(5):370-80.

18. American Association of Blood Banks, Standards for cellular therapy product services, Second Ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks. 2007.

19. Net Cord Foundation for Accreditation of Cellular Therapy, Internal standards for cord blood collection, processing, testing, banking, selection and release, Third Ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks. 2006.

20. Cord Blood Collection, processing, testing, banking, selection and release. Accreditation Manual Fact/Netcord, 3<sup>rd</sup> ed. Version 3.1: December 2008.

21. International standards for cellular therapy product collection, processing and administration accreditation manual Fact/Netcord-Jacie, 4<sup>th</sup> ed. Version 4.1, July 2009.

22. Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44:635-42.

23. Picardi A, Arcese W. Quality assessment of cord blood units selected for unrelated transplantation: a transplant center perspective. *Transfus Apher Sci.* 2010; 42:289-97.

24. Querol S, Gomez SG, Pagliuca A, Torrabadella M, Madrigal JA. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45:970-8.

25. Helgason CD, Miller CL. *Methods in molecular biology*, vol.290. Totowa (NJ): Humana Press; 2005.

26. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, Balber AE,

Kurtzberg J. 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. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 1362-74.

27. Solomon M, Wofford J, Johnson C, Regan D, Creer MH. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion*. 2010 Apr; 50:820-30.

28. Pamphilon D, Curnow E, Belfield H, Reems JA, McMannis J, Lecchi L, Szczepiorkowski Z, McKenna D. Storage characteristics of cord blood progenitor cells: report of a multicenter study by the cellular therapies team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Transfusion*. 2011 Jun; 51:1284-90.

29. Xiao M, Dooley DC. Assessment of cell viability and apoptosis in human umbilical cord blood following storage. *J Hematother Stem Cell Res*. 2013 Feb; 12(1):115-22.

30. Castelhana MV, Reis-Alves SC, Vigorito AC, Rocha FF, Pereira-Cunha FG, De Souza CA, Lorand-Metze I. Quantifying loss of CD34<sup>+</sup> cells collected by apheresis after processing for freezing and post-thaw. *Transfus Apher Sci*. 2013; 48:241-46.

31. Lecoœur H, Ledru E, Prévost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J Immunol Methods*. 1997; 209:111-23.

32. Kessel A, Yehudai D, Peri R, Pavlotzky E, Bamberger E, Tov N, Toubi E. Increased susceptibility of cord blood B lymphocytes to undergo spontaneous apoptosis. *Clin Exp Immunol*. 2006; 145:563-70.

33. Durandy A, Thuillier L, Forveille M, Fischer A. Phenotypic and



functional characteristics of human newborns' B lymphocytes. *J Immunol.*1990; 144:60-5.

34. Hippen KL, Tze LE, Behrens TW. CD5 maintains tolerance in anergic B cells. *J Exp Med.* 2000; 191:883-90.

35. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-6.

36. Gary-Gouy H, Harriague J, Bismuth G, Platzer C, Schmitt C, Dalloul AH. Human CD5 promotes B-cell survival through stimulation of autocrine IL-10 production. *Blood.* 2002 Dec 5; 100(13):4537-43.

37. Borges-Almeida E, Milanez HM, Vilela MM, Cunha FG, Abramczuk BM, Reis-Alves SC, Metzke K, Lorand-Metze I. The impact of maternal HIV infection on cord blood lymphocyte subsets and cytokine profile in exposed non-infected newborns. *BMC Infect Dis.* 2011; 11:38.

38. Paxton H, Bendele T. Effect of time, temperature, and anticoagulant on flow cytometry and hematological values. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 677:440-3.

39. Aggarwal S, Gupta A, Nagata S, Gupta S. Programmed cell death (apoptosis) in cord blood lymphocytes. *J Clin Immunol.* 2005; 17:63-73.





# ANEXOS

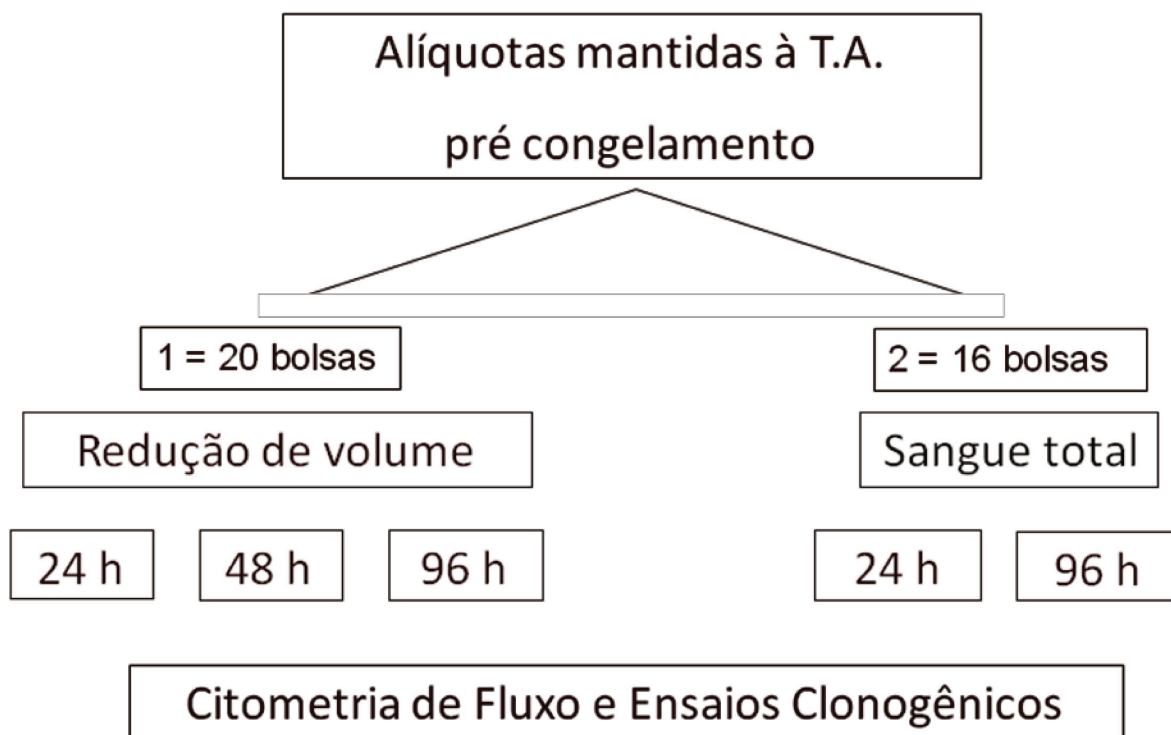


## Desenho do Estudo CAPÍTULO I:

As USCU doadas ao BSCUP da Unicamp que não contemplaram os critérios de inclusão (apresentando volume inferior a 70 mL e/ou celularidade inferior a  $8,0 \times 10^8$  células/mL) foram doadas para pesquisa.

Este estudo foi incluído em projeto anterior que foi submetido à apreciação do Comitê de Ética da FCM/ Unicamp; CAEE 0789.0.146000-08 processo nº 25000.034829/2009-83 com parecer CONEP 681/2009, onde a coleta de sangue de cordão já estava autorizada.

Esquema dos Experimentos 1 (redução de volume) e 2 (sangue total):



- Experimento 1: redução de volume - após acrescentar Plasmin (20% do volume da bolsa) e agitar por 30 min., a bolsa foi centrifugada à 59g por 8 min., para a retirada do plasma rico em leucócitos através do extrator de plasma. Outra centrifugação foi realizada à 1500g por 20 min., para a retirada do excesso de plasma, deste produto foi separada uma alíquota de 5 mL para a realização das imunofenotipagens em 24, 48 e 96 horas, 1,5 mL para cada período, mantidos à T.A.

- Experimento 2: sangue total - alíquota de 3 mL de sangue total para a realização das imunofenotipagens em 24 e 96 horas, 1,5 mL para cada período, mantidos à T.A.

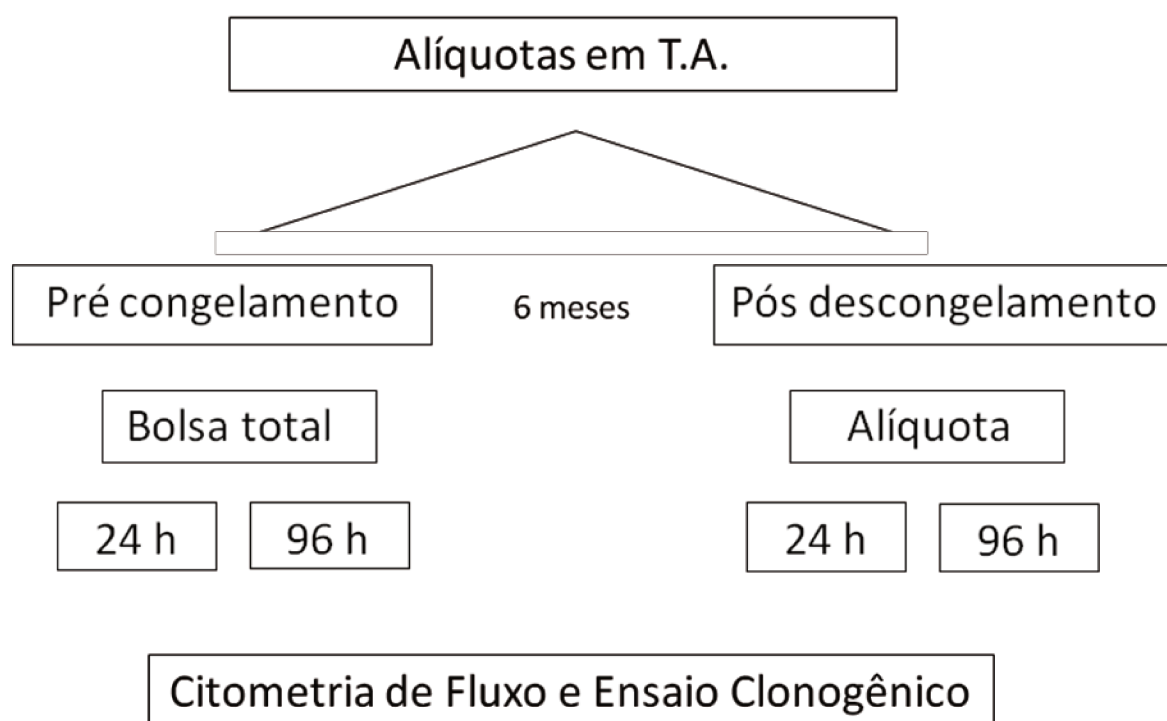
- Imunofenotipagem: 100 uL de amostra foram colocados em cada tubo com combinações de anticorpos monoclonais específicos para cada linhagem celular estudada, foram incubados por 20 minutos à T.A. no escuro, as hemácias foram lisadas com 2 mL de solução lisante por 15 minutos e as células foram centrifugadas com 2 mL de tampão PBS à 1500 rpm por 5 minutos, ressuspendidas em 500 uL e adquiridas em citômetro de fluxo.

- Alíquota de 4 mL para a realização dos ensaios clonogênicos (*CFU*) em 24 e 96 horas, 2 mL para cada período, mantidos à T.A., nos quais o sangue diluído em 6 mL de meio RPMI foi colocado em tubo com 4 mL de Ficoll-Hipaque e centrifugado por 30 minutos para separação das células mononucleares. Após essa centrifugação, a camada de células mononucleares foi separada e as células foram centrifugadas com tampão PBS por 2 vezes a 1500 RPM por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de tampão PBS. Uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL (experimento 1) e  $1 \times 10^4$  (experimento 2) foi diluída em 3 mL de meio semi-sólido de metilcelulose, da qual 1,5 mL foram incubados em um poço da placa contendo 6 poços. As células foram cultivadas à 37°C com umidade

>95% a 5% CO<sub>2</sub> por 14 dias. Após esse período as colônias foram contadas. Foram consideradas *CFU* as colônias que continham mais que 50 células e foram expressas em *CFCs/10<sup>5</sup> TNCs*. Esses experimentos foram realizados em duplicata.

## Desenho do Estudo CAPÍTULO II:

Esquema do Experimento 3 (pré e pós congelamento)



As bolsas foram subdivididas em:

- Alíquota de 3 mL para a realização das imunofenotipagens em 24 e 96 horas, 1,5 mL para cada período, mantidos à T.A., dos quais 100 uL de sangue total colocados em cada tubo com combinações de anticorpos monoclonais específicos para cada linhagem celular estudada, foram incubados por 20 minutos à T.A. no escuro, as hemácias foram

lisadas com 2 mL de solução lisante por 15 minutos e as células foram centrifugadas com 2 mL de tampão PBS à 1500 rpm por 5 minutos, ressuspensas em 500 uL e adquiridas em citômetro de fluxo.

- Alíquota de 4 mL para a realização dos ensaios clonogênicos (*CFU*) em 24 e 96 horas, 2 mL para cada período, mantidos à T.A., nos quais o sangue diluído em 6 mL de meio RPMI foi colocado em tubo com 4 mL de Ficoll-Hipaque e centrifugado por 30 minutos para separação das células mononucleares. Após essa centrifugação, a camada de células mononucleares foi separada e as células foram centrifugadas com tampão PBS por 2 vezes a 1500 RPM por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspensado em 1 mL de tampão PBS. Uma concentração de  $1 \times 10^4$  células/mL foi diluída em 3 mL de meio semi-sólido de metilcelulose, da qual 1,5 mL foram incubados em um poço da placa contendo 6 poços. As células foram cultivadas à 37°C com umidade >95% a 5% CO<sub>2</sub> por 14 dias. Após esse período as colônias foram contadas. Foram consideradas *CFU* as colônias que continham mais que 50 células e foram expressas em *CFCs/10<sup>5</sup> TNCs*. Esses experimentos foram realizados em duplicata.

- Alíquota de 20 mL para o congelamento em 24 e 96 horas. 10 mL de sangue foram centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm, em cada período, para depleção do plasma. Foi adicionada ao *pellet* de células uma solução criopreservante contendo 20% de meio RPMI e 10% de DMSO numa concentração final de 1:1. Foram congeladas 2 alíquotas de 1mL em criotubos através de congelamento programado, com diminuição gradativa da temperatura (1°C/min até -30°C, 5°C/min até -70°C e 10°C/min até -90°C). Os criotubos foram mantidos em nitrogênio líquido por 6 meses.



- O descongelamento das alíquotas foi realizado de maneira rápida em banho-Maria à 37°C e as amostras foram processadas imediatamente tanto para a realização da imunofenotipagem quanto para os ensaios clonogênicos.



Resolução RDC nº 56, 16 de dezembro de 2010.

Ementa: Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências.

Publicação: D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de dezembro de 2010

Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Alcance do ato: Federal – Brasil

Área de atuação: Sangue, outros Tecidos, Células e Órgãos

Resolução - RDC nº 56, de 16 de dezembro de 2010

### **Seção XIX**

#### **Requisitos específicos para qualificação de doador, processamento e uso de Células Progenitoras Hematopoéticas provenientes de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário para uso Alogênico não-aparentado (BSCUP)**

Art. 106 O banco de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico nãoaparentado deve seguir os critérios técnico-sanitários descritos nas Seções I a XVII do Capítulo II deste Regulamento bem como o disposto nesta Seção específica.

Art. 107 São candidatas à doação de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico não-aparentado as gestantes que satisfaçam pelo menos as seguintes condições:  
I - idade materna acima de 18 (dezoito) anos e que tenha se submetido há, no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas.

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

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

IV – trabalho de parto sem anormalidade; e

V – ausência de processo infeccioso e ou doença durante a gestação que possa(m) interferir na vitalidade placentária.

Art. 108 São critérios de desqualificação à doação de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico não-aparentado as seguintes condições:

I – sofrimento fetal grave;

II – feto com anormalidade congênita;

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

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

V – presença de processo infeccioso e ou doença durante o trabalho de parto, que possa(m) interferir na vitalidade placentária;

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

VIII – gestante com história pessoal de doença sistêmica auto-imune ou de neoplasia; ou

IX – gestante e seus familiares, pais biológicos e seus familiares ou irmãos biológicos do recém-nascido com história de doenças hereditárias do sistema hematopoético, tais como, talassemia, deficiências enzimáticas, esferocitose, eliptocitose, anemia de Fanconi, porfiria,

plaquetopatias, neutropenia crônica ou outras doenças de neutrófilos, bem como com história de doença granulomatosa crônica, imunodeficiência, doenças metabólicas ou outras doenças genéticas.

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

Art. 109 O BSCUP deve utilizar sistema de identificação de bolsas e amostras utilizando código de barras.

Art. 110 Um código de identificação único deve ser atribuído a cada unidade de sangue de cordão umbilical e placentário coletada, devendo ser colada uma etiqueta de código de barras com tal numeração nos seguintes locais:

I – no formulário que contém os dados do pré-natal, do parto e do recém-nascido;

II – no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

III – no formulário que contém os dados da coleta, acondicionamento, transporte, processamento, criopreservação e armazenamento do material e dos resultados dos testes laboratoriais realizados;

IV – em cada bolsa; e

V – nas alíquotas da mãe e do SCUP.

Art. 111 O sangue coletado deverá ser aceito para processamento quando o número total de células nucleadas na unidade for igual ou superior a  $5 \times 10^8$  (quinhentos milhões) de células nucleadas.

Parágrafo único. O BSCUP, de acordo com o definido por sua política de qualidade, pode decidir por aumentar o valor mínimo aceito para o processamento de unidades de sangue de cordão umbilical e placentário em suas instalações.

Art. 112 Os seguintes testes laboratoriais devem ser realizados na mãe, em uma primeira amostra de sangue colhida no dia do parto ou até 48 (quarenta e oito) horas após:

I – testes de triagem de infecções transmissíveis pelo sangue;

II – citomegalovírus - sorologia para a detecção de anticorpos totais e IgM;

III – toxoplasmose - sorologia para a detecção de anticorpos IgM; e

IV – teste para detecção de hemoglobinas anormais

Parágrafo único. Sempre que possível, repetir os testes de triagem de doenças transmissíveis em uma amostra de sangue materno, coletada após o segundo mês pós-parto, idealmente no sexto-mês pós-parto.

Art. 113 Os seguintes testes laboratoriais devem ser realizados na unidade de sangue de cordão umbilical e placentário, em alíquota coletada da unidade antes da criopreservação:

I – teste para detecção de hemoglobinas anormais;

II – tipagem de HLA-A, HLA-B e HLA-DR, conforme legislação específica vigente;

III – tipagem ABO e RhD;

IV – contagem do número total de células nucleadas e de eritoblastos;

V – contagem de células CD34 positivas;

VI – teste de viabilidade celular por citometria de fluxo;

§ 1 - É recomendável a contagem diferencial dos leucócitos e a quantificação de plaquetas, por meio de contagem automatizada. Estes parâmetros devem ser avaliados para exclusão de neutropenia, trombocitopenia /plaquetopatias e imunodeficiência congênitas.

Art. 114 São critérios de desqualificação da unidade de SCUP para uso alogênico nãoaparentado:

I – teste positivo para qualquer dos marcadores para infecções transmissíveis pelo sangue;

- II – teste positivo para citomegalovírus e ou toxoplasmose (anticorpos da classe IgM);
- III – teste microbiológico positivo;
- IV – presença de hemoglobinopatia congênita; ou
- V – número total de células nucleadas viáveis, determinado após o processamento da unidade e anteriormente a criopreservação, inferior a  $5 \times 10^8$  (quinhentos milhões) de células nucleadas, ou conforme definido pelo BSCUP de acordo com o estabelecido no parágrafo único do artigo 111 deste Regulamento.

Art. 115 A unidade de sangue de cordão umbilical e placentário somente deve ser liberada para uso pelo BSCUP:

§ 1º Após a realização de teste molecular para HIV/HCV, na amostra materna coletada no dia do parto ou até 48 horas após.

§ 2º Preferencialmente após um exame clínico na criança, após dois meses de idade, ou após obter informações sobre o estado de saúde da mesma, por contato telefônico com a família.

Estas informações devem ser registradas e arquivadas juntas aos outros documentos referentes à unidade em questão.

Art. 116 A criopreservação deve ser realizada submetendo a unidade de sangue de cordão umbilical e placentário ao congelamento sob variação controlada da temperatura em processo validado, e equipamento qualificado para este fim, devendo ser registradas e disponíveis para o serviço de transplante as seguintes informações:

- I – a variação de redução de temperatura;
- II – a concentração final de criopreservante;
- III – o fabricante e o número do lote da bolsa plástica utilizada para a criopreservação; e
- IV – a origem e o lote do criopreservante.

Art. 117 No mínimo duas alíquotas representativas de cada unidade de CPH, contendo células viáveis, devem ser criopreservadas e armazenadas em segmento contínuo à bolsa de criopreservação, conjuntamente e sob as mesmas condições da unidade de CPH correspondente, devendo estar disponíveis para os testes que antecedem o uso da mesma.

Art. 118 As seguintes alíquotas, no mínimo, devem ser armazenadas para testes futuros a temperatura igual ou inferior a 70 oC negativos:

- I – Alíquotas da unidade de CPH:
  - a) duas alíquotas de plasma; e
  - b) uma alíquota de DNA ou de células mononucleares viáveis.
- II – Alíquotas da amostra da mãe:
  - a) uma alíquota de soro ou plasma; e
  - b) uma alíquota de DNA ou de células mononucleares viáveis.

Parágrafo único. As alíquotas devem ser mantidas durante todo o período de armazenamento da unidade de CPH e, no mínimo, por doze meses após a sua utilização terapêutica, ou até o descarte da unidade.

Art. 119 Para a distribuição de uma unidade para o centro de transplante, o BSCUP deve cumprir os seguintes requisitos:

- I – providenciar a realização da tipificação de HLA em segmento contínuo à bolsa de criopreservação, por laboratório credenciado para este fim, conforme legislação específica vigente;

II – ter à disposição do centro de transplante e encaminhar, após solicitação, uma alíquota de DNA ou de células viáveis do sangue de cordão umbilical e placentário para realização de testes confirmatórios da identidade da amostra;

III – realizar nova contagem e determinação da viabilidade celular em alíquota da unidade de CPH; e

IV - avaliar a função da CPH por meio da quantificação do número de unidades formadoras de colônias granulocíticas-monocíticas (CFU-GM) ou da realização de teste funcional equivalente;

Parágrafo único. Os resultados e valores obtidos nos testes descritos nos incisos I a III deste artigo, bem como demais informações necessárias, devem ser fornecidos ao profissional responsável pelo paciente, conforme o artigo 66, parágrafo único, deste Regulamento.

Art. 120 O banco de sangue de cordão umbilical e placentário deve realizar e manter registros de avaliação anual da viabilidade celular de um percentual de unidades criopreservadas do seu inventário, definido no Manual Técnico Operacional.

## **Seção XXI**

### **Particularidades do Banco de Sangue de Cordão**

#### **Umbilical e Placentário para uso Autólogo (BSCUPA)**

Art. 125 O banco de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo deve seguir os critérios técnico-sanitários descritos nas Seções I a XVII do Capítulo II deste Regulamento, bem como o disposto nesta Seção.

Art. 126 A coleta, o acondicionamento, o processamento, a criopreservação, o armazenamento e o transporte das unidades de CPH de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo devem seguir os critérios técnico-sanitários descritos na Seção XIX, referentes ao sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico nãoaparentado, com exceção do disposto nesta Seção.

Art. 127 São candidatas à coleta de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo as gestantes que satisfaçam pelo menos as seguintes condições:

I – idade gestacional igual ou superior a 32 (trinta e duas) semanas;

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

III – trabalho de parto sem anormalidade; e

IV – ausência de evidências clínicas, durante a gestação, de processo infeccioso ou de doenças que possam interferir na vitalidade placentária.

Art. 128 São critérios de exclusão à doação de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo as seguintes condições:

I - sofrimento fetal grave;

II – evidência clínica de infecção aguda durante o trabalho de parto; ou

III - presença de evidências clínicas, durante o trabalho de parto, de doenças que possam interferir na vitalidade placentária

Art. 129 Testes laboratoriais, conforme o disposto no artigo 112 deste Regulamento, devem ser realizados em amostra da mãe, colhida no dia do parto ou até 48 (quarenta e oito) horas após.

Art. 130 Os seguintes testes laboratoriais devem ser realizados na unidade de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo, no produto final após processamento e anteriormente à criopreservação:

I – contagem do número total de células nucleadas e de eritroblastos;

II – fenotipagem celular quantificando células com marcador CD34 positivas;

III – teste de viabilidade celular; e

IV – testes para detecção de contaminação bacteriana, aeróbica e anaeróbica, e fúngica.

Art. 131 Os critérios de desqualificação das unidades de sangue de cordão umbilical e placentário para uso autólogo, no que se relaciona à presença de contaminação bacteriana e ou fúngica e à quantidade total de células nucleadas viáveis devem obedecer aos critérios estabelecidos para a desqualificação das unidades de sangue de cordão umbilical e placentário para uso alogênico não-aparentado dispostos nos incisos III e V do artigo 114 deste Regulamento.

Art. 132 Deve configurar decisão conjunta, entre o BSCUPA e os pais ou o representante legal do recém-nascido, o armazenamento de unidades com resultado reagente nos teste(s) sorológicos para:

I – HIV tipo 1 e HIV tipo 2;

II – HTLV tipo I e HTLV tipo II;

III – Vírus da Hepatite B;

IV – Vírus da Hepatite C;

III – Doença de Chagas;

IV – Sífilis;

V- Citomegalovirus (IgM); e

VI – Toxoplasmose (IgM).

Art. 133 No mínimo, as seguintes alíquotas devem ser armazenadas para testes futuros:

I - uma alíquota de DNA ou de células mononucleares viáveis da unidade de CPH; e

II – uma alíquota de soro ou plasma de amostra da mãe.

Parágrafo único. As alíquotas devem ser mantidas durante todo o período de armazenamento

da unidade de CPH no mínimo por doze meses após a sua utilização terapêutica ou até o descarte da unidade.

Art. 134 Para a distribuição de uma unidade para o centro de transplante, o BSCUP deve cumprir os seguintes requisitos:

I – ter à disposição do centro de transplante e encaminhar, após solicitação, uma alíquota de DNA ou de células viáveis do sangue de cordão umbilical e placentário para realização de testes confirmatórios da identidade da amostra; e

II – realizar nova contagem do número total de células nucleadas e de eritroblastos e determinar a viabilidade celular, em alíquota da unidade de CPH armazenada;

§ 1º Os resultados e valores obtidos nos testes descritos no inciso II deste artigo, bem como demais informações necessárias, devem ser fornecidos ao profissional responsável pelo paciente, conforme estabelecido pelo artigo 66, parágrafo único, deste Regulamento.

§ 2º A alíquota de células viáveis de CPH do sangue de cordão umbilical e placentário utilizada para os exames mencionados no inciso II deste artigo deve estar armazenada em segmento contínuo à bolsa de criopreservação, conjuntamente e sob as mesmas condições da unidade de CPH correspondente.

Assinado por:

Dirceu Raposo de Mello





## RESOLUÇÃO - RDC Nº 9, DE 14 DE MARÇO DE 2011.

Dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências.

A Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária no uso da atribuição que lhe confere o inciso IV do o art. 11 do Regulamento aprovado pelo Decreto n.º 3.029, de 16 de abril de 1999, e tendo em vista o disposto no inciso II e nos §§ 1º e 3º do Art. 54 do Regimento Interno aprovado nos termos do Anexo I da Portaria no 354 da Anvisa, de 11 de agosto de 2006, republicada no DOU de 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 3 de março de 2011, adota a seguinte Resolução da Diretoria Colegiada e eu, Diretora-Presidente Substituta, determino a sua publicação:

Art. 1º Fica aprovada a presente Resolução que estabelece os requisitos mínimos para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular (CTC) de células humanas e seus derivados para fins de pesquisa clínica e/ou terapia.

Parágrafo único. Para os fins desta Resolução, entende-se como células humanas as células somáticas, células germinativas, células-tronco adultas, células-tronco embrionárias e células-tronco pluripotentes induzidas.

### CAPÍTULO I

#### DAS DISPOSIÇÕES INICIAIS

##### Seção I

##### Objetivo

Art. 2º Esta Resolução possui o objetivo de estabelecer requisitos técnico-sanitários mínimos para a coleta, processamento, acondicionamento, armazenamento, testes de controle de qualidade, descarte, liberação para uso e transporte de células humanas e seus derivados visando à segurança e à qualidade das células e de seus derivados disponibilizados para pesquisa clínica e terapia.

##### Seção II

##### Abrangência

Art. 3º Esta Resolução se aplica a todos os estabelecimentos, públicos ou privados, que realizem atividades com células humanas e seus derivados com finalidade de pesquisa clínica e/ou terapia.

§ 1º Excluem-se desta Resolução os estabelecimentos que utilizem células humanas e seus derivados em pesquisa básica e pré-clínica.

§ 2º A coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de células-tronco hematopoéticas obtidas de medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão-umbilical e placentário com finalidade de transplante convencional de células progenitoras hematopoéticas, deve seguir o determinado pela RDC n.º 56 de 16 de dezembro de 2010, da Anvisa, ou a legislação que vier a substituí-la.

§ 3º A coleta, o transporte, o registro, o processamento, o armazenamento, o descarte e a liberação de células germinativas, tecidos germinativos e embriões humanos com finalidade de reprodução humana assistida deve seguir o determinado pela RDC n.º 33 de 17 de fevereiro de 2006, da Anvisa, ou pela legislação que vier a substituí-la.

##### Seção III

##### Definições

Art. 4o Para os efeitos desta Resolução, considera-se

I- alvará sanitário/licença de funcionamento/licença sanitária: documento expedido pelo órgão sanitário competente Estadual, Municipal ou do Distrito Federal, que autoriza o funcionamento dos estabelecimentos que exerçam atividades sob regime de vigilância sanitária;

II- ambiente: espaço fisicamente determinado e especializado para o desenvolvimento de determinada(s) atividade(s), caracterizado por dimensões e instalações diferenciadas, podendo constituir-se de uma sala ou de uma área;

III- ante-câmara: área contígua à sala de processamento que garanta o acesso exclusivo de pessoas a esta.

IV- aplicação humana: utilização de tecidos ou células, inclusive seus derivados, como aplicação, infusão, implante ou transplante em um receptor humano;

V- área: ambiente aberto, sem paredes em uma ou mais de uma das faces;

VI- Banco de Células e Tecidos Germinativos (BCTG): serviço de saúde destinado a selecionar, coletar, transportar, registrar, processar, armazenar, descartar e liberar células, tecidos germinativos e embriões, para uso próprio ou em doação;

VII- biossegurança: condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente;

VIII- contagem de células: determinação do número total de células nucleadas por sistema manual ou automatizado, validados e registrados em instruções escritas e atualizadas;

IX- células somáticas: células diferenciadas adultas;

X- células-tronco humanas: célula de origem humana que possuem a capacidade de se auto-renovar por longos períodos de tempo e de se diferenciar ao receber estímulos específicos;

XI- células-tronco adultas (CTA): células-tronco originadas a partir de diferentes órgãos e tecidos, depois do nascimento do indivíduo (post partum), incluindo os anexos extra-embriônicos (placenta e cordão umbilical);

XII- células-tronco embrionárias (CTE): células de embrião pré-implantação que apresentam a capacidade de se transformar em células de qualquer tecido de um organismo;

XIII- células-tronco pluripotentes induzidas (CTPi): células criadas a partir de reprogramação de células somáticas, de CTA ou de qualquer outro tipo de célula humana;

XIV- Centros de Tecnologia Celular (CTC): serviço que, com instalações físicas, recursos humanos, equipamentos, materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro e metodologias, realiza atividades voltadas à utilização de células humanas, inclusive seus derivados, em pesquisa clínica e/ou terapia;

XV- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/ MS): instância colegiada e independente, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde;

XVI- Comitês de Ética em Pesquisa (CEP): colegiados interdisciplinares e independentes, com munus público, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos;

XVII- controle genético: controle que utiliza método para identificação de anomalias cromossômicas numéricas e/ou estruturais dos cromossomos humanos, com atenção adequada à representatividade estatística amostral do teste;

- XVIII- cultivo celular: manutenção de células in vitro em condições ambientais adequadas em meios de cultivo apropriados;
- XIX- derivados de células humanas: componentes celulares, moléculas produzidas e secretadas e matrizes orgânicas mineralizadas ou não;
- XX- Estabelecimentos Assistenciais de Saúde (EAS): qualquer edificação destinada à prestação de assistência à saúde da população, em regime de internação ou não, qualquer que seja seu nível de complexidade;
- XXI- expansão celular (in vitro): cultivo de células em condições ambientais ideais para obtenção de uma massa celular suficiente para utilização em procedimentos de pesquisa clínica e/ou de terapias;
- XXII- fenotipagem celular: identificação molecular, percentual, que indica a homogeneidade ou heterogeneidade das amostras de células a serem disponibilizadas;
- XXIII- garantia da qualidade: conjunto de atividades planejadas, sistematizadas e implementadas com o objetivo de cumprir os requisitos da qualidade especificados;
- XXIV- liberação para uso: entrega das células humanas e seus derivados, em condições de segurança e qualidade apropriadas para pesquisa clínica e/ou terapia, conforme previsto no artigo 60 desta Resolução, ao profissional legalmente habilitado responsável pelo seu uso;
- XXV- manipulação a fresco: manipulação de células e/ou derivados, autólogas ou alogênicas, não submetidas à expansão celular e cultivo celular;
- XXVI- manipulação mínima: processamento de material biológico que não altera de maneira relevante as características originais das células relacionadas ao seu uso, consistente apenas em cortar, moer, moldar, colocar em soluções antibióticas, irradiar, separar células, centrifugar ou purificar, filtrar, congelar e criopreservar para fins de reconstrução, reparo ou substituição;
- XXVII- manipulação extensa: todo processamento de material biológico que não configure manipulação mínima;
- XXVIII- materiais passíveis de processamento: produtos para saúde fabricados a partir de matérias primas e com conformação estrutural que permitem um conjunto de ações relacionadas à limpeza, à secagem, à desinfecção, à esterilização e ao armazenamento, entre outras, e que não perdem a sua eficácia e funcionalidade após usos múltiplos;
- XXIX- material biológico humano: fluidos corporais, células, tecidos, excrementos, órgãos ou outros fluidos de origem humana ou isolados a partir destes;
- XXX- metodologia própria executada em laboratório (in house): reagentes ou sistemas analíticos produzidos e validados pelo próprio Centro de Tecnologia Celular, exclusivamente para uso próprio, em pesquisa clínica ou em terapia;
- XXXI- pesquisa clínica: estudo sistemático que segue métodos científicos aplicáveis a experimentações com células humanas e seus derivados em seres humanos, de acordo com exigências legais e éticas;
- XXXII- produto para a saúde: produto que se enquadra em pelo menos uma das duas categorias descritas a seguir:
- a) produto médico - equipamento, aparelho, material, artigo ou sistema de uso ou aplicação médica ou laboratorial, destinado à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo, entretanto, ser auxiliado em suas funções por tais meios;

b) produto para diagnóstico de uso in vitro - reagentes, padrões, calibradores, controles, materiais, artigos e instrumentos, junto com as instruções para seu uso, que contribuem para realizar uma determinação qualitativa, quantitativa ou semi-quantitativa de uma amostra proveniente do corpo humano e que não estejam destinados a cumprir alguma função anatômica, física ou terapêutica, que não sejam ingeridos, injetados ou inoculados em seres humanos e que são utilizados unicamente para prover informação sobre amostras obtidas do organismo humano;

XXXIII- profissional legalmente habilitado: profissional com formação de nível superior inscrito no respectivo Conselho de Classe, com suas competências atribuídas por Lei;

XXXIV- rastreabilidade: capacidade de recuperação do histórico, da aplicação ou da localização daquilo que está sendo considerado, por meio de identificações registradas;

XXXV- Responsável Técnico (RT): profissional legalmente habilitado que assume a responsabilidade técnica do CTC perante a vigilância sanitária;

XXXVI- sala: ambiente delimitado por paredes em todo seu perímetro e uma porta;

XXXVII- terapia: qualquer processo terapêutico que utiliza células humanas ou seus derivados;

XXXVIII- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE): termo de consentimento através do qual o sujeito da pesquisa e/ou de seu representante legal expressa anuência, autorizando sua participação voluntária na pesquisa, livre de vícios (simulação, fraude ou erro), dependência, subordinação ou intimidação, após explicação completa e pormenorizada sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que ela possa acarretar;

XXXIX- teste funcional: teste que visa verificar e garantir a presença da capacidade funcional e/ou proliferativa de células humanas e de seus derivados;

XL- teste microbiológico: teste realizado conforme legislação vigente, visando à detecção de agentes microbiológicos a partir de uma alíquota da amostra a ser disponibilizada;

XLI- teste de pirogenicidade: teste que visa verificar a presença de pirogênios na amostra de material biológico;

XLII- transplante convencional de células progenitoras hematopoéticas: expressão utilizada em substituição à expressão "transplante de medula óssea" para designar o tipo de terapia celular que utiliza da infusão de células progenitoras hematopoéticas, com o objetivo de obter enxerto transitório ou permanente para correção de defeito quantitativo ou qualitativo da medula óssea, ou ainda restaurar a hematopoese após quimioterapia mieloablativa para tratamento de diversas doenças;

XLIII- uso alogênico: utilização em pesquisa clínica e/ou terapia de células e seus derivados provenientes de outro indivíduo (doador), aparentado ou não;

XLIV- uso autólogo: utilização em pesquisa clínica e/ou terapia de células e seus derivados provenientes do próprio indivíduo a ser transplantado (paciente);

XLV- validação: procedimento que fornece evidências de que um sistema apresenta desempenho dentro das especificações da qualidade, de maneira a gerar resultados válidos;

XLVI- vestiário de barreira: vestiário que deve possuir um lavatório e servir de barreira à sala de processamento, de forma a assegurar o acesso dos profissionais portando roupas de uso exclusivo; e

XLVII- viabilidade celular: determinação do número total de células nucleadas vivas por meio de um sistema manual ou automatizado, validado e registrado em instruções escritas e atualizadas.

## Capítulo II

### Dos Aspectos Gerais

Art. 5º Os Centros de Tecnologia Celular são responsáveis por todos os procedimentos relacionados ao preparo das células humanas e seus derivados, para o uso em pesquisa clínica e/ou terapia, incluindo coleta, processamento, acondicionamento, armazenamento, testes de controle de qualidade das células, descarte, liberação para uso e transporte.

Parágrafo único. As atividades relacionadas no caput são, em regra, exclusivas dos CTC, permitindo-se a terceirização, todavia, somente das atividades de coleta, testes de triagem laboratorial, testes de controle de qualidade das células e transporte

Art. 6º Caso o CTC realize pesquisa básica ou pré-clínica, estas devem ser realizadas em salas separadas de onde são realizados o processamento e manipulação de células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia.

Parágrafo único. As salas devem estar dispostas a permitir a circulação de pessoas com fluxos independentes de materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro, material biológico, resíduos, de modo que não ocorra o cruzamento de fluxos entre as salas de pesquisa básica e pré-clínica e as salas de pesquisa clínica e/ou terapia.

Art. 7º Células humanas e seus derivados só poderão ser disponibilizados para pesquisa clínica e/ou terapia pelos CTCs, mediante a comprovação de aprovação da pesquisa clínica pelo sistema CEP/CONEP ou comprovação de que o procedimento terapêutico é autorizado pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) ou Conselho Federal de Odontologia (CFO).

Art. 8º O CTC deve apresentar licença de funcionamento, licença sanitária ou alvará sanitário, atualizada(o) e emitida(o) pelo órgão de vigilância sanitária competente, de acordo com o disposto no parágrafo único do artigo 10 da Lei n. 6.437, de 20 de agosto de 1977, salvo disposições legais estaduais ou municipais complementares.

Parágrafo único. O serviço de saúde que incluir em suas instalações um CTC pode solicitar a inclusão da descrição desta atividade em sua licença de funcionamento, licença sanitária ou alvará sanitário, cabendo ao órgão de vigilância sanitária competente a deliberação sobre esta solicitação.

## CAPÍTULO III

### DAS DISPOSIÇÕES TÉCNICAS

#### Seção I

##### Da Classificação e das Atividades

Art. 9º Os CTCs podem ser classificados como:

I - CTC tipo 1: estabelecimento que realiza atividades somente com células humanas adultas, autólogas, a fresco ou criopreservadas, sem cultivo, apenas com manipulação mínima para uso em pesquisa clínica e/ou terapia.

II - CTC tipo 2: estabelecimento que realiza atividades com células-tronco humanas embrionárias ou adultas, autólogas ou alogênicas, a fresco ou criopreservadas, com ou sem cultivo, com ou sem manipulação extensa para uso em pesquisa clínica e/ou terapia

§1º O CTC tipo 1 está apto somente para processar ou criopreservar células humanas e seus derivados coletados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia que, sabidamente, não necessitem de posterior expansão, necessitem apenas de manipulação mínima e que sejam, Indubitavelmente, para uso autólogo.

§2º São atividades executadas pelo CTC tipo 1:

I - coletar ou orientar a coleta de material biológico;

II - criopreservar e armazenar células humanas adultas e seus derivados;

- III - receber e, quando necessário, providenciar a triagem clínica e laboratorial do paciente;
- IV - avaliar a qualidade do material biológico recebido ou coletado;
- V - processar o material biológico;
- VI - realizar ou providenciar os testes necessários para liberação do material conforme artigo 60 desta Resolução;
- VII- prover células humanas adultas e seus derivados para pesquisa clínica e/ou terapia, fornecendo as informações necessárias;
- VIII- prover orientação escrita referente à manipulação, acondicionamento e validade das células humanas adultas e seus derivados disponibilizados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia;
- IX- realizar ou providenciar o transporte de forma a garantir a integridade do material biológico; e
- X- manter registro que permita a rastreabilidade das células humanas adultas e seus derivados, desde a coleta até o uso.

§3o Além das atividades mencionadas no parágrafo anterior para o CTC tipo 1, o CTC tipo 2 poderá ainda:

- I - manter cultura com o intuito de expandir ou diferenciar as células humanas adultas;
- II - realizar extensão de cultura de embriões humanos até o estágio de blastocisto;
- III - transportar embriões e células-tronco embrionárias humanas;
- IV - receber e armazenar embriões que foram disponibilizados para a pesquisa clínica e terapia;
- V - realizar a indução para diferenciação de células-tronco embrionárias;
- VI - realizar a reprogramação de células humanas para células pluripotentes induzidas (CTPi);
- VII- criopreservar, armazenar, manipular e processar célulastronco humanas embrionárias e CTPi;
- VIII- prover células humanas e seus derivados para pesquisa clínica e/ou terapia fornecendo as informações necessárias, respeitando o sigilo da doação; e
- IX- prover orientação escrita referente à manipulação, ao acondicionamento e à validade das células e seus derivados disponibilizados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia.

## Seção II

### Do Regimento Interno

Art. 10 O CTC deve ter um regimento interno no qual constem os seguintes itens:

- I - finalidade;
- II - organograma, descrevendo a estrutura administrativa e técnico-científica do CTC, com definição do responsável legal e do responsável técnico (as funções de responsável legal e responsável técnico poderão ser exercidas pelo mesmo profissional); e
- III - relação nominal, acompanhada da correspondente assinatura de todo o pessoal administrativo e técnico-científico, indicando a qualificação, as funções e as responsabilidades do responsável técnico e dos demais profissionais do CTC.

Parágrafo único. A manutenção e atualização da relação prevista no inciso III do caput são atribuições do responsável técnico do CTC.

## Seção III

### Do Manual Técnico Operacional

Art. 11. O CTC deve possuir um Manual Técnico Operacional que defina detalhadamente todos os procedimentos para coleta, processamento, controle de qualidade,

acondicionamento, armazenamento, liberação para uso, transporte e descarte de células humanas e seus derivados, sob a forma de instruções escritas e atualizadas.

Art. 12. O manual mencionado no artigo anterior deve se encontrar acessível, a qualquer momento, a todos os funcionários e estar presente, nas formas impressa e eletrônica, nos respectivos setores do laboratório.

Parágrafo único. Caso o CTC utilize a forma eletrônica, deve existir pelo menos uma cópia impressa disponível no serviço.

Art. 13. O manual deve ainda:

I - ser revisado anualmente e sempre que houver alguma modificação;

II - ser assinado e datado pelo responsável técnico do CTC;

III - indicar o profissional responsável por cada procedimento;

IV - conter as condutas frente às não-conformidades; e

V - descrever as normas de biossegurança a serem seguidas por todos os funcionários.

Seção V

Da Estrutura Administrativa e Técnico-Científica

Art. 14. O CTC deve possuir equipe profissional com formação e qualificação compatível com suas atividades.

Art. 15. O CTC deve manter disponíveis registros de formação e qualificação de seus profissionais compatíveis com as funções desempenhadas.

Art. 16. O CTC deve promover treinamento e educação permanente de seus funcionários mantendo disponíveis os registros dos mesmos.

Art. 17. A responsabilidade técnica deve ficar a cargo de profissional de nível superior, com mestrado ou doutorado na área de saúde ou ciências biológicas, e experiência mínima de 5 (cinco) anos em biologia celular e/ou molecular e com registro no respectivo conselho de classe.

§1º O CTC deve possuir um responsável técnico substituto com a mesma qualificação profissional do responsável técnico.

§2º O tempo de mestrado e/ou doutorado na área de biologia celular e/ou molecular poderá ser contado como tempo de experiência profissional.

Art. 18. O responsável técnico pode possuir, perante a vigilância sanitária, a responsabilidade por no máximo 1 (um) CTC.

Seção V

Da Garantia da Qualidade

Art. 19. O responsável técnico do CTC tem a responsabilidade de planejar, implementar e garantir a qualidade dos processos, que inclui:

I - a manutenção da equipe técnica e recursos necessários para o desempenho de suas atribuições;

II - a proteção das informações confidenciais das amostras;

III - a supervisão do pessoal técnico por profissional de nível superior legalmente habilitado durante o seu período de funcionamento;

IV - a qualificação e verificação dos equipamentos, dos instrumentos e dos materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro utilizados, antes de serem colocados em uso;

V - a utilização de técnicas conforme recomendações do fabricante (equipamentos e produtos) ou, quando couber, conforme validação realizada pelo CTC;

VI - a adoção de procedimentos para detecção, registro, correção e prevenção de erros e não conformidades, incluindo a realização de controle de qualidade interno do CTC; e  
VII - a implementação e manutenção da rastreabilidade de todos os seus processos.

Art. 20. O CTC deve dispor de instruções escritas e atualizadas das rotinas técnicas implantadas.

#### Seção VI

##### Da Biossegurança

Art. 21. O CTC deve manter atualizado e disponibilizar, a todos os funcionários, instruções escritas de biossegurança, contemplando no mínimo os seguintes itens:

I - normas e condutas de segurança biológica, química, física, ocupacional e ambiental;

II - instruções de uso para os equipamentos de proteção individual (EPI) e de proteção coletiva (EPC);

III - procedimentos em caso de acidentes; e

IV - manuseio de transporte de material e amostra biológica.

Art. 22. O responsável técnico pelo CTC deve documentar o nível de biossegurança dos ambientes e áreas com base nos procedimentos realizados e equipamentos utilizados, adotando as medidas de segurança compatíveis.

#### Seção VII

##### Dos Materiais, Reagentes e Produtos para Diagnóstico de Uso in vitro

Art. 23. Os materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro utilizados para coleta, processamento, testes laboratoriais, preservação e expansão de células-tronco humanas e seus derivados devem estar regularizados junto à Anvisa, de acordo com a legislação específica vigente.

Art. 24. Todos os materiais, reagentes e produtos para diagnóstico in vitro utilizados e que mantêm contato com as células e seus derivados, devem ser estéreis, apirogênicos, não citotóxicos e, quando couber, de uso único, bem como devem ter a origem, a validade e o número do lote registrados, a fim de garantir a rastreabilidade.

Parágrafo único. Para os materiais passíveis de processamento deve existir um procedimento de limpeza e esterilização validado, de acordo com a legislação vigente.

Art. 25. Os reagentes preparados ou aliqüotados pelo próprio laboratório devem ser identificados com rótulo contendo: nome, concentração, número de lote (se aplicável), data de preparação, identificação de quem preparou (quando aplicável), data de validade, condições de armazenamento, além de informações referentes a riscos potenciais.

Parágrafo único. Devem ser mantidos registros dos processos de preparo e do controle da qualidade dos reagentes preparados.

Art. 26. A utilização de materiais, reagentes e produtos para diagnóstico de uso in vitro deve respeitar as recomendações de uso do fabricante, condições de preservação, a armazenamento e os prazos de validade, não sendo permitida a sua revalidação depois de expirada a validade.

Art. 27. O CTC que utilizar metodologias próprias - in house, deve documentá-las incluindo no mínimo:

I - a descrição das etapas do processo;

II - a especificação e a sistemática de aprovação de materiais, reagentes e produtos para diagnóstico in vitro, de equipamentos e de instrumentos;

III - a sistemática de validação; e

IV - o registro de todo o processo.



Art. 28. A utilização de produtos de origem animal deve ser evitada.

§1º Se utilizados produtos de origem animal, estes devem possuir certificação de ausência de agentes infecciosos e contaminantes.

§2º Para fatores de crescimento, devem ser estabelecidas medidas de identidade, pureza e potência para assegurar reprodutibilidade das características da cultura celular.

## Seção VIII

### Dos Equipamentos

Art. 29. O CTC deve cumprir os seguintes requisitos relativos aos equipamentos:

I - possuir equipamentos e instrumentos específicos e em quantidade necessária ao atendimento de sua demanda;

II - manter instruções escritas e atualizadas referentes ao uso dos equipamentos disponíveis aos funcionários do setor, as quais devem ser complementadas por manuais do fabricante em língua portuguesa;

III - manter e implementar um programa de manutenção preventiva e corretiva, onde conste um cronograma de intervenção;

IV - manter os equipamentos de medição calibrados e os respectivos registros; e

V - manter registros da origem e série dos equipamentos utilizados a fim de garantir a rastreabilidade.

Parágrafo único. Na hipótese descrita no inciso III deste artigo, todas as intervenções realizadas nos equipamentos devem ser registradas sistematicamente, informando dia, responsável pela intervenção, descrição da intervenção e, em caso de substituição de peças, lista das peças substituídas.

Art. 30. Os equipamentos e instrumentos utilizados, nacionais e importados, devem estar regularizados junto à Anvisa, de acordo com a legislação vigente.

Art. 31. As planilhas de controle das rotinas de uso e manutenção dos equipamentos devem ficar permanentemente disponíveis para consulta.

Art. 32. Deve ser mantido registro diário das condições dos equipamentos, refrigeradores, congeladores ou reservatórios de armazenamento, documentando a temperatura, o nível de CO<sub>2</sub> (para incubadora) e o nível de nitrogênio.

§ 1º A verificação e o registro da temperatura e do nível de CO<sub>2</sub>, quando couberem, devem ser realizados a intervalos definidos pelo CTC para os equipamentos que não dispõem de registrador automático.

§ 2º Os registros devem ser assinados e periodicamente revisados por uma pessoa qualificada.

§ 3º Os alarmes devem ser testados.

§4º Deve haver um procedimento escrito, definindo a conduta a ser tomada em relação ao armazenamento das amostras caso haja defeito nos equipamentos de estocagem.

§ 5º O volume de nitrogênio líquido, nos reservatórios deve ser controlado e registrado na frequência definida pelo CTC.

## Seção IX

### Da Infra-estrutura física mínima

Art. 33. A infra-estrutura física do CTC deve, no que couber, atender ao disposto no regulamento técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde, aprovado pela RDC Anvisa nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, ou a que vier a substituí-la, bem como às exigências específicas contidas nesta Resolução e demais normas vigentes.

Parágrafo único. O CTC deve possuir sistema emergencial de energia elétrica, conforme previsto na RDC Anvisa nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, ou a que vier a substituí-la, devendo ainda observar as instruções do fabricante dos equipamentos com relação a exigências de uso de "no-breaks".

Art. 34. A infra-estrutura física do CTC deve ser de uso e acesso exclusivo para tal finalidade, devendo ser constituída por ambientes numa disposição que permita circulação com fluxo independente de insumos, material biológico, profissionais e resíduos, permitindo a limpeza e a manutenção, com a finalidade de garantir a qualidade das células humanas e seus derivados em todas as fases do processo.

Art. 35. A construção, a reforma ou a adaptação na estrutura física do CTC deve ser precedida de aprovação do projeto junto à autoridade sanitária local.

Art. 36. O CTC deve realizar controle microbiológico de seus ambientes, equipamentos (incubadora de CO<sub>2</sub>) e meios de cultura, quando couber.

§ 1º Caso haja manipulação dos meios de cultura (aliquotagem, adição de componentes) previamente registrados ou cadastrados pela Anvisa, o controle microbiológico dos mesmos deve ser realizado.

§ 2º O controle microbiológico dos ambientes e da incubadora de CO<sub>2</sub> deverá ser realizado em intervalos de tempo definidos pelo CTC, a depender do fluxo de trabalho.

#### Seção X

##### Da Seleção do doador e/ou paciente

Art. 37. A doação de células humanas para uso em pesquisa clínica ou terapia deve respeitar os preceitos legais e éticos sobre o assunto, ficando garantido o sigilo, a não percepção de remuneração ou de benefício direto, e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme legislação vigente.

Art. 38. Para obtenção de células humanas, seja para uso autólogo ou para uso alogênico, o CTC deve realizar triagem clínica e laboratorial.

Parágrafo único. A triagem laboratorial deve seguir aquela determinada para a doação de sangue, conforme legislação vigente.

Art. 39. Para obtenção de embriões ou células-tronco embrionárias, devem ser seguidos os critérios da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, e devem ser obtidas as informações de triagem clínica e laboratorial realizadas pelo Banco de Células e Tecidos Germinativos (BCTG), conforme disposto em Regulamento técnico para o funcionamento dos BCTG.

Art. 40. O serviço responsável pela seleção do doador e/ou paciente deve prover todas as informações relativas ao processo de doação, riscos envolvidos, testes laboratoriais, entre outras necessárias para compreensão e assinatura do TCLE, o qual deve ser redigido em linguagem clara e compreensível para o leigo devendo conter, quando couber, os seguintes itens:

I - informações sobre os riscos ao doador e benefícios ao receptor da doação;

II - informações sobre os testes que serão realizados para a qualificação do doador;

III - autorização para acesso aos dados clínicos e à história médica do doador para obtenção de dados clínicos com importância potencial para o procedimento de pesquisa clínica e/ou terapia;

IV - autorização para o CTC transferir os dados qualitativos e quantitativos sobre o material para o responsável pela pesquisa clínica e/ou terapia;

V - autorização para armazenar amostras de células, plasma, soro e DNA do doador para testes que se fizerem necessários no futuro;

VI - autorização para descartar as unidades que não atenderem aos critérios para armazenamento ou seu uso posterior em pesquisa clínica e/ou terapia.

§ 1º Em qualquer momento do processo, o doador tem o direito de desistir da doação.

§ 2º No caso de doador com idade inferior a 18 anos ou mentalmente incapacitado, o TCLE deve ser firmado pelos pais ou responsável legal.

Art. 41. O uso de células humanas e seus derivados para doação que não preencha integralmente os critérios de qualificação dependerá de avaliação e decisão conjunta entre o responsável pela pesquisa clínica e/ou terapia, a equipe médica do serviço onde será feita a aplicação das células e seus derivados, o doador e o receptor ou seus responsáveis legais.

Art. 42. São critérios de exclusão do candidato à doação de células humanas para uso alogênico:

I- infecção confirmada pelos vírus HIV-1/2;

II- teste HBsAg não reagente com anti-HBc reagente, exceto quando o doador for anti-HBs reagente;

III- teste HBsAg reagente, exceto quando o receptor também for HBsAg reagente;

IV- teste anti-HCV reagente, exceto quando o receptor também apresentar teste reagente na pesquisa qualitativa de RNA-HCV;

V- doença neoplásica maligna, exceto carcinoma basocelular de pele e carcinoma "in situ" de colo de útero;

VI- condição clínica irreversível que coloque em risco a saúde do doador;

VII- gestação em curso;

VIII- condição clínica reversível que coloque em risco a saúde do doador; como os critérios de desqualificação temporária definidos para doação de sangue, conforme legislação específica vigente.

§ 1º Consideram-se critérios definitivos de exclusão do doador de células humanas e seus derivados para uso alogênico as condições previstas nos incisos I a VI do "caput" deste artigo.

§ 2º Consideram-se critérios temporários de exclusão do doador de células humanas e seus derivados para uso alogênico não aparentado as condições previstas nos incisos VII a VIII do "caput" deste artigo.

Seção XI

Da Coleta

Art. 43. A coleta de material biológico para posterior processamento de células humanas e seus derivados, seja para uso alogênico ou autólogo, deve ser realizada por profissional devidamente capacitado para tal atividade.

Art. 44. A coleta deve ser realizada no próprio CTC ou em estabelecimento assistencial de saúde que possua licença sanitária, quando couber, devendo ser mantidas as condições assépticas necessárias.

Art. 45. O CTC deve manter cadastro dos serviços e dos profissionais dos quais receberá material biológico para processamento.

Art. 46. Condições específicas da coleta devem estar descritas pelo CTC em instruções escritas e atualizadas.

Art. 47. As células humanas e seus derivados ou o material biológico de onde serão obtidos, quando não coletados pela equipe do próprio CTC, deverão ser encaminhados ao CTC acompanhados de relatório de coleta padronizado pelo serviço responsável pela coleta.

§ 1º Compete ao CTC estabelecer, em instruções escritas e atualizadas, critérios para a aceitação ou não de células humanas e seus derivados não coletados por sua equipe.

§ 2º O relatório de coleta deve conter, no mínimo, as seguintes informações:

I- nome do doador paciente;

II- dados Clínico-laboratoriais;

III- data e hora da coleta;

IV- responsável pela coleta;

V- descrição do procedimento;

VI- temperatura de armazenamento do material biológico para transporte;

VII- resultado dos exames sorológicos, caso houver; e

VIII- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

## Seção XII

### Processamento e Armazenamento

Art. 48. Todo material biológico humano, por ser potencialmente infeccioso, deve ser manipulado conforme as normas de biossegurança aplicáveis.

Art. 49. Todas as etapas do processamento devem estar descritas em instruções escritas e atualizadas, com protocolos definidos e validados, e devem atender a especificações descritas nesta Resolução.

Art. 50. Os protocolos de processamento devem impossibilitar contaminação cruzada e a troca de material.

Art. 51. Não é permitido o processamento simultâneo de células humanas e seus derivados de mais de um doador/paciente no mesmo ambiente.

Art. 52. O CTC deve assegurar a limpeza e assepsia na sala de processamento e de seus equipamentos a cada processamento.

Art. 53. A manipulação e exposição do material biológico e dos materiais, reagentes e produtos para diagnóstico *in vitro* durante o processamento deve ocorrer em ambiente classificado como ISO 5 (Classe 100).

Art. 54. Para o CTC 1, o ambiente classificado como ISO 5 (Classe 100) deve estar instalado em uma sala com classificação mínima ISO 8 (Classe 100.000)

Parágrafo único. O CTC 1 deve possuir vestiário de barreira no acesso à sala onde será processado o material biológico, dotado de lavatório e área de paramentação.

Art. 55. Para o CTC 2, o ambiente classificado como ISO 5 (Classe 100) deve estar instalado em uma sala com classificação mínima ISO 7 (Classe 10.000).

Parágrafo único: O CTC 2, deve possuir ante-câmara e vestiário de barreira dotado de lavatório e área de paramentação no acesso à sala onde será processado o material biológico.

Art. 56. Todos os materiais biológicos que forem submetidos ao processo de cultivo, manipulação extensa ou criopreservação previamente ao seu uso em terapia celular, devem ter amostragem representativa criopreservada e armazenada nas mesmas condições, destinada ao uso nos testes de controle de qualidade de processo.

Parágrafo único. O número de amostras preparadas deve ser suficiente para a realização dos testes de controle de qualidade necessários para liberação do uso do material biológico, conforme artigo 60 desta Resolução, e para controle de qualidade futuro, caso sejam necessárias análises complementares.

Art. 57. O armazenamento deve ser realizado em condições controladas que garantam a manutenção das características biológicas das células.

Art. 58. Se o CTC possuir sistema de armazenamento de unidades de células em tanques de nitrogênio líquido, ou se houver um sistema de segurança de nitrogênio para congelador mecânico com temperatura igual ou inferior a 150°C negativos, a sala de criopreservação e armazenamento deve contar com:

I- visualização externa do seu interior;

II- sistema de exaustão mecânica, para diluição dos traços residuais de nitrogênio, que promova a exaustão forçada de todo o ar da sala de criopreservação e armazenamento, com descarga para o ambiente externo do prédio;

III- sensor do nível de oxigênio ambiental com alarmes sonoro e visual, interno e externo à sala de criopreservação e armazenamento;

IV- alarmes sonoro e visual, interno e externo à sala de criopreservação e armazenamento, que alertem para possíveis falhas no suprimento de nitrogênio líquido e/ou do equipamento de armazenamento; e

V- termômetro para monitoramento de temperatura ambiental, que indique valores máximo e mínimo.

§ 1º O sistema de exaustão mecânica deve manter uma vazão mínima de ar total de 75 (m<sup>3</sup>/h)/m<sup>2</sup>.

§ 2º O ar de reposição deve ser proveniente dos ambientes vizinhos ou suprido por insuflação de ar exterior, com filtragem mínima com filtro classe G1.

§ 3º As grelhas de captação do sistema de exaustão mecânica devem ser instaladas próximas ao piso.

§ 4º Se utilizado congelador mecânico com temperatura igual ou inferior a 150 °C negativos, a sala de criopreservação e armazenamento deve contar com um sensor de temperatura ambiental com alarme.

Art. 59. As unidades de células e derivados com testes microbiológicos positivos ou com resultado reagente em pelo menos um dos marcadores para infecções transmissíveis pelo sangue devem ser armazenadas, preferencialmente, em congelador ou tanque específico, separado das demais unidades com testes negativos.

Parágrafo único. Caso as unidades de células e derivados com testes microbiológicos positivos ou com resultado reagente em pelo menos um dos marcadores para doenças transmissíveis pelo sangue forem acondicionadas no mesmo equipamento das unidades com resultados não reagentes/negativos, deverá ser utilizado um sistema de embalagem externa ou equipamento que garanta a proteção das demais unidades criopreservadas.

### Seção XIII

#### Do Controle de Qualidade das Células

Art. 60. Antes de liberar as células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia, seja para uso autólogo ou alogênico, cultivadas ou não, a fresco ou criopreservadas, com ou sem manipulação extensa, o CTC deve garantir sua segurança e qualidade.

§1º São requisitos mínimos para a garantia de segurança e qualidade das células humanas e seus derivados:

I- testes microbiológicos;

II- testes laboratoriais para detecção de doenças infecto-contagiosas no doador/paciente;

III- testes de pirogenicidade, quando couber;

IV- contagem e viabilidade celular;

V- fenotipagem celular, quando couber;

VI- controle genético, que deve ser realizado em células submetidas a cultura e expansão ou células modificadas geneticamente e/ou por transdução de proteínas VII- teste funcional, quando couber; e

VIII- identificação dos antígenos de histocompatibilidade (HLA), quando couber

§ 2º Se os resultados dos testes microbiológicos e laboratoriais não estiverem disponíveis antes da utilização das células, tal fato deve ser justificado e registrado.

§ 3º Os resultados dos testes do controle de qualidade das células devem ser anexados ao prontuário clínico do doador/paciente.

#### Seção XIV

##### Da Liberação para uso

Art. 61. O acondicionamento das células humanas e seus derivados para pesquisa clínica e/ou terapia, deve ser realizado em embalagens de uso final.

Art. 62 O CTC deve fornecer informações sobre as condições para recebimento do material biológico, sua utilização e ocorrência de efeitos inesperados ou indesejáveis na utilização do material biológico.

Parágrafo único. As instruções de uso das células e seus derivados devem ser fornecidas ao profissional responsável por sua utilização no momento da liberação para uso.

Art. 63. O responsável técnico do CTC deve emitir um certificado comprovando a qualificação das células humanas e seus derivados para uso em pesquisa clínica e/ou terapia contendo, no mínimo, os seguintes itens:

I- identificação do CTC;

II- endereço e telefone do CTC;

III- identificação do responsável técnico e seu número de registro no respectivo conselho profissional regional;

IV- identificação do profissional que liberou o exame e seu número de registro no respectivo conselho profissional regional;

V- nome e número de registro da identificação do doador ou receptor gerado pelo CTC;

VI- data de emissão do laudo;

VII- identificação do procedimento realizado;

VIII- comprovação da qualificação do material conforme artigo 60 desta Resolução; e

IX- observações e informações pertinentes, quando aplicável.

#### Seção XV

##### Dos Dados de Produção

Art.64. O CTC deve enviar à Gerência de Geral de Sangue, outros Tecidos, Células e Órgãos da Anvisa, por meio eletrônico, relatório anual de produção, informando:

I- número total de material biológico recebido para processamento;

II- número de material biológico processado para criopreservação;

III- número total de material biológico liberado para uso em terapia celular; e

IV- número de material biológico descartado e o motivo do descarte.

#### Seção XVI

##### Dos Aspectos Sanitários do Transporte

Art. 65. O transporte de células humanas e seus derivados deve atender à legislação vigente, às normas de biossegurança e às exigências técnicas relacionadas à sua conservação.

Art. 66. Todas as operações do processo de transporte, incluindo- se, entre outras etapas, as condições de acondicionamento, embalagem, transferência do material, armazenamento

temporário, limpeza e manutenção dos equipamentos e veículos, devem ser padronizadas por meio de instruções escritas e atualizadas e devem ser validadas e registradas.

Art. 67. O transporte de células humanas e seus derivados deve ser acompanhado por um documento que contenha, no mínimo, as seguintes informações:

- I- nome do CTC remetente e do serviço de destino, incluindo endereços e telefones;
- II- telefone de emergência e contato, caso haja algum problema durante o percurso do transporte;
- III- quantidade de células humanas e seus derivados transportados, em número total e quantidade fracionada (embalada);
- IV- nome do paciente receptor e do médico responsável;
- V- data e hora do transporte e nome do responsável pelo transporte; e
- VI- tempo de validade do material, mantido nas condições de transporte (na embalagem enviada e não-violada).

Art. 68 As células humanas e seus derivados devem ser transportados por profissional devidamente capacitado.

§1º A responsabilidade pelo material transportado deve ser definida em contrato ou instrumento congênere celebrado entre o CTC e o serviço que irá recebê-lo.

§2º O transporte de células humanas e seus derivados implica responsabilidades para o remetente, o destinatário e a empresa transportadora.

Art. 69. As embalagens, rotulagem e sinalizações utilizadas no transporte de células humanas e seus derivados devem seguir as especificações da legislação vigente, de forma a garantir a estabilidade e integridade do material, assim como a segurança das pessoas e do ambiente.

Parágrafo único. A embalagem que contenha gelo seco, nitrogênio líquido, líquido criogênico, gás não-inflamável ou outro material de conservação e preservação que riscos durante o processo de transporte, deve estar sinalizada externamente, de acordo com as normas nacionais e internacionais para transporte de produtos perigosos.

Art. 70. O transporte de células humanas e seus derivados , após coleta ou processamento, deve ser realizado em recipiente isotérmico resistente e com tampa, que disponha de sistema de monitoramento e registro da temperatura interna.

§1º Os limites apropriados e aceitos de manutenção de temperatura no recipiente isotérmico devem ser estabelecidos pelo CTC.

§2º É expressamente proibido submeter o recipiente à radiação, inclusive nos aeroportos.

§3º No lado externo do recipiente isotérmico, deve constar o seguinte aviso: "MATERIAL BIOLÓGICO HUMANO. NÃO SUBETER À RADIAÇÃO (RAIOS X)"

§4º Nos casos de transporte internacional, o aviso de que trata o parágrafo anterior deve estar escrito em inglês.

## Seção XV

### Do Registro e Arquivos

Art. 71. O CTC deve ter sistema de registro que permita a rastreabilidade das células humanas e de seus derivados, desde a sua obtenção até o seu destino final, incluindo-se a sua análise laboratorial.

Art. 72. Todos os registros referentes a células humanas e seus derivados, coleta ou recebimento de material biológico, processamento e armazenamento de material biológico, dados brutos, cópias dos laudos liberados e procedimentos relacionados ao controle e

garantia da qualidade realizados pelo CTC devem ser arquivados por um período mínimo de 5 (cinco) anos.

§1º Os prontuários clínicos devem ser arquivados por um período mínimo de 20 (vinte) anos sob responsabilidade do médico (ou da instituição) responsável pelo paciente que receber as células humanas e /ou seus derivados.

§2º Esses registros podem ser feitos na forma eletrônica, impressa ou microfilmagem de tal forma que sejam facilmente recuperáveis e que garantam a sua rastreabilidade.

§3º No caso do uso do meio eletrônico os dados devem ser armazenados em cópias de segurança com proteção contra fraudes ou alterações de dados e garantia de inviolabilidade.

§4º Todos os registros do CTC devem ser de caráter confidencial.

Art. 73. O CTC deve manter arquivos de documentos e registros relativos, no mínimo, a:

I- dados da triagem clínica, quando couber;

II- dados da coleta;

III- dados de acondicionamento e transporte;

IV- dados de processamento, armazenamento e criopreservação;

V- resultados da triagem laboratorial;

VI- resultados dos testes realizados para disponibilização das células;

VII- data e motivo do descarte das amostras, quando couber;

VIII- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelo doador ou seu responsável legal;

IX- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado pelo receptor, quando couber;

X- solicitação de células humanas e seus derivados assinada pelo médico profissional responsável pelo procedimento terapêutico;

e

XI- solicitação de células humanas e seus derivados para pesquisa clínica aprovada por Comitê de Ética (CEP), assinada pelo responsável;

Art. 74. O CTC deve manter registros dos serviços e/ou profissionais dos quais receba material biológico e para os quais forneça células humanas e seus derivados.

#### Seção XVI

##### Do Descarte de Material Biológico

Art. 75. O descarte de resíduos do CTC deve estar de acordo com o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) aprovado pelos órgãos competentes e deverá ser realizado de acordo com as normas vigentes.

#### CAPÍTULO IV

##### DAS DISPOSIÇÕES FINAIS E TRANSITÓRIAS

Art. 76. Os estabelecimentos abrangidos por esta resolução terão o prazo de 1 (um) ano contado a partir da data de sua publicação para promover as adequações necessárias ao seu cumprimento.

Parágrafo único. A partir da publicação desta Resolução, os novos estabelecimentos e aqueles que pretendem reiniciar suas atividades, devem atender na íntegra as exigências nela contidas, previamente ao seu funcionamento.

Art. 77. O descumprimento das disposições contidas nesta Resolução constitui infração sanitária, nos termos da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, sem prejuízo das responsabilidades civil, administrativa e penal cabíveis.

Art. 78. Esta Resolução de Diretoria Colegiada deve ser revista no prazo máximo de 03



(três) anos, a partir da data de sua publicação.

Art. 79. Esta resolução entra em vigor na data de sua publicação.

MARIA CECÍLIA MARTINS BRITO

Diretora-Presidente

Substituta





**BRASILCORD**  
MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP**  
**Hemocentro Campinas – Unicamp**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

etiqueta com nº de bolsa

Eu, .....

Registro Hospitalar: ..... Data de nascimento: ...../...../.....;

Portadora dos documentos de Identidade (RG): ..... e CPF: .....

Residente à .....

Bairro: ..... Cidade ..... Estado .....

Concordo em colaborar com o Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP. Para isso, autorizo a coleta após o nascimento de meu (minha) filho (a), do sangue do cordão umbilical e ou da placenta. Fui orientada que a coleta do sangue ocorre após o nascimento do bebê e poderá ser feita de duas formas: Durante o período de dequitação placentária, quando o bebê já foi entregue ao pediatra ou profissional habilitado para os primeiros cuidados e o médico está aguardando a saída da placenta do organismo materno, a veia do cordão umbilical, que é uma continuação da placenta, será puncionada, ou após a dequitação placentária, quando a placenta estiver fora do organismo da mãe. Portanto, como você pode perceber, a coleta não irá interferir com o trabalho de parto de seu bebê e nem com a saúde dele. Este material seria jogado fora, como ocorre normalmente, mas será guardado em nitrogênio líquido, sendo usado para criar um Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical que pode ajudar pessoas com alguns tipos de doenças do sangue.

Estou ciente que mesmo tendo concordado com a doação, o sangue de cordão só será coletado se no parto eu não apresentar alteração clínica ou obstétrica que impeça a coleta, se o trabalho de parto se desenvolver normalmente sem risco para mim e ou para meu (minha) filho (a) e ocorrer em horário de coleta.

Sei também que tanto o sangue do cordão como a placenta, será examinado para ver se não apresentam infecção ou outra doença, sendo depois congelados. O sangue de cordão somente será utilizado se aparecer uma pessoa que apresente uma doença que possa se beneficiar desse sangue armazenado e que seja compatível. Atualmente, este material é utilizado para reconstituir tecido hematopoiético (transplante de células tronco), podendo ser no futuro, utilizado em terapia celular em doenças hematológicas como talassemia, anemia falciforme dentre outras.

Fui informada que se o sangue do cordão for congelado, a equipe de enfermagem do BSCUP fará contato telefônico a partir de 60 dias após o parto, para saber se foi realizado o teste do pezinho (PKU) e se está tudo bem comigo e com o bebê.

Estou ciente que se a quantidade de sangue de cordão coletado for menor que 50ml ou apresentar baixa celularidade, este não será armazenado para o banco por não ser viável para transplante e nem para terapia celular. Entretanto, poderá ser utilizado em pesquisas relacionadas a células tronco em andamento na instituição, que tenham sido aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/Unicamp. As pesquisas que atualmente utilizam sangue de cordão são: *“Células beta pancreáticas diferenciadas de células mesenquimais de tecido adiposo e sangue de cordão umbilical, na presença de conaflina e betacelulina: Maior produção de insulina? Alternativa terapêutica para o Diabetes Mellitus?”*; *“Avaliação da capacidade das células neuronais originárias de células mesenquimais provenientes de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos na regeneração do nervo óptico de coelhos”*; *“Avaliação da capacidade de diferenciação de células tronco mesenquimais, obtidas de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos, na diferenciação para células de ducto biliar”*; *“Avaliação da capacidade de células mesenquimais*



**BRASILCORD**  
MINISTÉRIO DA SAÚDE

**Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP**  
**Hemocentro Campinas – Unicamp**



*obtidas de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo humanos na diferenciação para hepatócitos”, “Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo na hematopoese normal utilizando células CD34+ de cordão umbilical”, “Viabilidade dos subtipos das células mononucleares de sangue de cordão umbilical até 96 horas após a coleta”. As amostras armazenadas para pesquisa serão desprezadas após o término destas.*

Tenho ciência que serão coletados aproximadamente 48ml do meu sangue após o parto, para realização de sorologia para as seguintes doenças: sífilis, SIDA, hepatite B e C, HTLV 1 e 2, doença de Chagas, citomegalovírus, toxoplasmose e tipagem HLA. Estes exames são necessários para melhor identificar o meu sangue. Caso alguma doença seja encontrada, serei comunicada pela equipe do Hemocentro Campinas e receberei encaminhamento para tratamento médico dentro do complexo hospitalar HC, CAISM, Hospital Estadual de Sumaré e Hemocentro Campinas.

Será respeitado o sigilo e confidencialidade dos resultados dos exames que irei fazer, não sendo revelada minha identidade a não ser para a equipe médica responsável pelo atendimento. Esse respeito ao sigilo será mantido no caso da utilização do sangue do cordão para transplante, em caso de publicação dos resultados sobre o banco de sangue de cordão ou se for utilizado para pesquisa.

Autorizo a consulta do meu prontuário médico e do meu (minha) filho (a) pela equipe médica do BSCUP e do Serviço de Transplante solicitante, se houver necessidade da obtenção do histórico e ou dados clínicos no momento do transplante onde a bolsa coletada for utilizada. O BSCUP fica autorizado a transferir a unidade coletada, assim como todos os dados a ela relacionados para os Centros de Registro e/ou Serviços de Transplante solicitantes.

Autorizo também, o descarte da bolsa se o período de validade vencer ou se algum exame detectar algo que impeça sua utilização.

Estou ciente que minha doação é livre e voluntária, podendo desistir da doação a qualquer momento, inclusive na hora do parto, não havendo qualquer prejuízo para o meu atendimento nos hospitais da UNICAMP, se eu não quiser participar. Não receberei nenhuma remuneração, compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da unidade de SCUP.

Uma vez realizada a doação, estou ciente que se porventura alguém de minha família necessitar deste material, ele já poderá ter sido utilizado para outra pessoa.

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas pelos telefones ou endereços abaixo.

MATERNIDADE DE CAMPINAS: 3308-8038/3308-8161

HOSPITAL ESTADUAL DE SUMARÉ: 3883-8900 ramal 1146

Ambulatório de Pré-natal do CAISM: 3621-8636

Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – Hemocentro - Unicamp  
Rua Vital Brasil, 251 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas – SP  
Fone: (19) 3521-7003

Comitê de Ética em Pesquisa – FCM - Unicamp  
Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária “Zeferino Vaz” - Campinas - SP  
Fone: (19) 3521-8936

Comissão de Ética do CAISM: 3621-7810

Assinatura da doadora: .....

Aplicador Termo de Consentimento: .....

Testemunhas: 1..... 2..... Responsável pelo serviço: .....

Campinas,...../...../.....

---

**From:** Profa. Dra. Irene Gyongyver H Lorand Metze [mailto:ilmetze@unicamp.br]

**Sent:** 17 March 2014 13:58

**To:** Wiley Global Permissions

**Subject:** authorization

Dr. Mary Ann Reese

Transfusion Editorial Office

[mreeseb@jhmi.edu](mailto:mreeseb@jhmi.edu)

My post-graduate student **Fernanda G. Pereira-Cunha**, is finishing her doctor thesis, with the subject based on her recently published paper:

**“Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection”**

**Fernanda G. Pereira-Cunha, Adriana S.S. Duarte, Fernando F. Costa, Sara T.O. Saad,**

**Irene Lorand-Metze, and Angela C.M. Luzo**

***Transfusion 2013; 53: 2034-2042.***

Dr Luzo, the corresponding author of this paper was co-supervisor.

So I would kindly request an authorization to re-use material published in this article in her doctor thesis. This thesis will be available at the *University Thesis Database* within one year. When necessary, we can postpone this availability until 5 years.

I thank you very much in advance.

Best regards,

Prof Dr Irene Lorand-Metze

Dept. Internal Medicine and

Flow Cytometry Laboratory

Haematology Hemotherapy Center

University of Campinas, Campinas, Brazil

Rua Carlos Chagas 480, 13083-970

Campinas-SP, Brazil

**Assunto:** RE: authorization

**De:** Wiley Global Permissions <permissions@wiley.com>

**Data:** 02/04/2014 07:50

**Para:** "Profa. Dra. Irene Gyongyver H Lorand Metze" <ilmetze@unicamp.br>

Dear Prof Dr Irene Lorand-Metze,

Thank you for your request.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, ourselves as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially.

You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third party material is expressly excluded from this permission. If any material appears within the article with credit to another source, authorisation from that source must be obtained.

Kind Regards

Emma Willcox  
Permissions Assistant

**WILEY**

