

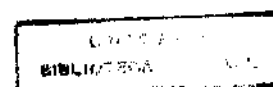
Ângela Cristina Malheiros Luzo

**CÉLULA PROGENITORA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL
HUMANO: VIABILIDADE PARA RECONSTITUIR LINHAGEM
HEMATOPOIÉTICA E TERAPIA GÊNICA**

Orientadora: Profa. Dra Sara Teresinha Olalla Saad



Campinas
1998



UNIDADE BC
N.º CHAMADA:

RECIBO 37360
RCC 229/99
G D X
PR. R\$ 11,00
DA 24/04/99
N.º FPD

CM-00122677-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

L979c

Luzo, Ângela Cristina Malleiros

Célula progenitora de sangue de cordão umbilical humano: viabilidade para reconstituir linhagem hematopoiética e terapia gênica / Ângela Cristina Malheiros Luzo. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

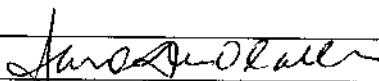
Orientador : Sara Terezina Olalla Saad

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

I. Sangue. 2. Transplante. I. Sara Terezinha Olalla Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

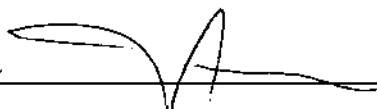
Banca Examinadora da Defesa de Tese

Orientador (a): Sara Teresinha Olalla Saad

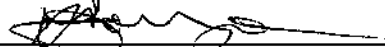


Membros:

1. Fernando Fernando Costa



2. Hélio Mendes de Souza



3. _____

4. _____

Curso de Pós-Graduação em Medicina, área Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/12/98

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Medicina, na área de Clínica Médica, da médica Ângela Cristina Malheiros Luzo.

Profa. DRa. Sara T. O. Saad

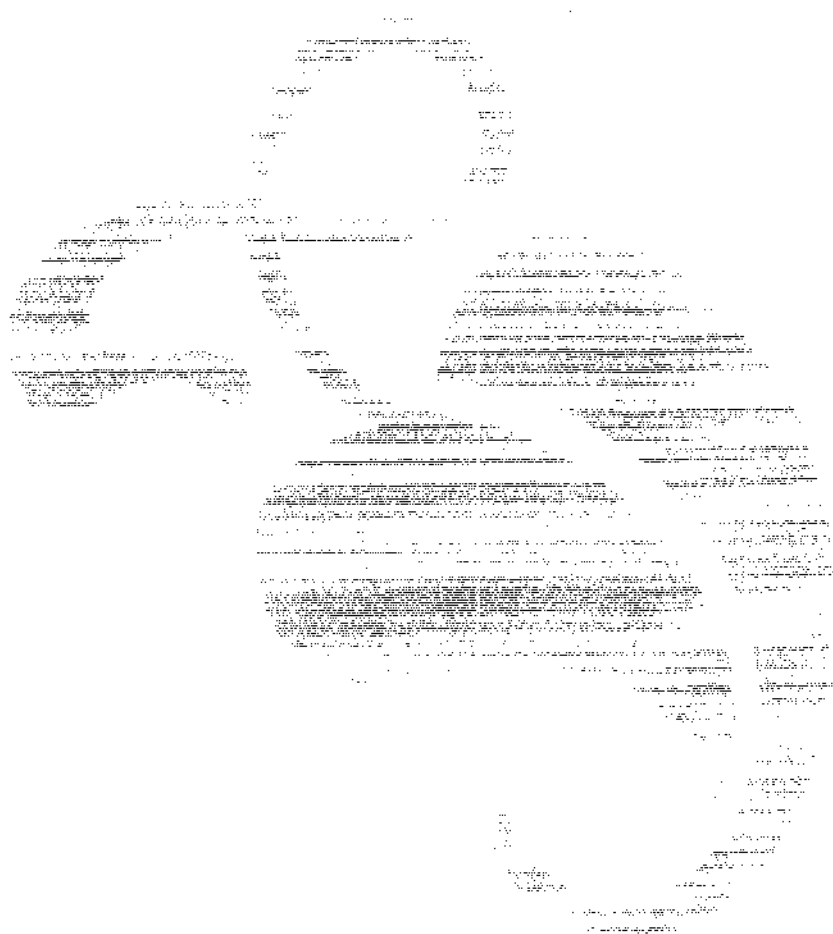
Orientadora: *Sara T. O. Saad*

Epígrafe

*Como se tu,
Sem o querer,
Em mim tocasses
Para dizer
Qualquer mistério,
Súbito e etéreo,
Que nem soubesses
Que tinha ser.*

*Assim a brisa
Nos ramos diz
Sem o saber
Uma imprecisa
Coisa feliz.*

Fernando Pessoa



Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais Francisco e Zaida pelo exemplo de vida, amor e o apoio incondicional nos momentos difíceis, aos meus 2 anjinhos Fernando e Julia pela paciência com a mãe sempre atrasada e correndo de um lado para o outro, pelas tardes de sábado no laboratório, quando eles me viam congelar células na maior paciência e à dona Eunice e ao "Nado" por todo apoio e carinho dado desde que estou em Campinas.

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Dra Sara, pela confiança depositada e estímulo incessante que nos faz querer buscar cada vez mais novos desafios.

À professora Mary Luci que nos cedeu o laboratório de cultura de células no início dos trabalhos.

À Adriana e Teresa pelo apoio recebido, Dri pelas noites e fins de semana que você me ajudou na manipulação das células, Teresa pelas dicas, conselhos e estímulo.

À Rosana e Sandra pela ajuda na hora de preparar as aulas, trabalhos para congressos e a tese, sempre com ótimas idéias.

À Cida pela ajuda na criopreservação das células.

Ao pessoal da citometria de fluxo pela realização dos exames.

À todo o pessoal da transfusão HC e CAISM, do fracionamento do Hemocentro, do Centro Obstétrico, e do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro, pelo carinho e apoio durante a realização dos experimentos.

Ao Centro de Bioterismo da UNICAMP por nos ceder os camundongos e continuar a tratá-los após os transplantes.

Ao Hemocentro da Unicamp pelo apoio técnico, laboratorial e científico.

Lista de Abreviaturas

BFU-E	unidade formadora de burst de linhagem eritróide
CFU-C	unidade formadora de colônias de linhagem hematopoiética
CFU-E	unidade formadora de colônias de linhagem eritróide
CFU-GEMM	unidade formadora de granulócitos eritrócitos monócitos e megacariócitos ou colônia mista
CFU-GM	unidade formadora de linhagem granulomonocítica
CPD	citrato fosfato dextrose
DMSO	Dimetil Sulfóxido
GM-CSF	fator estimulante de linhagem granulomonocítica
GVHD	doença enxerto versus hospedeiro
GVL	enxerto versus leucemia
HLA	antígenos leucocitários de histocompatibilidade
PBS	salina buffered fosfato
RN	recém-nascido
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBF	soro bovino fetal
SCF	stem cell factor (kit ligante, fator de crescimento de mastócito e fator de steel)
SCHU	Sangue de Cordão Umbilical Humano
SCID	Severe Combined Immunodeficient Disease

Sumário

Resumo	i
Introdução	01
Objetivo	06
Material e Método	08
Resultados	15
Discussão	43
Conclusão	51
Summary	53
Referência Bibliográfica	56



Resumo

Nos últimos anos, o sangue de cordão umbilical humano (scuh) vem se tornando fonte alternativa viável, para obtenção de célula precursora de linhagem hematopoiética devido à facilidade em ser obtido, manipulado e rico em células precursoras. Estas células são mais imaturas que as da medula óssea, tendo grande capacidade de proliferação, replicação e transfecção. Apresenta, quando transfectada, maior expressão do material introduzido. No intuito de estudar a viabilidade destas células para reconstituir linhagem hematopoiética, analisamos sua capacidade de proliferação em cultura em meio de metilcelulose, antes e após criopreservação e transplantando-as em camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada (SCID), irradiados. Foram coletadas, no período de junho de 1996 a agosto de 1998, 75 bolsas de scuh. Houve uma variação no volume de sangue coletado de 1 a 120 ml com média de 57 ml. O número médio de células viáveis foi de 119×10^5 /ml de sangue de cordão. Nos estudos clonogênicos as médias observadas foram 216 colônias de CFU/BFU-E, 134 colônias de CFU-GM e 22 colônias de CFU-GEMM

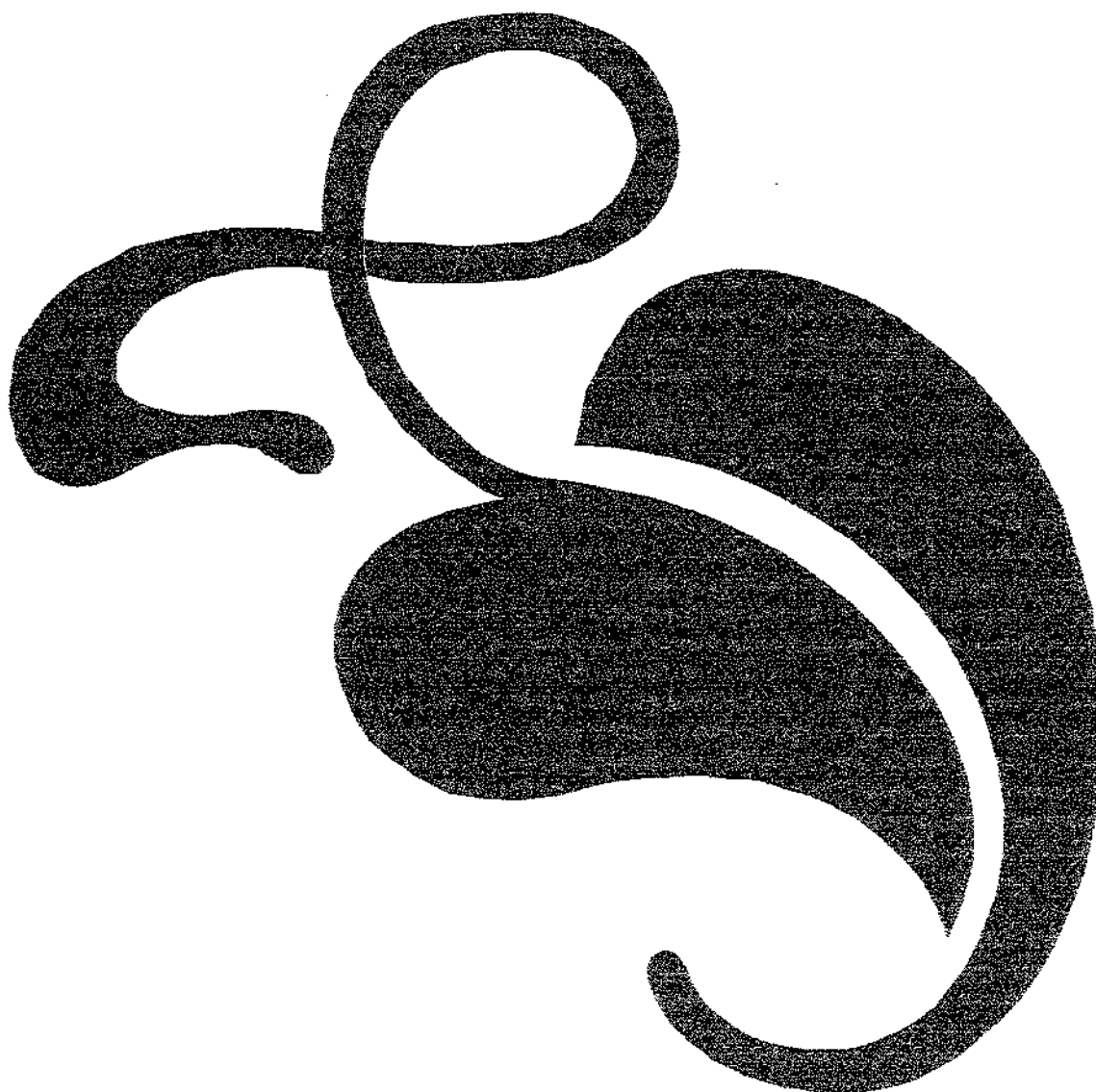
Durante o estudo notamos uma proliferação intensa nas culturas de sangue de cordão de prematuros quando comparados com os neonatos de termo. Os prematuros apresentaram um maior número de células precursoras viáveis (371×10^5 / ml de sangue de cordão) que os de termo ($74 \text{ células.} \times 10^5$ / ml de sangue de cordão) Na leitura feita no 8º dia de cultura, encontramos 284 CFU/BFU-E nos prematuros e 19 colônias nos de termo ($p=0,003$). Em relação às CFU-GM os prematuros apresentaram 196 colônias/ml de sangue de cordão e os de termo 15 colônias /ml ($p=0,003$). Foram encontradas 29 colônias de CFU-GEMMM nos prematuros e nenhuma colônia nos de termo ($p=0,003$) No 14º dia, os prematuros apresentaram 358 colônias de CFU/BFU-E e os de termo 216 colônias ($p=0,061$); 219 colônias de CFU-GM e os de termo 120 colônias ($p=0,075$); 41 colônias de CFU-GEMM e os de termo 23 colônias ($p=0,040$). Tal fato poderia estar relacionado com o maior número de células precursoras existente em prematuros que se relaciona com a ontogenia da hemopoiese. Entretanto a diferenciação nos diferentes tipos de colônia se encontra também acelerado. As culturas dos prematuros no 8º dia foram semelhantes às de termo no 14º dia, já apresentando grande quantidade de CFU-GEMM. As culturas do 14º dia já apresentavam BFU-E, as quais, só aparecem nas de termo no 21º dia, apresentando também, intensa proliferação celular, dificultando a contagem.

Provavelmente as células dos prematuros analisados (idade gestacional entre 20 e 32 semanas) devem entrar em ciclo celular antes que as de termo. Este achado está sendo objeto de estudo

O estudo da viabilidade das células após o congelamento demonstrou que elas permaneceram viáveis após a criopreservação, mantendo, nos estudos clonogênicos, sua capacidade proliferativa e na imunofenotipagem, a proporção de células CD34⁺ foi semelhante à realizada pré- congelamento.

O transplante foi realizado em 20 camundongos de linhagem SCID/SCID, após terem sido irradiados com 300 rads de fonte de Césio, injetando-se $1,0 \times 10^7$ células mononucleares de scuh em veia orbitária. Concomitantemente, num dos experimentos foi sacrificado um animal sem ser irradiado e transplantado, sendo feita a avaliação do mesmo modo que para avaliar a pega dos transplantados. Para avaliação da pega, os camundongos foram sacrificados 8 semanas após transplante, sendo feita cultura de lavado de medula óssea dos camundongos em meio semi-sólido de metilcelulose com fatores estimulantes de crescimento recombinantes, específicos para linhagem celular humana e análise através de imunofenotipagem por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais para células humanas. Foram obtidas amostras de sangue periférico, macerado de pulmão, baço e de lavado de medula óssea. A pega na 8ª semana pós-transplante ocorreu em 6 dos 21 camundongos; 15 animais morreram na 1ª semana pós-irradiação, o que pode acontecer pois a linhagem SCID é mais sensível que as outras linhagens. Houve intensa proliferação nas culturas, dificultando a contagem das CFU-C. A análise através da citometria de fluxo foi positiva em 3 dos 6 casos. Foram analisados 6.000 a 10.000 eventos. A porcentagem encontrada de células captadas pelos anticorpos foi expressa em relação ao campo de linfócitos. Foram encontradas, no sangue periférico, 400 células com 26,03% de CD45, 4,50% de CD2, 30,14% de CD3, 1,03% de CD19. No pulmão, 2500 células com 18,65% de CD45, 16,32% de CD3 e 0,37% de CD19. Na medula óssea, 1000 células, com 12,80% de CD45, 4,45% de CD3, 0,855 de CD8, 0,03% de CD34. No baço, haviam 2300 células sendo 36,84% de CD45, 28,27% de CD3, e 1,62% de CD19. No camundongo sem transplante não houve marcação para células humanas. Mediante os dados apresentados, que se relacionam com os da literatura, as células precursoras do sangue de cordão são capazes de reconstituir a linhagem

hematopoiética após ablação da medula e devido às suas características, imaturidade, grande capacidade de proliferação e autogeração podem ser adequadas para terapia gênica .



Introdução

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas é utilizado no tratamento de várias doenças hematológicas e genéticas para reconstituição medular após ablação da medula óssea por quimioterapia e/ou radioterapia. A fonte destas células tem sido, há alguns anos, a medula óssea de doadores voluntários (Gale *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1994; Rubinstein *et al.*, 1993). Entretanto, para que os transplantes tenham uma boa "pega", o doador deve compartilhar com o receptor o maior número possível de antígenos do complexo de histocompatibilidade. O doador ideal seria um gêmeo idêntico ou um irmão HLA idêntico. Dada a dificuldade em se encontrar este tipo de doador, vem se utilizando medula óssea de doadores alogênêicos (não relacionados) HLA compatíveis. Tal fato leva a uma maior incidência de doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), com piora do prognóstico do paciente. Devido à dificuldade em se encontrar indivíduos HLA compatíveis criou-se, em alguns países, o Programa Nacional de Doador de Medula Óssea. Entretanto, para determinados grupos étnicos, é enorme a dificuldade para se encontrar doadores, já que a maioria dos bancos de medula são compostos por indivíduos de raça caucasóide. Afora o problema do HLA, a doação de medula requer hospitalização para coleta da medula com o uso de anestesia geral ou peridural, devendo o doador estar ciente dos riscos. Além do mais, o doador deve apresentar, também, testes sorológicos negativos para doenças infecto-contagiosas (SIDA., Hepatite C, Hepatite B, HTLV 1 e 2, Sífilis e Doença de Chagas).

Nos últimos 18 anos, o sangue de cordão umbilical vem sendo analisado como possível fonte alternativa para obtenção de células precursoras de linhagem hematopoiética. No início da década de 80, Boyse *et al* já aventavam a possibilidade de utilização do sangue de cordão como fonte de célula precursora para reconstituir a linhagem hematopoiética. O mesmo grupo também realizou os primeiros trabalhos reconstituindo linhagem hematopoiética em camundongos, com sangue de cordão umbilical humano (trabalho não publicado) (Apperley *et al.*, 1994; Bertolini *et al.*, 1993; Broxmeyer *et al.*, 1989; Broxmeyer *et al.*, 1992; Gluckman *et al.*, 1994; Rubinstein *et al.*, 1995; Thompson, 1995). Em 1989, foi realizado o primeiro transplante com células precursoras de sangue de cordão umbilical, em uma criança de 7 anos, portadora de anemia de Fanconi, por Eliane Gluckman *et al*, em colaboração com o grupo de Boyse. O

transplante obteve êxito e o paciente está bem até os dias de hoje. A partir de então, na década de 90, houve uma explosão de artigos sobre coleta, criopreservação, armazenamento, características das células e a sua utilização para transplante e terapia gênica. No campo experimental, surgiram trabalhos sobre a utilização de camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada para avaliar a viabilidade e a menor quantidade de células de cordão necessária para reconstituição da medula de animais irradiados, (Lubin *et al* 1991, Vormoor *et al*, 1994 e Wang *et al*, 1997). Em outros estudos (Laroche *et al* 1995) transplantou-se animais de linhagem SCID com células precursoras de indivíduos portadores de beta talassemia e anemia falciforme criando camundongos portadores de talassemia ou anemia falciforme com o objetivo de se obter modelos animais experimentais para melhor estudar doenças hematológicas e utilizá-los em pesquisas em terapia gênica (Leblond *et al*, 1997). Ao redor de 1993, o New York Blood Center iniciou coleta e armazenamento sistemático de sangue de cordão, com o intuito de instalar um banco de sangue de cordão. Atualmente, este banco tem cerca de 5000 bolsas armazenadas.

O sangue de cordão apresenta como vantagem, em relação à medula óssea, ser material facilmente obtido, que normalmente é descartado após o término do trabalho de parto, podendo ser manipulado com facilidade (Broxmeyer *et al.*, 1992; Newton *et al.*, 1993; Thierry *et al.*, 1990; Thierry *et al.*, 1992; Turner *et al.*, 1992) e dificilmente será portador de doença infecto-contagiosa. É extremamente rico em células progenitoras fornecendo, em cultura, número de colônias de GM-CSF suficientes para recuperação da linhagem hematopoiética (Brossard *et al.*, 1990; Broxmeyer *et al.*, 1992; Chabord *et al.*, 1992; Falkenburg *et al.*, 1993; Gluckman *et al.*, 1990; Gluckman *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Traycoff *et al.* 1994 Wagner *et al.*, 1992).

Outra vantagem do sangue de cordão se relaciona com a baixa frequência de doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) quando utilizado em transplante (Harris *et al.*, 1994a; Harris *et al.*, 1994b; Socié *et al.*, 1994). Nos estudos realizados sobre a imunorreatividade da linhagem linfóide do sangue de cordão, demonstrou-se que a maioria das células apresenta fenótipo compatível com imaturidade como CD 3⁺8⁺, CD 3⁺7⁺, para linfócitos T (Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1992; Milosevits *et al.*,

1995; Rabian-Berzog *et al.*, 1992). Comparado ao sangue periférico, o sangue de cordão apresenta também um menor número de células CD4⁺, CD 8⁺ e principalmente CD 3⁺ (Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1992; Milosevits *et al.*, 1995; Rabian-Berzog *et al.*, 1992). Por outro lado, os linfócitos NK (CD 16⁺) apresentam-se, no sangue de cordão, em número semelhante ao do sangue periférico, o que é vantajoso, já que as células NK são responsáveis pela reação enxerto versus leucemia (GVL) (Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Keever *et al.*, 1995; Rubinstein *et al.*, 1993; Rabian-Berzog *et al.*, 1992). O número de linfócitos B é semelhante ao do sangue periférico, mas 50% destas células no sangue de cordão apresentam fenótipo CD5⁺19⁺ que designa imaturidade (Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Rabian-Berzog *et al.*, 1992). A criopreservação e o tempo de congelamento não alteraram o número dos vários tipos de linfócitos do sangue de cordão (Almici *et al.*, 1996; Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1994). Nos estudos "in vitro" demonstrou-se que, devido à sua imaturidade, os linfócitos não são capazes de mediar lise celular (Apperley *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1994; Milosevits *et al.*, 1995), mesmo quando estimulados com interleucina 2, fitohemaglutininas e aloantígenos. Foi demonstrado apenas efeito citotóxico celular não específico, o que explicaria a baixa incidência de doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) e quadro clínico de menor gravidade.

Nos últimos anos foram realizados cerca de 700 transplantes utilizando sangue de cordão para reconstituir medula óssea. Os primeiros estudos clínicos foram publicados em 1996 por Kutzberg *et al.* e Wagner *et al.* O grupo de Kutzberg transplantou 25 pacientes (19 portadores de neoplasia) utilizando sangue de cordão de indivíduos não relacionados, em alguns casos incompatíveis até a três antígenos do sistema de histocompatibilidade leucocitário (HLA). Os pacientes apresentavam faixa etária entre 8 meses e 23 anos, com mediana de 7 anos e peso entre 7,5 a 79 kg, mediana de 19,5 kg. Neste estudo, foram infundidas 0,7 a 11 X 10⁷ células/kg peso com mediana de 3 x 10⁷ células/kg peso. Houve 7 mortes precoces não relacionadas com a pega do enxerto, havendo quimerismo completo em 18 dos 18 pacientes onde houve pega. Foi observada doença enxerto versus hospedeiro (GVHD) aguda grau II a IV em 42% dos casos, ocorrendo GVHD crônica em 2 casos. O tempo de seguimento destes indivíduos variou de 8 a 24 meses, com mediana de 12 meses e a sobrevida em 6 meses foi de 48% (12/25). O grupo de Wagner

transplantou 18 pacientes com faixa etária entre 1 a 21 anos, mediana de 2 anos e 7 meses e peso entre 3 a 78 kg mediana, de 15,4 kg, sendo 7 transplantes HLA compatíveis e 11 incompatíveis a até 3 antígenos do sistema HLA. Os pacientes eram portadores de neoplasias hematológicas, erro inato de metabolismo e aplasia de medula. O número de células infundidas variou entre 1,4 a $4,0 \times 10^7$ /kg peso com mediana de $4,1 \text{ células} \times 10^7$ /kg peso. Houve 5 óbitos precoces também não relacionados com a pega do transplante e a sobrevida em 6 meses foi de $0,65 \pm 0,12$, com tempo de seguimento de 1,6 a 17 meses (mediana de 6 meses). A probabilidade de GVHD aguda grau II a IV, no 100º dia pós-transplante, foi de $0,5 \pm 0,13$. Os pacientes transplantados por Kurtzberg et al (1996) apresentavam faixa etária um pouco mais elevada e maior frequência de neoplasias e foram transplantados com menos de $3,7 \times 10^7$ células /kg peso, mas de modo geral os trabalhos demonstraram que os transplantes com sangue de cordão apresentaram uma baixa porcentagem de falhas de pega de enxerto nos pacientes que sobreviveram mais de 30 dias. Em alguns casos, houve pega com pequena quantidade de células infundidas. Observou-se também neste estudo, menor risco de GVHD e maior tolerância a transplantes HLA incompatíveis.

Em 1997, Glukman *et al* publicaram a análise dos dados de 87 pacientes incluídos no registro europeu de transplante de sangue de cordão (EUROCORD). Os pacientes apresentavam faixa etária entre 0,2 a 39 anos (mediana de 6 anos), peso entre 5 a 68 kg (mediana de 20 kg), 62% dos pacientes eram portadores de neoplasia. O número de células mononucleares infundidas variou de 1,0 a $18 \text{ células} \times 10^7$ /kg peso (mediana de 3,7 células). O tempo de seguimento variou de 3,0 a 90 meses (mediana de 17 meses) e ocorreu pega do enxerto em 69% dos casos, com quimerismo completo em todos estes (n=43). A GVHD aguda grau II a IV ocorreu em 38% dos casos, sendo 21% nos transplantes HLA idênticos (68% foram de familiares) e 60% nos incompatíveis. Houve 5 casos de GVHD crônica. O que dificulta a comparação dos estudos anteriores com o do Eurocord é o fato do último ser multicêntrico apresentando uma incidência de GVHD maior que os anteriores.

Apesar dos trabalhos fornecerem dados favoráveis em relação à baixa incidência de doença enxerto versus hospedeiro, tempo de pega do enxerto e número de células

mononucleares ideal para ser infundida, o tempo de seguimento dos pacientes ainda é pequeno, para se confirmar os resultados "in vivo". (Apperley *et al.*, 1994; Gluckman *et al.*, 1997; Gluckman *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1997; Kutzberg *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 1994; Rubinstein *et al.*, 1993; Thompson, 1995; Wagner *et al.*, 1996).

Por ser rico em células progenitoras mais primitivas, o sangue de cordão pode também ser utilizado para terapia gênica. Apresenta maior quantidade de colônias quando cultivado em agar ou em metilcelulose, na presença de fatores estimulantes de crescimento, sobrevivendo e expandindo-se melhor e portanto, propiciando maior número de células contendo DNA modificado (Abe *et al.*, 1996; Bertolini *et al.*, 1994; Champseix *et al.*, 1996; Hiao *et al.*, 1994; Hows *et al.*, 1992a e b; Mayani *et al.*, 1993; Moritz *et al.*, 1993; Traycoff *et al.*, 1994; Ye *et al.*, 1994). Em adição, as CFU-MIX de sangue de cordão têm demonstrado capacidade de gerar colônias secundárias, numa frequência maior que as de medula óssea (Carrow *et al.*, 1993; Hao *et al.*, 1997; Harrison *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1996; Moritz *et al.*, 1993; Piacibello *et al.*, 1997). Outro aspecto vantajoso das células de cordão para fins de terapia gênica é a capacidade de algumas células CD 34⁺, com padrão brilhante de 3+ em análise por citometria de fluxo, de múltiplos replaqueamentos "in vitro" (Lu *et al.*, 1993; Moritz *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997). Estas células não foram encontradas na medula óssea. O conjunto destes dados nos permite concluir que, as células progenitoras do sangue de cordão, por apresentarem maior capacidade de proliferação e auto-geração que as da medula, podem ser eficientemente infectadas com vetores de retrovirus, havendo alto nível de expressão da sequência introduzida (Chu *et al.*, 1987; Hogan *et al.*, 1997; Lubin *et al.*, 1991; Luskey *et al.*, 1992; Lapidot *et al.*, 1992; Larochelle *et al.*, 1995; McCune *et al.*, 1988; Moritz *et al.*, 1993; Tendeloo *et al.*, 1998; Thierry *et al.*, 1995; Verma *et al.*, 1998; Vormoor *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1998).

Em conclusão, é possível que, no futuro, o sangue de cordão seja a fonte de célula precursora ideal para transplante e terapia gênica (Silberstein, 1996; Thompson, 1995).



Objetivo

O objetivo deste estudo foi:

- padronizar a coleta, congelamento e descongelamento do sangue de cordão umbilical
- avaliar a capacidade proliferativa destas células através de ensaios clonogênicos
- estudar a viabilidade das células progenitoras de sangue de cordão umbilical humano para reconstituir linhagem hematopoiética em medula óssea de camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada (SCID/SCID).



Material e Método

1. Coleta de sangue de cordão

O sangue de cordão foi coletado em trabalho de parto normal, preferencialmente, tendo sido coletado também de parto cesareana, durante o período de dequitação placentária. Foi utilizada bolsa de coleta específica (Macopharma) com capacidade para 150 ml, com 21ml de citrato, fosfato e dextrose (CPD) como anticoagulante.

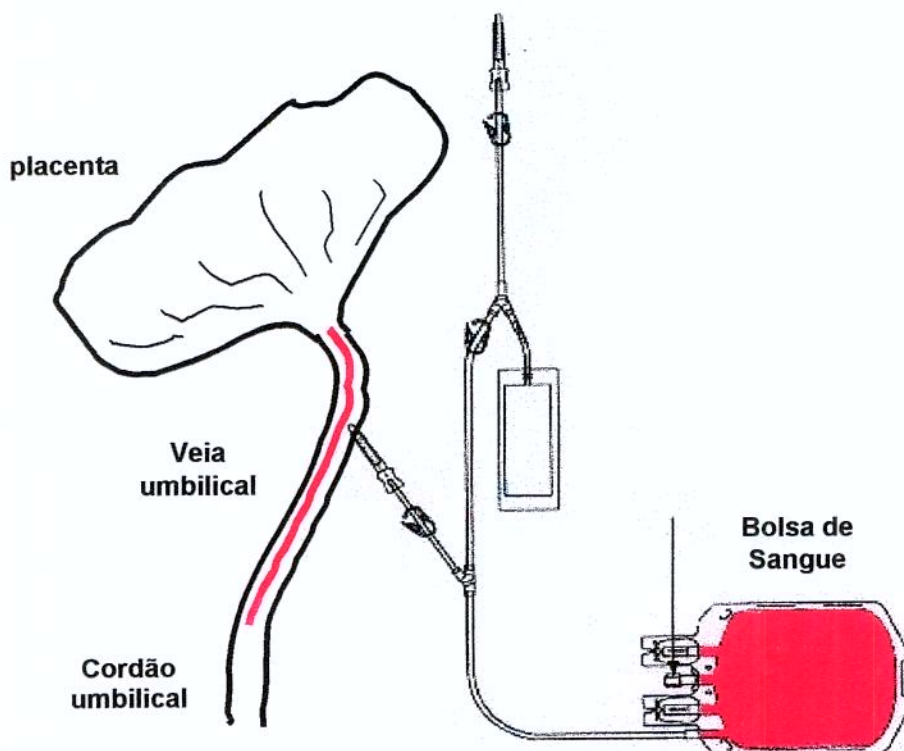
Foram considerados critérios de exclusão: ruptura de bolsa amniótica acima de 6 horas anteriores ao parto, temperatura materna acima de 38^o C, presença de mecônio no líquido amniótico 3+/4+, gestantes portadoras de Diabetes Mellitus e gestantes portadoras de Hipertensão Arterial Sistêmica.

Foram consideradas aptas para a coleta, gestantes que estivessem em trabalho de parto, sem intercorrências clínicas ou obstétricas.

- Modo de Coleta

Após o cordão umbilical ter sido clampeado e seccionado próximo ao umbigo do neonato e o recém nascido ter saído da sala de parto, foi feita assepsia adequada do cordão umbilical com polvidine. Foi feita então a punção da veia umbilical, utilizando-se uma das agulhas acopladas à bolsa de coleta. A bolsa foi colocada em cima de um agitador de bolsa de sangue, que se encontrava no chão. Neste caso o sangue entra na bolsa por diferença de gravidade. Após a coleta, foram fechados todos os clamps da bolsa, mantendo-se o sistema de coleta fechado(fig 1).

Figura 1: Esquema do sistema fechado de coleta



2. Avaliação do sangue coletado

- Separação de células mononucleares

As células mononucleares foram separadas através do método de Ficoll-Hipaque na densidade de 1077. O sangue de cordão foi diluído em RPMI na proporção de 1:2, e colocado gentilmente sobre o Ficoll na proporção de 1 ml de Ficoll para 2 ml de sangue diluído. O tubo foi então centrifugado a 1800 rpm durante 30 minutos.

A nuvem esbranquiçada contendo as células mononucleares, que fica na interface do sobrenadante, foi então recolhida, sendo adicionado RPMI. Foram feitas então 2 centrifugações a 1220 rpm, durante 10 minutos. Após cada centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o botão celular dissolvido com RPMI. Após a última centrifugação, o botão foi dissolvido em 1 ml de RPMI, sendo analisado quanto à viabilidade e realizada a contagem celular.

- Viabilidade e contagem celular

Uma alíquota da solução final do item anterior foi corada em concentração adequada com azul de tripan, sendo as células analisadas em relação à viabilidade (células viáveis apresentam halo transparente e as não viáveis incorporam o azul de tripan, tornando-se azuis) e feita a contagem das viáveis em câmara de Neubauer,

3. Cultura de célula progenitora

- Concentração celular

A concentração celular normatizada como ideal para a cultura em meio de metilcelulose foi de 1×10^5 células mononucleares/ ml de meio / poço.

- Meio

Foi utilizado o meio de metilcelulose comercial da Stem Cell Tech, Canadá, que continha; 0,9% de metilcelulose, 30% de soro bovino fetal, 1% de albumina bovina, 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol, 2mM de L-glutamina, 50ng/ml de Stem cell factor recombinante, 10ng/ml de GM-CSF recombinante, 10ng/ml de Interleucina 3 recombinante e foram adicionadas 2U de eritropoietina humana recombinante (Sigma) a cada 1 ml de meio.

- Leitura:

A leitura das culturas foi realizada no 8^o e 14^o dias de cultura, contando-se colônias (agrupamento com mais de 50 células) das seguintes linhagens: eritróide (CFU-E/ BFU-E), granulomonocíticas (CFU-GM) e mista, isto é, contendo granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos (CFU-GEMM).

4. Congelamento

- Solução de ressuspensão:

O meio para ressuspender o botão celular foi RPMI com L-glutamina, sendo adicionado 20% de soro bovino fetal. O meio ficou, durante o processo de congelamento, o mais próximo possível de 0^o C (toda a manipulação celular foi feita em cuba com gelo). A

quantidade utilizada do meio de ressuspensão foi a necessária para se obter uma concentração final de 1×10^7 células/ml.

- **Meio congelante:**

Para se obter o meio congelante foi feita solução crioprotetora contendo RPMI e soro bovino fetal, adicionando-se por último dimetilsulfóxido (DMSO), na proporção de 2: 2: 1, mantendo-se o tubo da solução em cuba com gelo.

- **Congelamento:**

Para o congelamento foi adicionado às células a mesma quantidade de meio congelante que a utilizada para ressuspensão. A concentração celular final foi de 1×10^7 células /ml.

O transporte foi feito em cuba de gelo e a técnica de congelamento utilizada foi a programada, com controle de declínio gradual de temperatura, computadorizada. O aparelho utilizado foi Cryomed da Forma Scientific, modelo 8018, acoplado ao microcomputador modelo 1010.

Os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido.

5. Descongelamento

Os tubos foram descongelados sob leve agitação manual, em banho-maria a 37°C, sendo retirados do banho ainda com a presença de cristal de gelo. O conteúdo do tubo foi despejado em 50 ml de RPMI com 20% de soro bovino fetal (SBF).

O tubo foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o procedimento repetido. Após a 2ª centrifugação, o botão celular foi ressuspensão em 1ml de RPMI com L-glutamina. A prova de viabilidade com azul de tripan e a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer foram então refeitas.

6. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada em aparelho da Becton Dickson FACSCALIBUR. Os anticorpos monoclonais utilizados, CD45, CD34⁺, CD2, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19,

IgG foram da Dako, marcados com os fitocromos isothiocianato de fluoresceína (FITC) ou phycoerytrina (PE). Foram utilizados, para a marcação de cada anticorpo, 100µl de sangue de cordão ou 5×10^6 células mononucleares/ml. Foram adicionados em cada tubo, 10µl do anticorpo, incubando então durante 30 minutos em temperatura ambiente. A solução de lise utilizada foi a FACS lysing solution da B-D, na proporção de 1:10, 2 ml em cada tubo. Os tubos foram novamente incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado, sendo o botão celular ressuspenso com PBS (8g de NaCl, 0,2g de KCl, 2,159g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ em 1000ml de H_2O destilada), sendo adicionado 2% de soro bovino fetal e 0,1% de azida sódica e o procedimento repetido. Após a 2ª centrifugação, o botão foi ressuspenso em 1 ml de PBS e feita a leitura no citômetro de fluxo. A aquisição e análise das células foram feitas no programa CELLQUEST. O número de eventos adquiridos para análise de CD34^+ variaram de 10.000 a 30.000 eventos. Para as análises das células dos camundongos (macerado de pulmão, baço, sangue periférico e lavado de medula óssea) o número de eventos adquiridos dependeu da celularidade e variou de 6.000 a 10.000 eventos.

7. Transplante

- Camundongos

Foram utilizados camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada (SCID/SCID), homozigóticos, cruzamento das linhagens BALB/cAn que não possuem linfócitos T e B, adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP. Foram mantidos após o transplante, sob condições assépticas pré-determinadas pelo biotério no próprio Centro de Bioterismo.

- Imunossupressão:

Os animais foram irradiados com 300 rads de uma fonte de Césio. O irradiador utilizado foi o IBL437 C, da CIS Bio International.

- Transplante:

Imediatamente após a irradiação, foram injetadas 1×10^7 células mononucleares de sangue de cordão em veia orbitária de cada camundongo. Os camundongos retornaram ao Centro de Bioterismo, sendo mantidos em isoladores estéreis.

8. Análise da pega do enxerto

O animal foi sacrificado na 8^a semana pós-transplante em câmara de fluxo laminar. Foram coletados sangue periférico, baço, pulmões e lavado da medula óssea.

A análise da pega do enxerto foi feita através de citometria de fluxo do sangue periférico e de suspensão de células de pulmão, baço e medula óssea do camundongo, com anticorpos monoclonais específicos para células humanas (CD34, CD45, CD2, CD3, CD4, CD8, CD19) e cultura do lavado da medula óssea para células precursoras de linhagem hematopoiética humana, em meio semi-sólido de metilcelulose 0,9%, com 30% de soro bovino fetal, 1% de albumina bovina, 10^{-4} M de 2-mercaptoetanol, 2mM de L glutamina, 50ng/ml de Stem cell factor recombinante, 10ng/ml de GM-CSF, 10ng/ml de Interleucina 3, sendo adicionadas 2 U de eritropoietina humana a cada 1 ml de meio. Os fatores estimulantes de crescimento eram recombinantes e específicos para linhagem humana. A concentração celular utilizada para a cultura foi de $1,0 \times 10^5$ células/ ml de meio.

9. Análise Estatística

Para comparação do grupo de neonatos prematuros e de termo foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon-MannWhiney.



Resultados

1. Coleta e avaliação celular

No período de junho de 1996 a agosto de 1998, foram coletadas 75 bolsas de sangue de cordão umbilical humano, de partos realizados no CAISM. As coletas foram realizadas pelos médicos residentes que estavam em estágio no centro obstétrico. Das 75 bolsas coletadas, 58 foram de recém – nascidos de termo, com idade gestacional entre 33 e 41 semanas e 17 foram de prematuros, com idade gestacional entre 20 e 32 semanas. O volume de sangue coletado variou de 1 ml a 120 ml apresentando média de 57 ml, o número de células mononucleares viáveis variou de 1×10^5 a 2500×10^5 células/ ml de sangue de cordão, média de 119×10^5 células/ml.

2. Estudos clonogênicos

Nos estudos clonogênicos, as culturas dos 3 primeiros casos foram feitas em meio de agar em triplicata, sendo semeadas com 1×10^6 células/ml de meio. Nas outras 72 bolsas, as culturas foram feitas em meio semi-sólido de metilcelulose, também em triplicata, tendo sido normatizado 1×10^5 células/ml de meio para semeadura. Houve crescimento em 60 bolsas, apresentando uma média de 216 colônias de linhagem eritróide (CFU-E/BFU-E)/ml de sangue de cordão, 134 colônias de linhagem granulomonocítica (CFU-GM)/ml de sangue de cordão e 22 colônias de linhagem mista (CFU-GEMM)/ml de sangue de cordão.

Na tabela III, comparamos a proliferação celular em meio de cultura de sangue de cordão de RN prematuros e de termo. Nas culturas de prematuros houve aparecimento de colônias bem definidas já no 8º dia, apresentando inclusive colônias de linhagem mista, CFU-GEMM. As culturas de RN de termo, no 8º dia, apresentaram cluster (agrupamento com menos de 50 células), raras colônias e não haviam colônias mistas. A análise comparativa do número de células viáveis/ml de sangue de cordão demonstrou média de 371×10^5 células no grupo de prematuros e 74×10^5 células no grupo de termo. Em relação à linhagem eritróide no 8º dia, o grupo de prematuros (11 casos) apresentou média de 284 colônias/ml de sangue de cordão e o grupo de termo (11 casos) 19 colônias ($p=0,003$). Quanto à linhagem granulomonocítica o grupo dos prematuros apresentou média de 196

colônias/ml de sangue de cordão e o de termo 15 colônias ($p=0,003$). Quanto à linhagem mista (CFU-GEMM), o grupo de prematuros apresentou 29 colônias/ ml de sangue de cordão e no de termo não houve crescimento de colônias ($p=0,003$). Quando comparamos os grupos prematuros e de termos, no 14^o dia, observamos que estes apresentaram, respectivamente, média de 358 e 216 colônias eritróides ($p=0,061$), 219 e 120 colônias granulomonocíticas ($p=0,075$) e 41 e 23 colônias mistas ($p=0,040$). As figuras 2 a 12 exemplificam os resultados obtidos nos ensaios clonogênicos

3. Criopreservação

Foram analisadas 19 amostras de sangue de cordão quanto ao tempo de criopreservação, ao número de células, viabilidade celular (contagem em câmara de neubauer e teste de exclusão pelo azul de tripan), número de células CD34⁺ (imunofenotipagem por citometria de fluxo, analisados 30.000 eventos) e número de colônias das linhagens hematopoiéticas em cultura em meio semi-sólido de metilcelulose. Os resultados descritos na tabela IV demonstraram que o tempo de congelamento das amostras, variou entre 15 a 75 dias, com média de 39 dias. O número de células viáveis pré -congelamento foi de 1×10^7 células e após o descongelamento houve uma variação de 0,2 a 1×10^7 células com média de $0,6 \times 10^7$. O número de células CD34⁺/ml pré congelamento variou de 0,007% a 1,24%, com média de 0,64% (Fig 13 A). Após o descongelamento a variação foi de 0,24% a 1,74%, com média de 1,0% (Fig 13 B) O número de colônias de linhagem vermelha pré - congelamento variou de 210 a 580, com média de 403 colônias e após - descongelamento variou de 15 a 500, com média de 238 colônias. Na linhagem granulomonocítica pré - congelamento houve uma variação de 120 a 540 colônias, com média de 246 colônias e após o descongelamento variou de 81 a 300, com média de 155 colônias. A linhagem mista pré congelamento variou de 21 a 69 com média de 37 colônias e após o descongelamento variou de 4 a 75 com média de 29 colônias. As figuras 14 a 18 exemplificam estes resultados.

4. Transplante de células mononucleares de sangue de cordão em camundongos de linhagem SCID

Foram realizados 4 experimentos, transplantando-se 21 camundongos da linhagem SCID/SCID, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP. A pega na 8ª semana foi comprovada em 6 dos 21 camundongos e 15 morreram na 1ª semana pós irradiação e infusão de células mononucleares de sangue de cordão humano.

A análise da pega, através de cultura em meio semi sólido de metilcelulose com fatores estimulantes de crescimento recombinantes específicos para células de linhagem hematopoiética humana foi positiva em 5 dos 6 camundongos, com intensa proliferação celular, mesmo quando utilizadas $1,0 \times 10^5$ células/ml de meio para a semeadura, deste modo não foi possível contar as colônias. As figuras 19 a 29 exemplificam estes resultados.

A imunofenotipagem por citometria de fluxo, com anticorpos monoclonais para proteínas humanas foi feita em amostras de sangue periférico, macerado de pulmão, de baço e de lavado de medula óssea e foi positiva em 3 dos 6 camundongos. Foram analisados 6.000 a 10.000 eventos . A porcentagem de células captadas pelos anticorpos em relação ao campo de linfócitos foi a seguinte:

Sangue periférico: 400 células; CD45=26,03%; CD2=4,50%; CD3=30,14%, CD19=1,03%.
(Fig 30)

Pulmão: 2500 células; CD45=18,65%; CD3=16,32%. CD19=0,37%. (Fig 31)

Medula óssea: 1000 células; CD45=12,80%; CD3=4,45%; CD8=0,85%; CD34=0,03%.
(Fig 32)

Baço: 2300 células; CD45=36,84%, CD3=28,27%; CD19=1,62% (Fig 33).

Não houve marcação das células de um camundongo sacrificado num dos experimentos, não transplantado nem irradiado.

Tabela I. Análise das bolsa de sangue de cordão umbilical humano coletadas no período de junho de 1996 a agosto de 1998

bolsa n ^o	Idade (semanas) Gestacional	volume coletado	células viáveis/ml	CFU/BFU-E/ ml	CFU-GM/ ml	CFU-GEMM/ ml
1	40	100 ml	15.6 x 10 ⁵	420	360	23
2	39	80 ml	13.6 x 10 ⁵	150	60	6
3	38	50 ml	3.2 x 10 ⁵	395	15	23
4	41	50 ml	3.4 x 10 ⁵	375	130	47
5	38	83 ml	11.2 x 10 ⁵	225	41	15
6	39	110 ml	76.6 x 10 ⁵	16	25	0
7	37	20 ml	1.0 x 10 ⁵	190	180	27
8	40	116 ml	9.8 x 10 ⁵	240	258	18
9	41	50 ml	32.0 x 10 ⁵	0	0	0
10	38	55 ml	35.4 x 10 ⁵	0	0	0
11	39	40 ml	20.8 x 10 ⁵	150	165	30
12	36	50 ml	48.0 x 10 ⁵	460	225	39
13	35	40 ml	38.0 x 10 ⁵	293	142	25
*14	32	40 ml	59.0 x 10 ⁵	210	69	12
*15	32	50 ml	66.0 x 10 ⁵	200	144	30
16	38	50 ml	49.0 x 10 ⁵	0	0	0
17	38	55 ml	32.5 x 10 ⁵	0	0	0
18	39	50 ml	10.0 x 10 ⁵	0	0	0
19	37	60 ml	69.0 x 10 ⁵	0	0	0
20	40	60 ml	14.0 x 10 ⁵	87	96	4
21	40	50 ml	28.0 x 10 ⁵	88	54	21
*22	38	50 ml	40.4 x 10 ⁵	54	25	7
*23	39	40 ml	72.0 x 10 ⁵	73	29	4
*24	36	70 ml	42.6 x 10 ⁵	210	158	29
*25	28	20 ml	52.0 x 10 ⁵	180	140	13
26	28	20 ml	277.0 x 10 ⁵	0	0	0
*27	38	30 ml	74.0 x 10 ⁵	150	122	13
*28	39	48 ml	58.0 x 10 ⁵	71	61	16
*29	38	86 ml	86.0 x 10 ⁵	65	80	10
*30	28	20 ml	60.0 x 10 ⁵	200	180	40
31	40	23 ml	135.8 x 10 ⁵	258	109	26
32	41	140ml	28,1 x 10 ⁵	347	57	67
33	32	1ml	111,0 x 10 ⁵	28	13	3
34	38	100ml	30,0 x 10 ⁵	72	92	12
35	39	12ml	100,0 x 10 ⁵	45	35	10
36	38	45ml	26,0 x 10 ⁵	142	177	20
37	40	16ml	3,8 x 10 ⁵	0	0	0

38	39	80ml	$17,0 \times 10^5$	0	0	0
39	38	60ml	70×10^5	13	1	0
40	39	60ml	$35,0 \times 10^5$	8	10	0
41	38	20ml	$26,0 \times 10^5$	1	1	0
42	40	55ml	$140,0 \times 10^5$	3	1	1
43	41	59ml	$90,0 \times 10^5$	0	0	0
44	37	60ml	$80,0 \times 10^5$	19	7	1
45	38	70 ml	$80,0 \times 10^5$	0	0	0
46	38	70 ml	$225,0 \times 10^5$	0	0	0
47	39	120ml	$140,0 \times 10^5$	0	0	0
*48	31	5ml	$150,0 \times 10^5$	476	268	37
49	32	5ml	$480,0 \times 10^5$	0	0	0
50	27	5ml	$360,0 \times 10^5$	0	0	0
51	39	60ml	$625,0 \times 10^5$	501	250	46
52	38	60 ml	$33,3 \times 10^5$	449	401	35
53	36	100 ml	$30,0 \times 10^5$	409	285	36
54	37	68 ml	$33,0 \times 10^5$	318	288	21
55	32	5ml	$104,0 \times 10^5$	391	171	50
56	32	5ml	$140,0 \times 10^5$	463	329	65
57	38	70ml	$150,0 \times 10^5$	288	179	27
58	38	60ml	$6,2 \times 10^5$	380	270	28
59	37	40ml	$27,0 \times 10^5$	361	239	30
60	40	46ml	$24,0 \times 10^5$	671	265	32
61	38	78ml	$3,0 \times 10^5$	370	290	25
62	39	40ml	$25,6 \times 10^5$	495	141	22
63	38	34ml	$22,2 \times 10^5$	347	171	32
64	37	70ml	$50,0 \times 10^5$	380	295	47
*65	39	40ml	$43,0 \times 10^5$	210	140	23
*66	41	20ml	$125,0 \times 10^5$	294	120	29
*67	40	120ml	$84,0 \times 10^5$	354	130	25
*68	39	70ml	$65,0 \times 10^5$	351	332	40
*69	38	70ml	$120,0 \times 10^5$	540	540	60
*70	31	10ml	$2500,0 \times 10^5$	580	273	69
*71	28	5ml	$566,0 \times 10^5$	380	230	49
*72	20	5ml	$220,0 \times 10^5$	218	198	28
*73	28	5ml	$149,6 \times 10^5$	480	210	63
*74	20	2ml	$232,0 \times 10^5$	535	480	65
*75	20	10ml	$23,2 \times 10^5$	450	280	45
Média		56,5	118,7	215,5	133,8	21,6
± DP		66,1	303,0	189,8	128,7	19,9

(*) bolsas de sangue de cordão selecionadas para comparação de neonatos prematuros e de termo.

Tabela II. Número de colônias de CFU-E (E), CFU-GM (GM) e CFU-GEMM (M) em cultura de sangue de cordão umbilical de recém-nascidos prematuros e de termo no 8º e 14º dias de cultura

RN Prematuro (20-32 semanas)						RN Termo (33-41 semanas)					
8º dia de cultura			14º dia de cultura			8º dia de cultura			14º dia de cultura		
E	GM	M	E	GM	M	E	GM	M	E	GM	M
160	140	30	200	144	30	14	14	0	54	25	7
115	130	13	180	140	13	5	5	0	73	29	4
170	150	40	200	180	40	4	4	0	210	158	29
468	311	20	476	268	37	8	8	0	150	122	13
420	250	48	580	273	69	6	6	0	71	61	16
350	230	30	380	230	49	4	4	0	65	80	10
180	198	20	218	198	28	10	8	0	210	140	23
280	180	40	480	210	63	20	13	0	294	120	29
380	290	30	535	480	65	35	20	0	354	130	25
420	230	40	480	280	45	45	38	0	351	332	40
180	50	12	210	69	12	50	40	0	540	540	60

Tabela III. Análise do número de CFU-C, das culturas de sangue de cordão de neonatos prematuros e de termo no 8º e no 14º dias de cultura, os resultados são apresentados sob forma de média com desvio padrão

	RN prematuros (20-32 semanas)		RN de termo (33-41 semanas)	
	8º (n=11)	14º (n=11)	8º (n=11)	14º (n=11)
Vol. Coletado (ml)	16 ± 16		58 ± 28	
Céls viáveis/ml	371x10 ⁵ ± 723		74x10 ⁵ ± 29	
CFU/BFU-E/ml	284 ± 128	358 ± 157	19 ± 17	216 ± 156
CFU-GM/ml	196 ± 77	219 ± 110	15 ± 13	120 ± 88
CFU-GEMM/ml	29 ± 12	41 ± 20	0	23 ± 16

Tabela IV. Análise da criopreservação em 19 amostras de sangue de cordão umbilical Avaliação da viabilidade celular, n° de CD34⁺, n° de CFU-C, pré-congelamento e pós-descongelamento

n° das bolsas	Δt congel. (dias)	n° de células viáveis		n° de células CD34 ⁺ (ml)		n° de CFU-E/BFU-E (ml)		n° de CFU-GM (ml)		n° de CFU-GEMM (ml)	
		pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós	pré	pós
52	15	1,0x10 ⁷	1,0x10 ⁷	1,19%	1,14%	449	278	401	139	35	26
53	15	1,0x10 ⁷	0,9x10 ⁷	0,82%	0,84%	409	210	285	119	35	22
54	15	1,0x10 ⁷	0,89x10 ⁷	0,62%	0,52%	318	176	288	102	21	20
55	15	1,0x10 ⁷	0,5x10 ⁷	1,24%	1,41%	391	275	171	230	50	75
56	15	1,0x10 ⁷	0,6x10 ⁷	0,91%	1,09%	463	190	329	180	65	55
57	45	1,0x10 ⁷	0,6x10 ⁷	0,63%	0,50%	288	197	179	142	27	25
58	45	1,0x10 ⁷	0,5x10 ⁷	0,40%	0,73%	380	278	270	178	28	25
59	45	1,0x10 ⁷	0,2x10 ⁷	0,30%	0,53%	361	415	239	81	30	22
60	40	1,0x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,07%	1,15%	671	350	265	252	32	32
61	40	1,0x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,13%	1,23%	370	409	290	232	25	37
62	45	1,0x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,93%	0,29%	495	235	141	137	22	26
63	45	1,0x10 ⁷	0,7x10 ⁷	0,50%	1,58%	347	192	171	162	32	16
64	46	1,0x10 ⁷	0,2x10 ⁷	0,45%	3,77%	380	107	295	58	47	7
65	46	1,0x10 ⁷	0,3x10 ⁷	0,43%	0,24%	210	84	140	65	23	12
66	46	1,0x10 ⁷	0,5x10 ⁷	0,16%	0,16%	294	202	120	136	29	22
67	46	1,0x10 ⁷	0,2x10 ⁷	0,88%	1,39%	354	101	130	98	25	11
68	46	1,0x10 ⁷	0,9x10 ⁷	0,88%	0,62%	351	15	332	43	40	4
69	46	1,0x10 ⁷	1,4x10 ⁷	0,80%	0,55%	540	28	540	49	60	4
70	75	1,0x10 ⁷	0,35x10 ⁷	0,85%	1,74%	580	500	273	300	69	75
Média	38,5	1,0x10 ⁷	0,56x10 ⁷	0,64%	1,02%	402,7	237,6	245,8	154,7	37,1	29,3
±DP	16,06	-	0,33	0,34	0,81	110,0	132,2	110,1	77,7	15,4	20,6

Tabela V. Características dos camundongos SCID transplantados

	Nº de camundongos	Sexo		Idade em semanas		Óbito na 1ª semana pós Tx		Pega na 8ª semana pós Tx
		Fêmea	Macho	Tx	Sacrifício	Fêmeas	Machos	
Transplantados (Tx)	21	6	15	8	16	4	11	6
Não transplantado	1				8			

Sangue de cordão de neonatos de termo

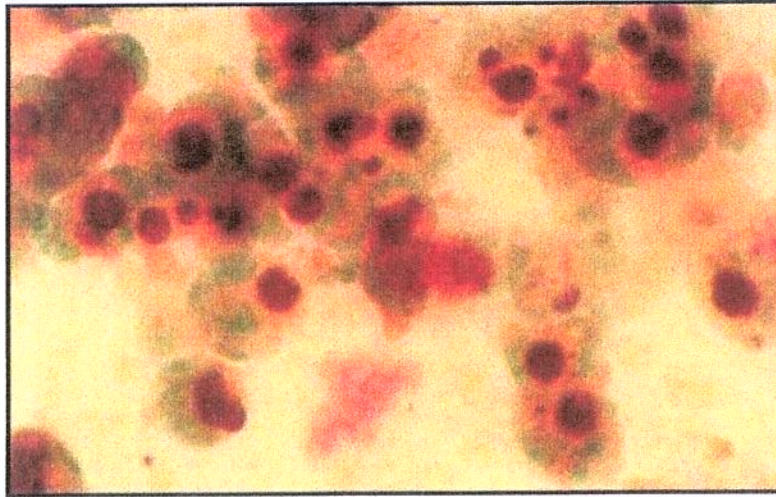


Figura 2: Esfregaço de células de cultura de sangue de cordão em meio de agar, no 14^o dia de cultura coradas com azul de Coomassie.

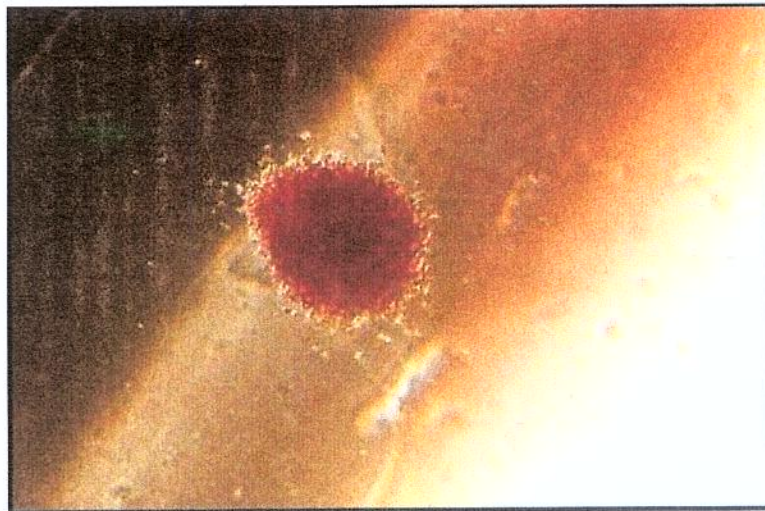


Figura 3: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de CFU-GEMM, no 14^o dia de cultura

Sangue de cordão de neonatos de termo



Figura 4: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de CFU-E em hemoglobinizacão, no 14^o dia de cultura

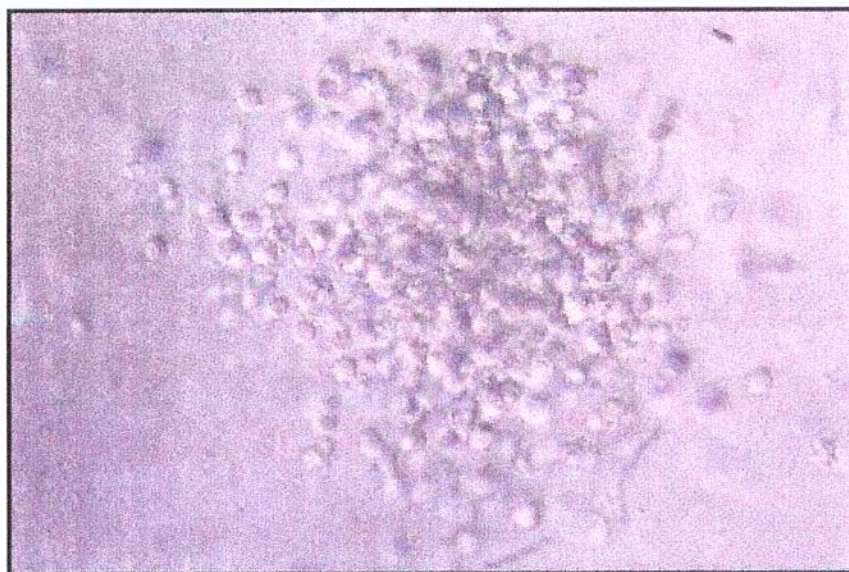


Figura 5: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de CFU-GM em aumento de 10X no 14^o dia de cultura

Sangue de cordão de neonatos de termo

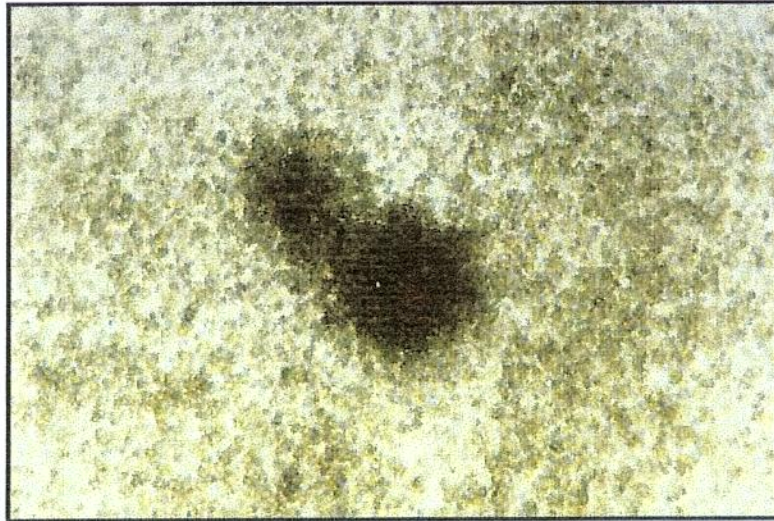


Figura 6: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de CFU-GM, no 14^o dia de cultura

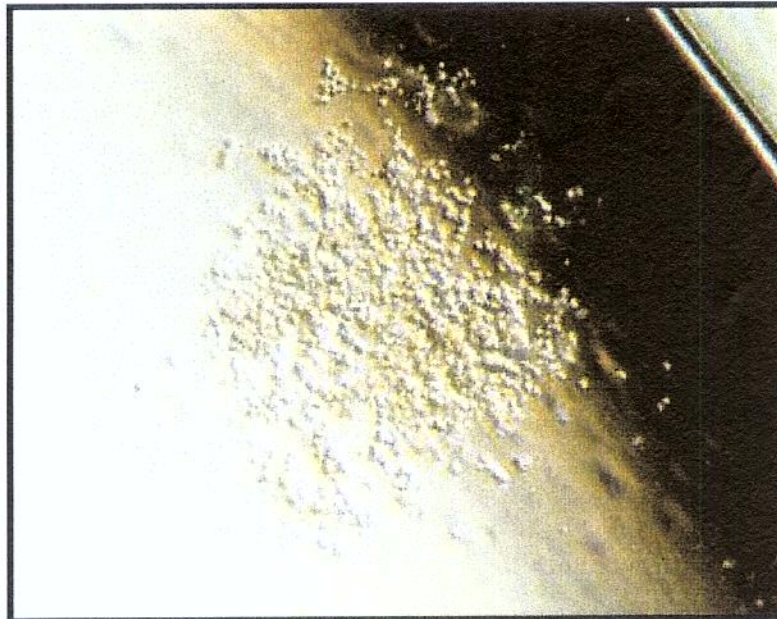


Figura 7: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de CFU-GM, no 14^o dia de cultura

Sangue de cordão de neonatos de termo

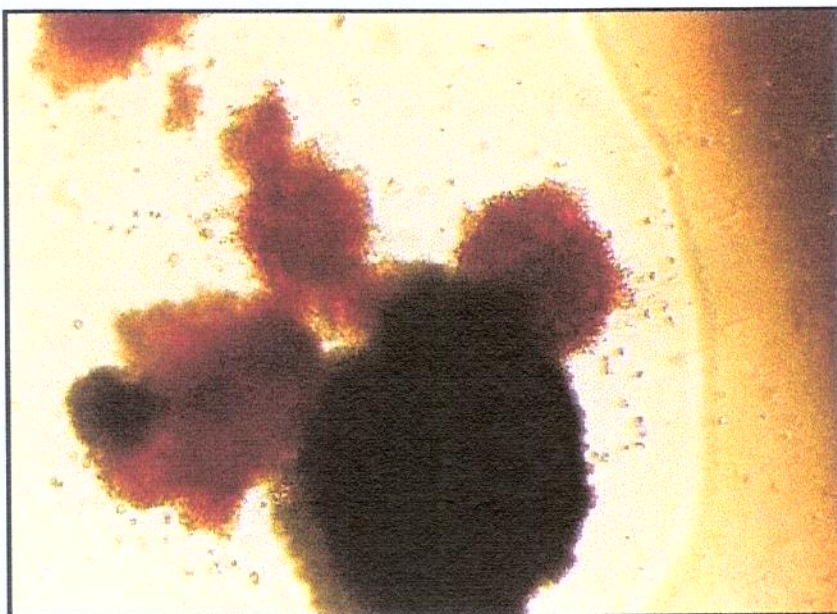


Figura 8: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, demonstrando colônia de BFU-E, no 21^o dia de cultura

Sangue de cordão de neonatos prematuros

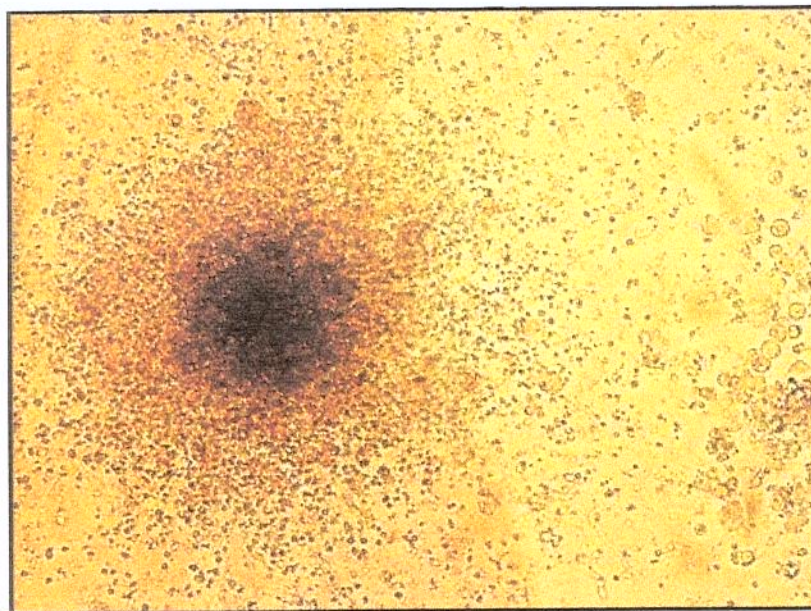


Figura 9: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 8^o dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-GM

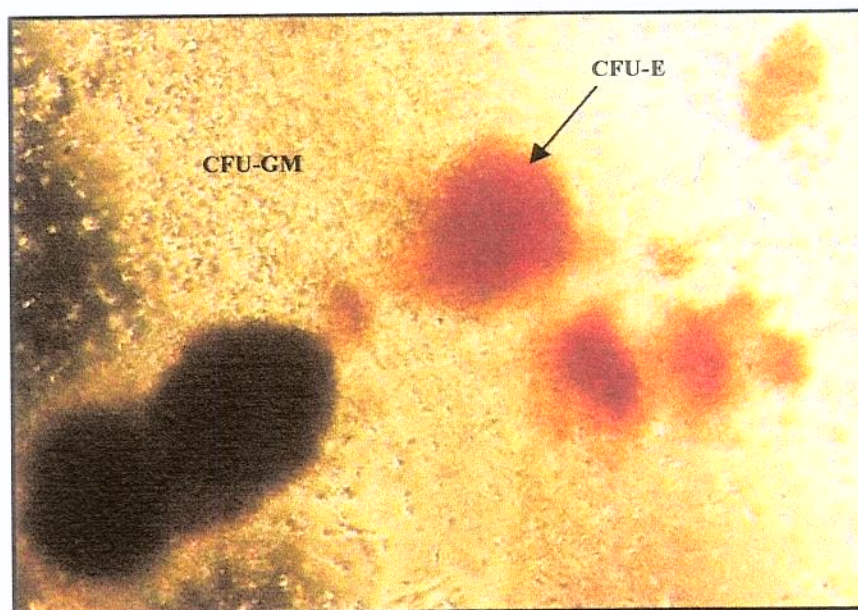


Figura 10: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 8^o dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinizacão e CFU-GM. Há intensa proliferação

Sangue de cordão de neonatos prematuros

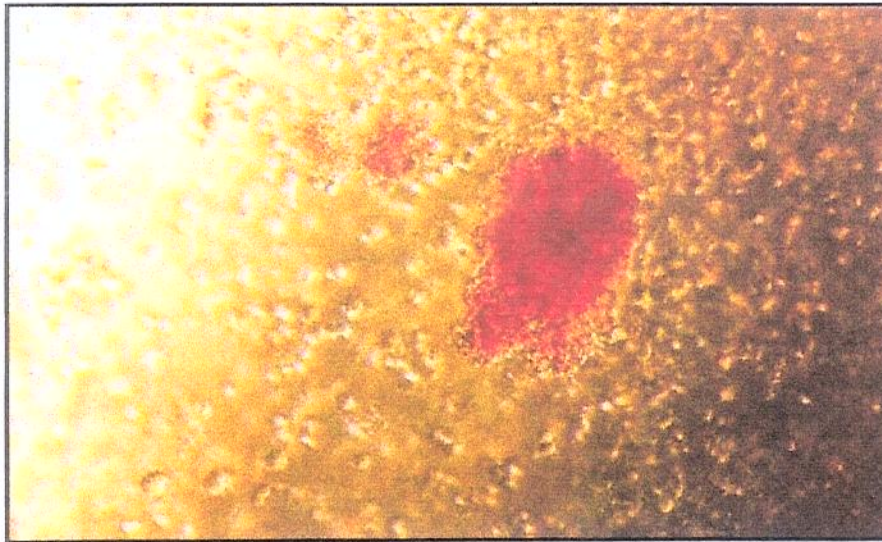


Figura 11: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulomonocítica

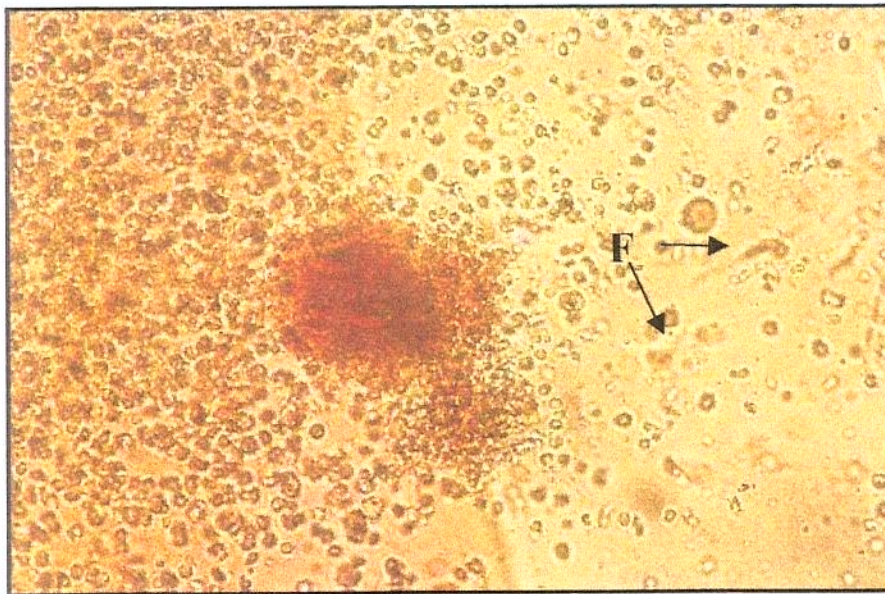


Figura 12: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-E e intensa proliferação da linhagem granulomonocítica, notando-se a presença de fibroblastos (F).

Citometria de fluxo – Criopreservação

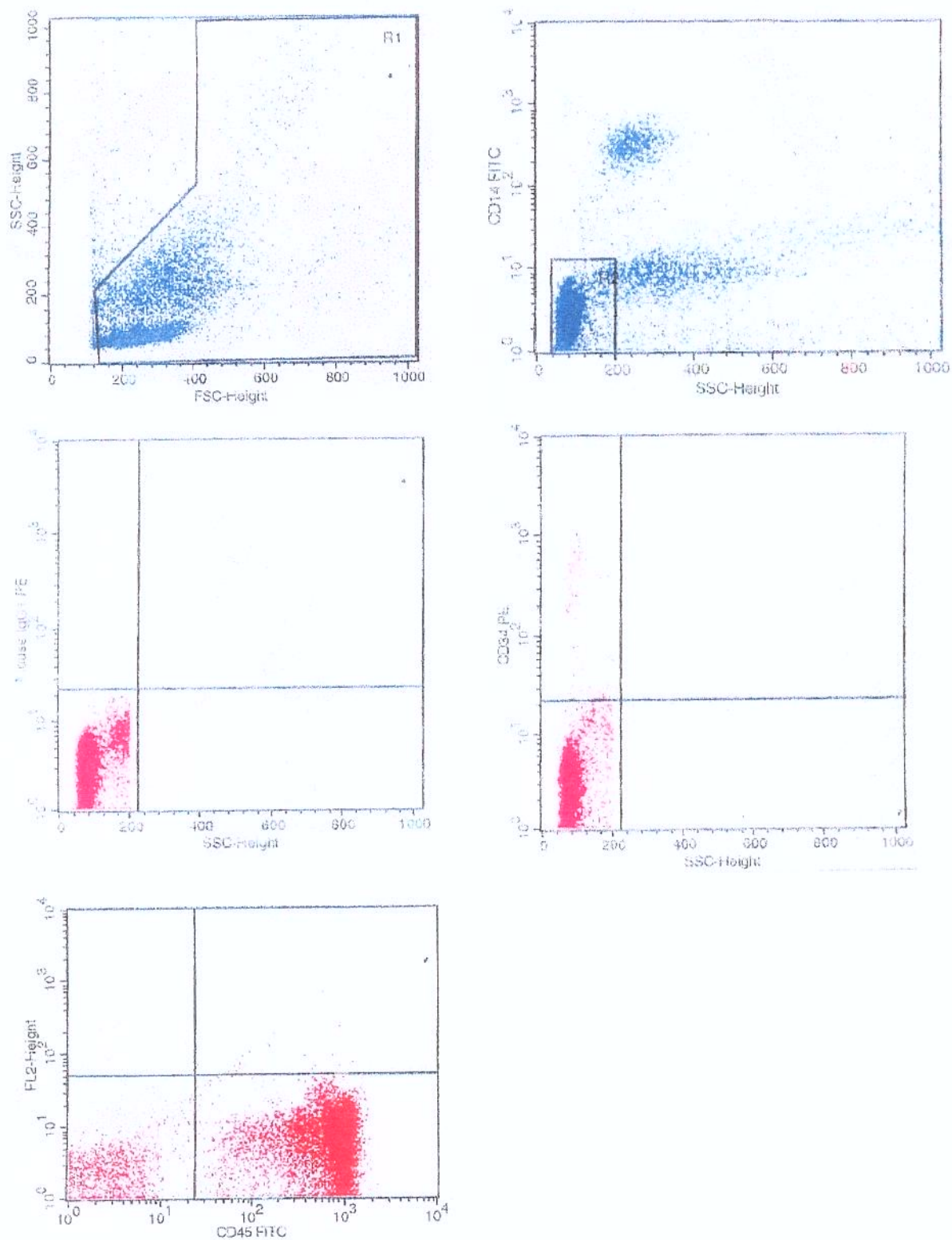


Figura 13A: Resultado da análise da citometria de fluxo da porcentagem das células $CD34^+$ do estudo de criopreservação (Congelamento)

Citometria de fluxo – Criopreservação

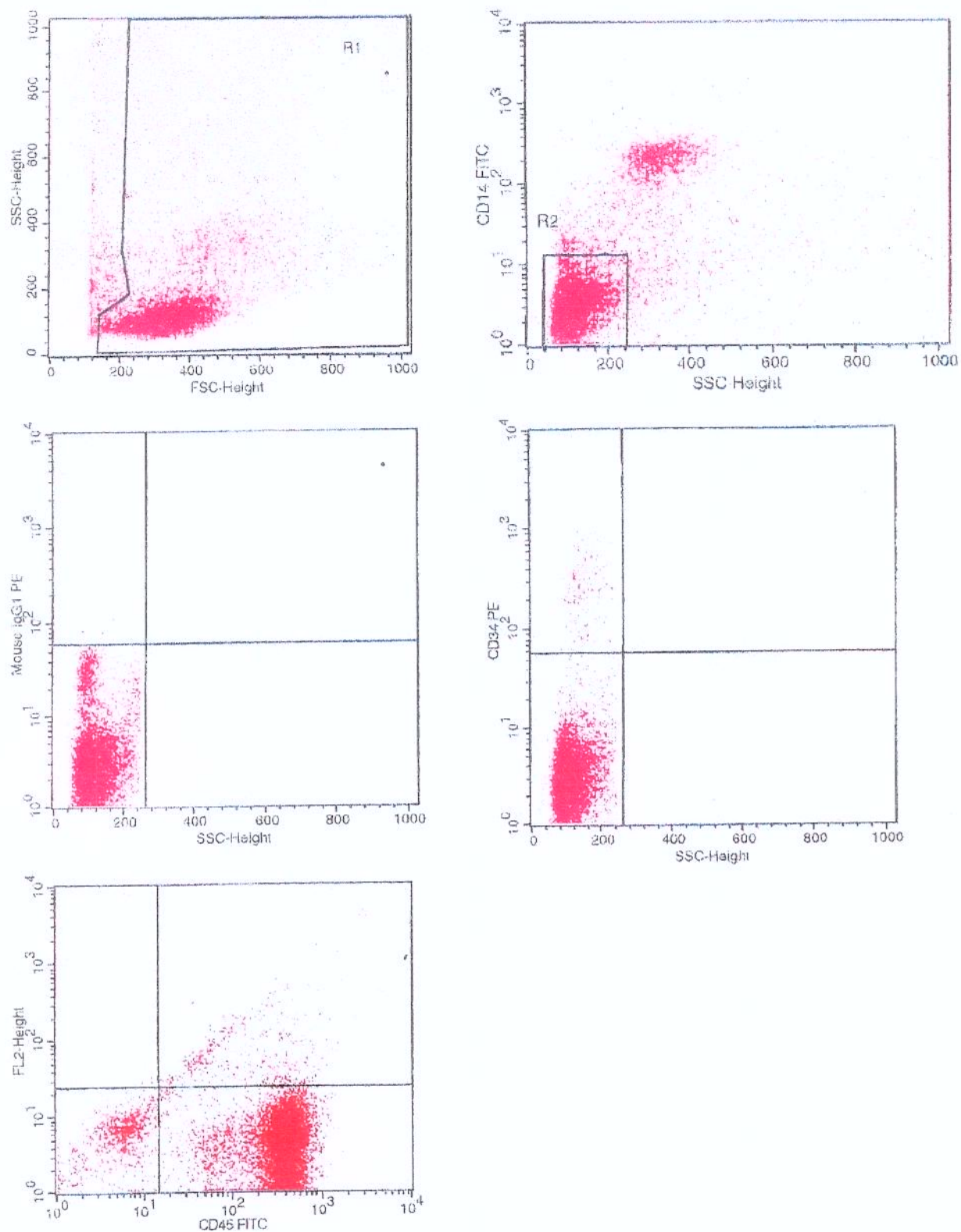


Figura 13B: Resultado da análise da citometria de fluxo da porcentagem das células CD34⁺ do estudo de criopreservação (Descongelamento)

Sangue de cordão de neonato de termo pós descongelamento

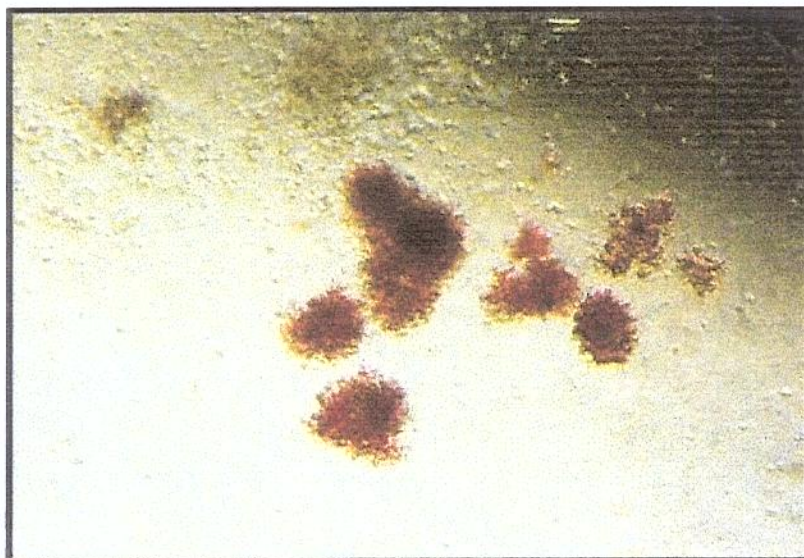


Figura 14: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-E em diferentes fases de hemoglobinização e colônia de CFU-GM

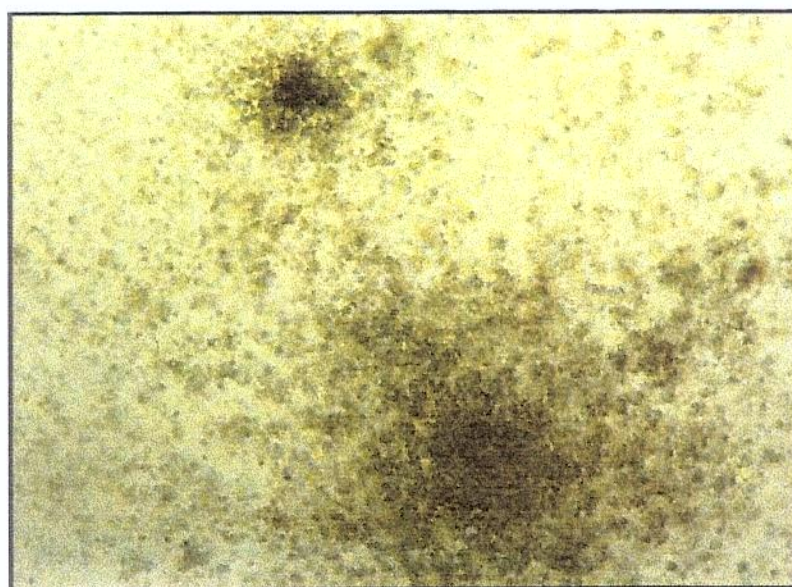


Figura 15: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando colônias de CFU-GM

Sangue de cordão de neonato de termo pós descongelamento

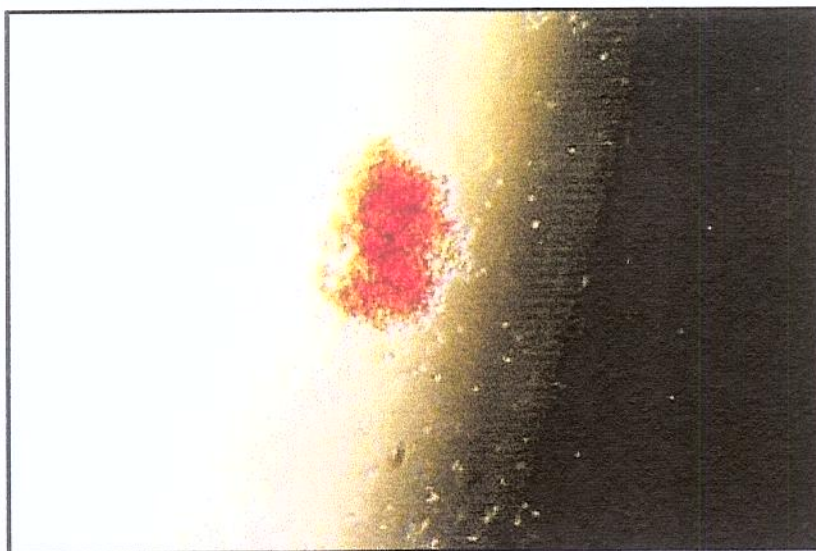


Figura 16: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando colônia de CFU-GEMM

Sangue de cordão de neonato prematuro após descongelamento

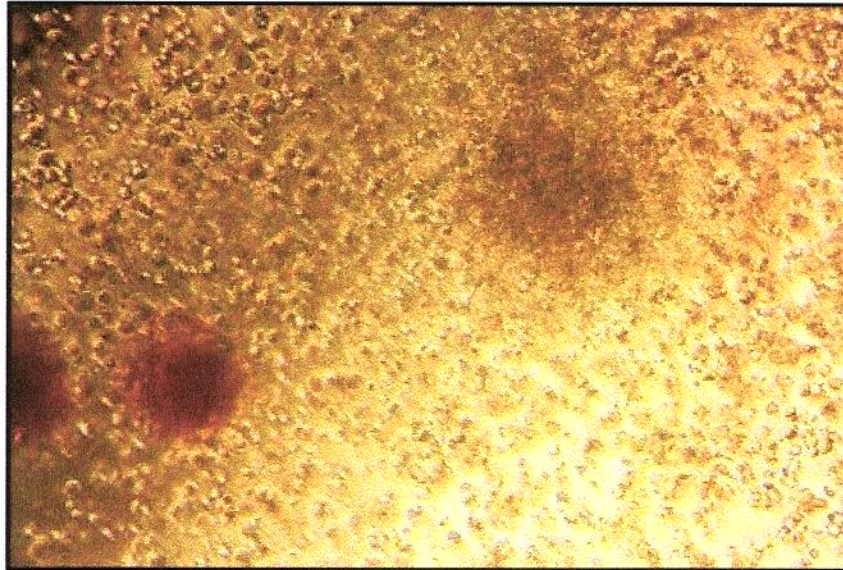


Figura 17: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando intensa proliferação celular e colônias de CFU-E e de CFU-GM

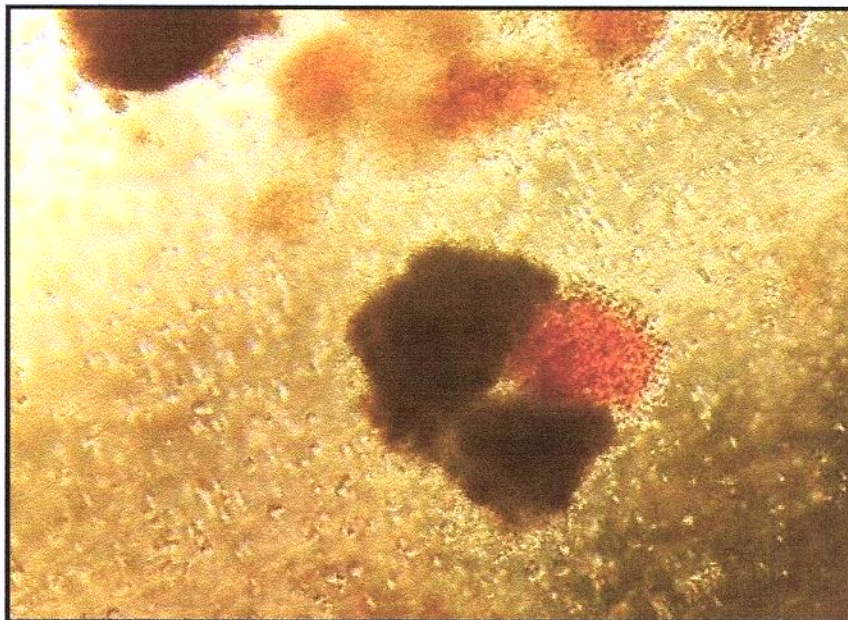


Figura 18: Cultura de sangue de cordão, em meio de metilcelulose, no 14^o dia de cultura, demonstrando intensa proliferação celular e colônias de BFU-E, de CFU-E em hemoglobinizacão e de CFU-GM

***Culturas em meio de metilcelulose de células de lavado de medula
óssea de camundongos transplantados***

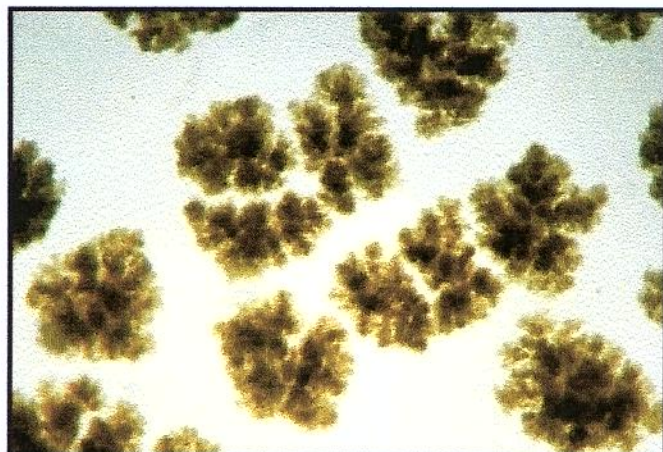


Figura 19: Cultura no 14^o dia – aumento 5x

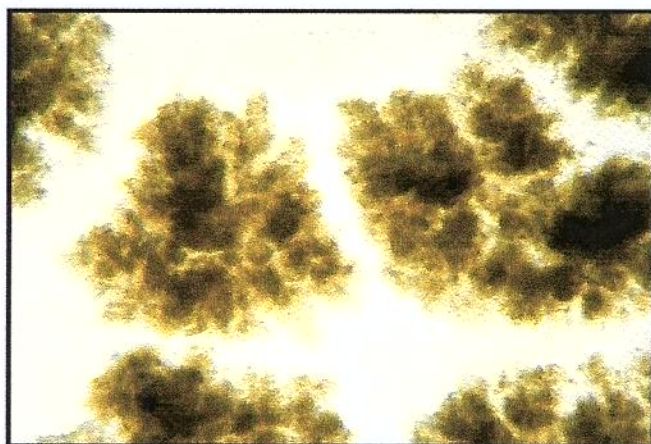


Figura 20: Cultura no 14^o dia – aumento 10x

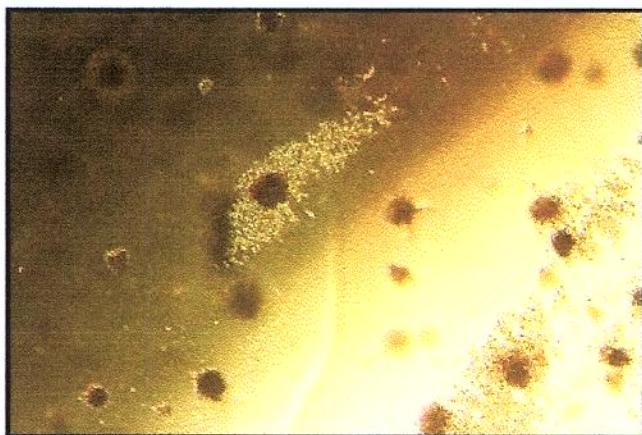


Figura 21: Cultura no 8^o dia

***Culturas em meio de metilcelulose de células de lavado de medula
óssea de camundongos transplantados***



Figura 22: Cultura no 8^o dia – aumento 5x

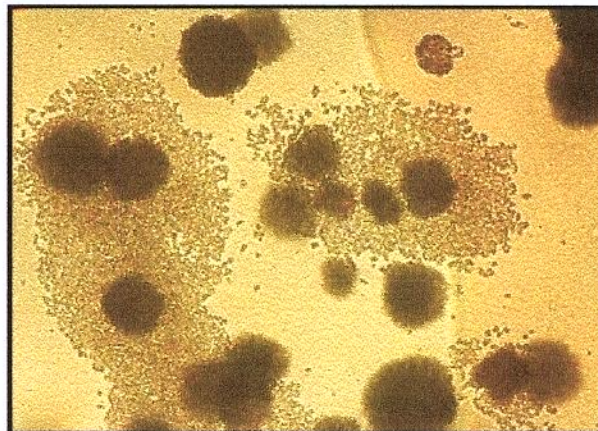


Figura 23: Cultura no 8^o dia – aumento 10x

***Culturas em meio de metilcelulose de células de lavado de medula
óssea de camundongos transplantados***

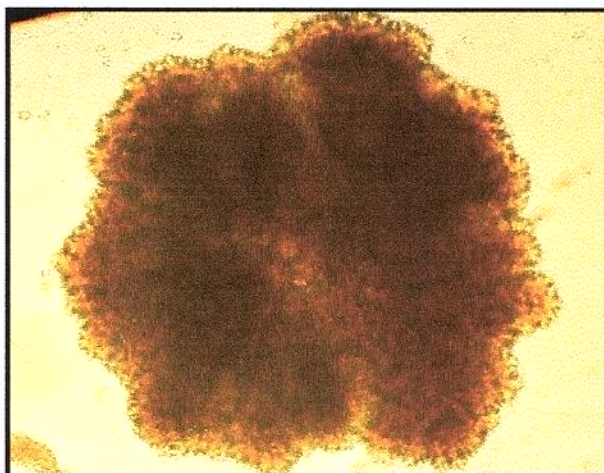


Figura 24: Cultura 14^o dia

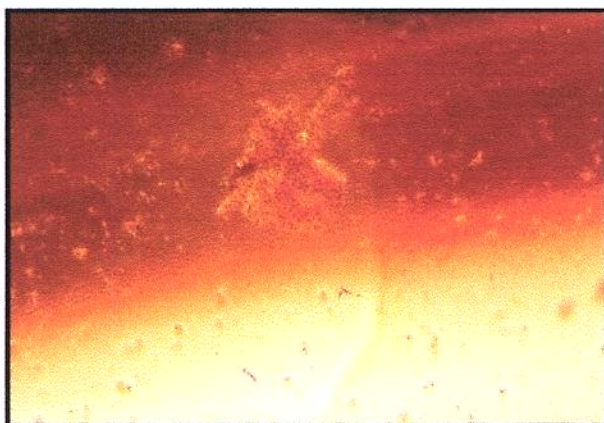


Figura 25: Cultura no 8^o dia, colônia de linhagem eritróide em hemoglobinização

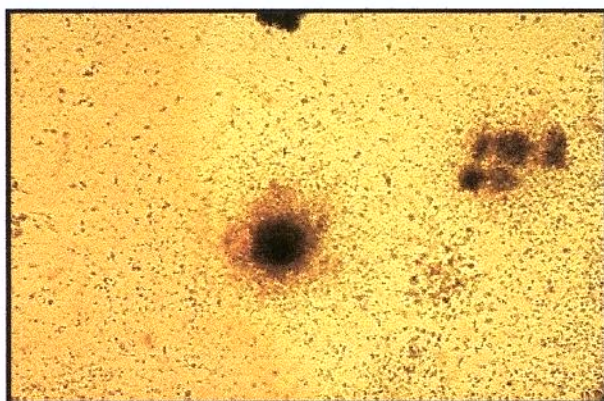


Figura 26: Cultura no 8^o dia, colônia de linhagem eritróide

***Culturas em meio de metilcelulose de células de lavado de medula
óssea de camundongos transplantados***

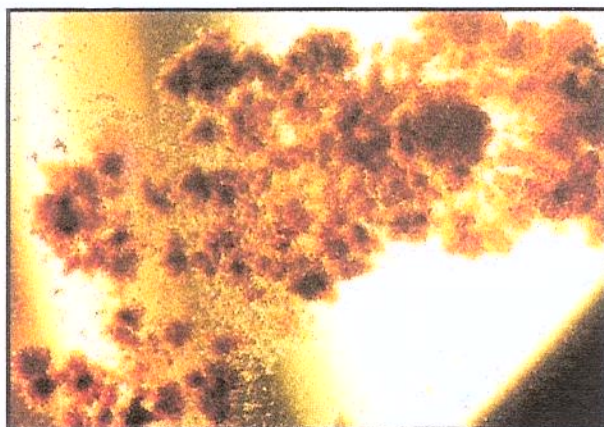


Figura 27: Cultura no 14^o dia, colônia de linhagem eritróide – fase adiantada de hemoglobinação

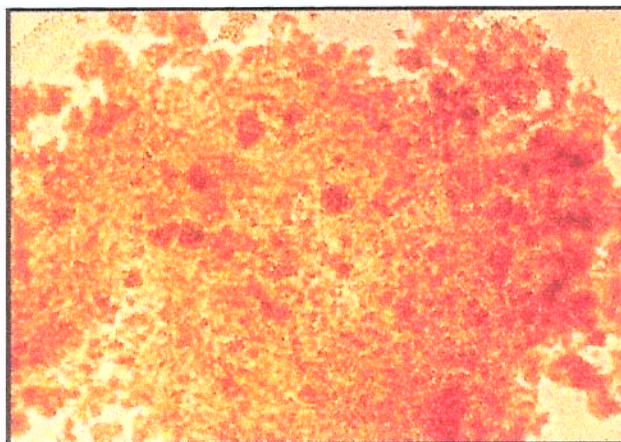


Figura 28: Cultura no 14^o dia, colônia de linhagem eritróide – fase precose de hemoglobinação

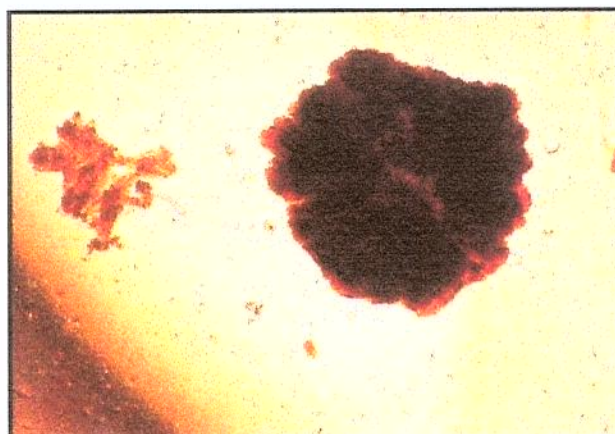


Figura 29: Cultura no 14^o dia, colônia de linhagem eritróide

Citometria de fluxo – Transplante de camundongos

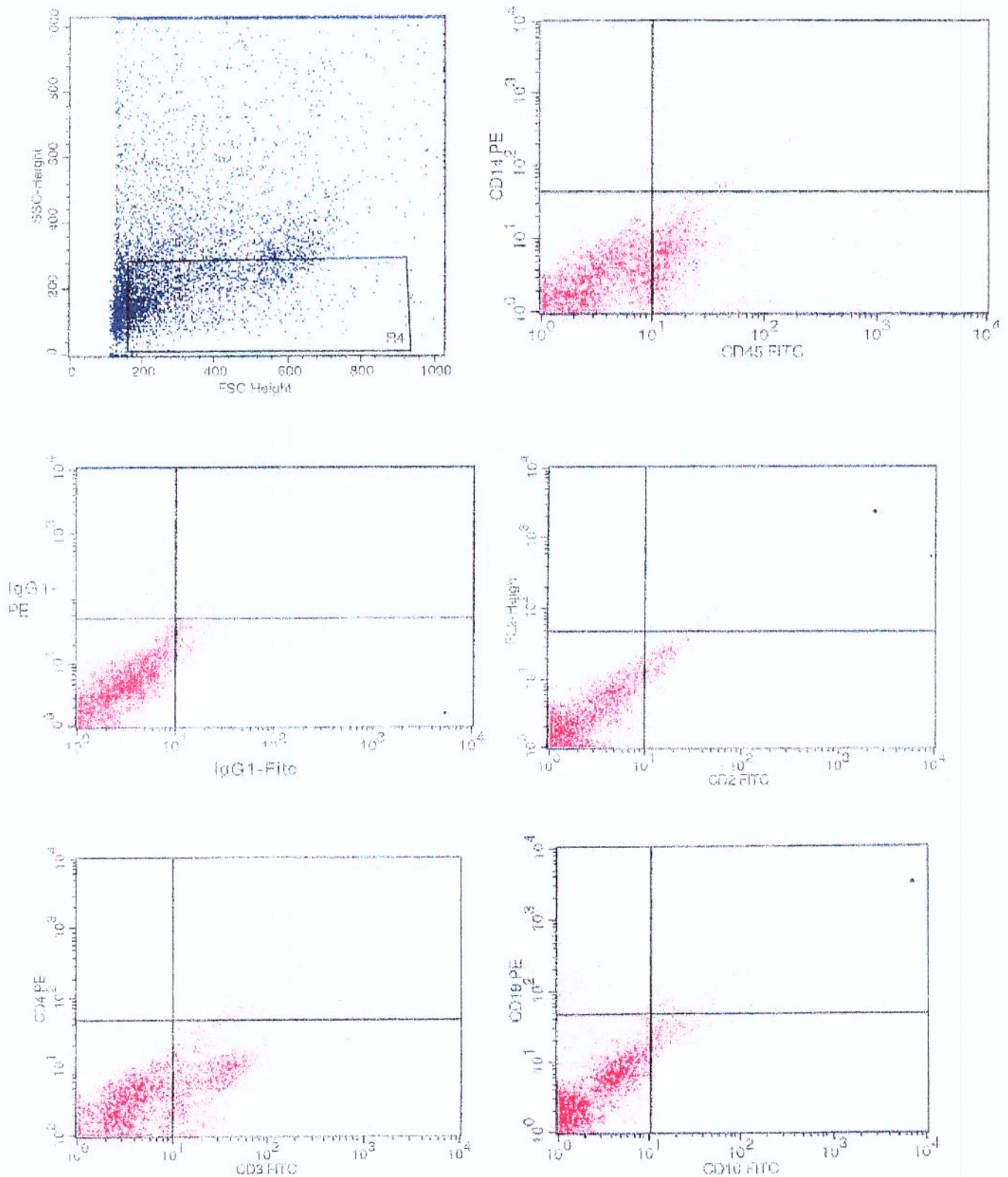


Figura 28: Resultados da análise de citometria de fluxo do transplante dos camundongos SCID - Sangue Periférico

Citometria de fluxo – Transplante de camundongos

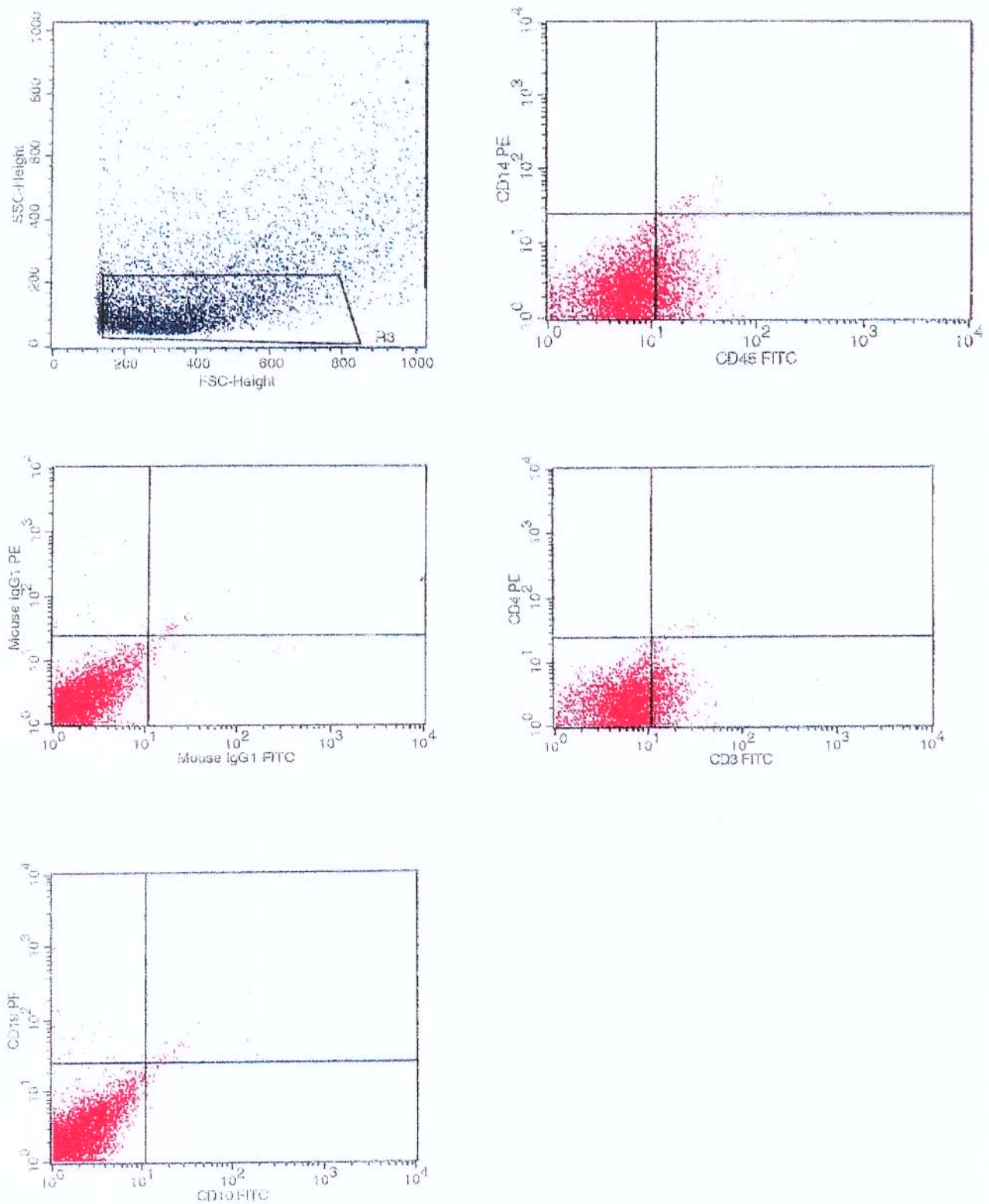


Figura 29: Resultados da análise de citometria de fluxo do transplante dos camundongos SCID - Pulmão

Citometria de fluxo – Transplante de camundongos

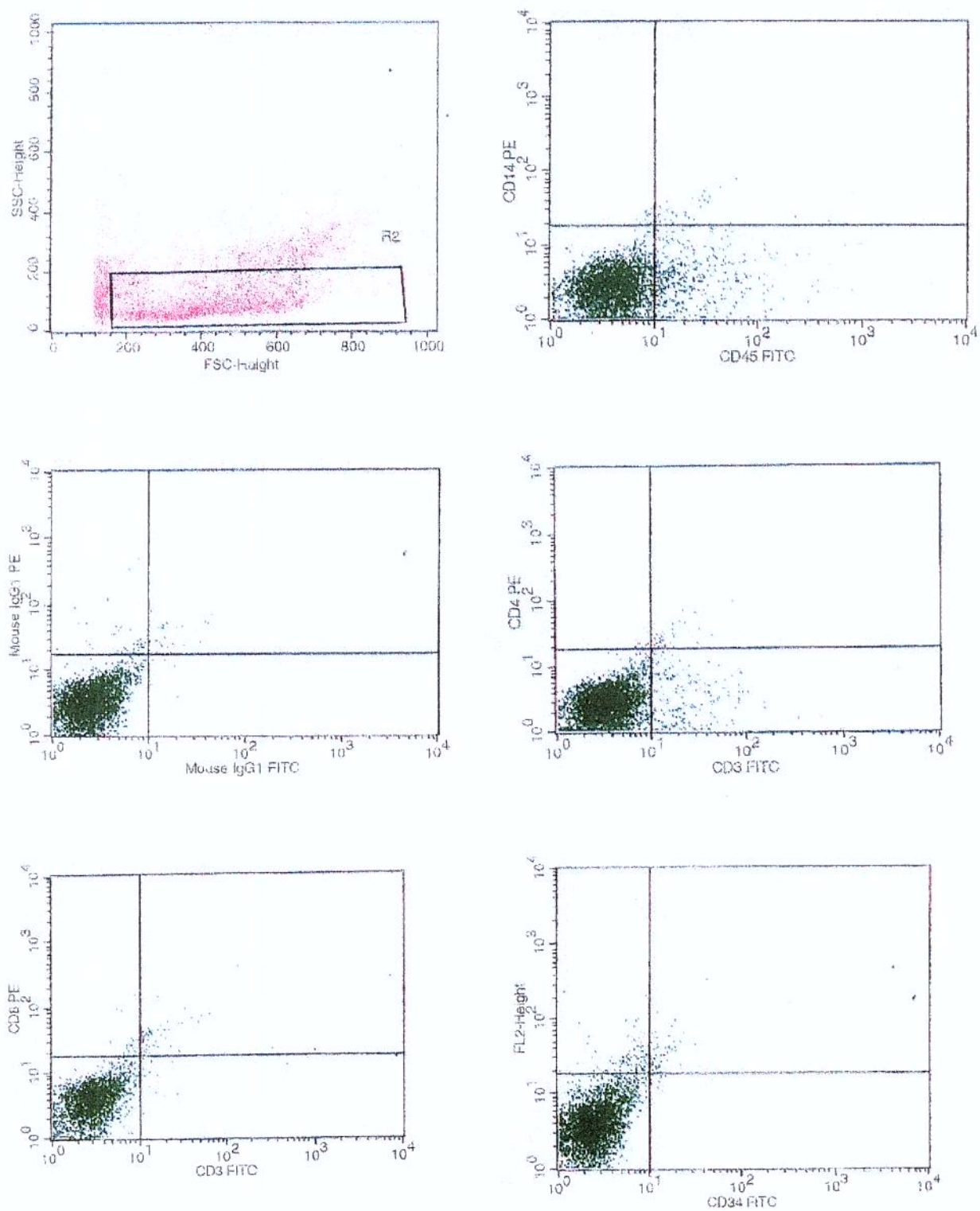


Figura 30: Resultados da análise de citometria de fluxo do transplante dos camundongos SCID - Medula Óssea

Citometria de fluxo – Transplante de camundongos

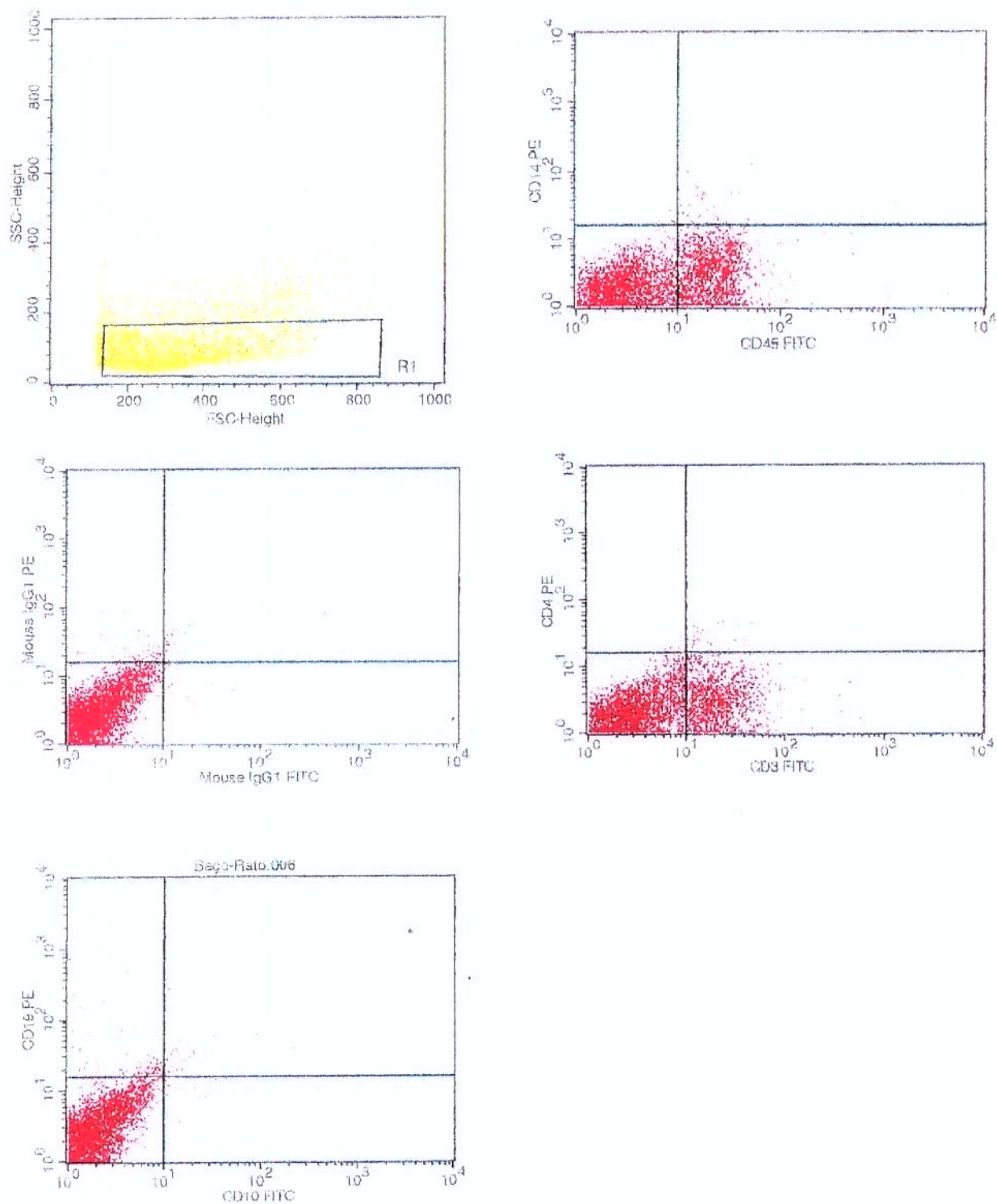


Figura 31: Resultados da análise de citometria de fluxo do transplante dos camundongos SCID - Baço



Discussão

1. Coleta e avaliação celular

No presente trabalho, o sangue de cordão umbilical humano foi coletado através de sistema fechado, durante o período de dequitação placentária de trabalhos de parto normal (preferencialmente) ou cesárea, em bolsa de sangue específica para sangue de cordão. Demonstrou ser material de fácil obtenção e manipulação pois foi coletado por várias pessoas que não tiveram dificuldade em realizar o procedimento. Todas as gestantes consentiram na doação, tendo sido excluídas as que apresentaram ruptura de bolsa amniótica acima de 6 horas anteriores ao parto, temperatura materna acima de 38^o C, presença de mecônio no líquido amniótico 3+/4+, gestante portadora de Diabetes Mellitus e gestante portadora de hipertensão arterial sistêmica. Foram consideradas aptas, gestantes que estivessem em trabalho de parto, sem intercorrências clínicas ou obstétricas.

O sangue de cordão pode ser coletado também num sistema aberto, após o período de dequitação, portanto com a placenta fora do organismo materno. Neste sistema, todos os vasos placentários podem ser puncionados, sendo grande o risco de contaminação e o volume coletado não difere muito do obtido via sistema fechado. Assim, a vantagem do sistema fechado é diminuir o risco de contaminação e possibilitar uma coleta de maior volume, já que a placenta se encontra sob a ação das contrações uterinas.

A variação de volume coletado observada no presente trabalho correlacionou-se com a idade gestacional. A maioria das bolsas coletadas com baixo volume (1,2, 5 e 10 ml) eram de prematuros, onde a placenta tem baixo peso. A média de volume coletado neste estudo está de acordo com os dados de trabalhos já publicados como o de Bertolini *et al* (1995) que avaliaram 527 procedimentos de coleta de sangue de cordão. Estes autores não encontraram correlação do volume de sangue coletado com o tipo de parto e obtiveram volume médio de 72 ± 34 ml DP nos partos via vaginal e de 62 ± 19ml DP nas cesareanas. Também não encontraram diferença significativa no volume coletado quando comparados os sistemas fechado e aberto entretanto, como era esperado, houve uma maior incidência de contaminação (12,5%) no sistema aberto em relação ao fechado (3,3%). Estes dados já haviam sido descritos, mas numa casuística menor (14 bolsas), por Miniero *et al* em 1993.

Grande variação na celularidade das bolsas coletadas, como observada em nosso estudo, é compatível com os resultados de Falkenburg *et al* (1993) e Harris *et al* (1994). Entretanto Broxmeyer *et al* (1989) notaram diminuição importante no número de células mononucleares quando era utilizado o método de Ficoll-Hipaque, na densidade 1077, para separar as células mononucleares. Estes resultados não foram confirmados nos estudos de Harris *et al* (1994), Newton *et al* (1993) e Bertolini *et al* (1995). Estes últimos autores (Bertolini *et al*, 1995) compararam a dupla separação com Ficoll (densidade de 1077), com o método de separação em gelatina a 3%, proposto por Nagler *et al* (1993), e observaram que, independentemente do método utilizado, houve uma perda de apenas 8 a 14% de células mononucleares. No presente trabalho, foi utilizado o método de separação com Ficoll (densidade de 1077).

A alta viabilidade das células mononucleares, observada neste estudo (cerca de 90%) deve-se, provavelmente, ao fato das bolsas terem sido manipuladas até 24hs após a coleta. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Broxmeyer *et al* (1989) que observaram que amostras manipuladas até um dia após a coleta e mantidas a 4^o C não apresentavam perda de viabilidade das células mononucleares. Entretanto, Bertolini *et al* (1995) descreveram que, acima de 12 horas de armazenamento, pode haver diminuição da viabilidade.

Em nosso estudo obtivemos crescimento adequado de colônias na maioria dos experimentos. Conforme observado por Gluckman *et al* (1992), também neste trabalho não houve correlação entre o volume de sangue coletado e o número de células precursoras, inferido pelo número de colônias contadas nas diversas culturas. Tivemos 15 bolsas nas quais não houve crescimento de colônias nas culturas realizadas. Em 4 destas bolsas houve grande contaminação, provavelmente porque a assepsia do cordão umbilical, antes da coleta, foi inadequada. Nas 11 restantes, não foi possível identificar a causa do não crescimento, pois não houve contaminação, nem problemas com o meio ou temperatura. Tivemos ainda, em 4 bolsas, baixa proliferação de colônias provavelmente, por inativação do meio que estava próximo ao vencimento.

2. Estudos Clonogênicos

Inicialmente, as culturas foram feitas em meio sólido (agar), em triplicata, sendo semeadas 1×10^6 células/ml de meio (padronização já existente para o agar). Os fatores estimulantes utilizados foram sobrenadante de cultura de célula de carcinoma de bexiga, linhagem 5637, e eritropoietina humana recombinante. Nestas culturas houve proliferação adequada, mas sabe-se que colônias de linhagem eritróide, BFU-E e as mistas, CFU-GEMM, assim como as CFU-GM desenvolvem-se melhor em meio semi-sólido de metilcelulose. De acordo com os relatos de Freshney *et al* (1994), Testa e Molineux (1993), por ser líquida e apresentar grande viscosidade, as células proliferam melhor em sua interface. A metilcelulose propicia também a retirada das colônias com pipeta de Pasteur ou diluindo-se com uma maior quantidade de meio, tornando viável o cultivo destas células ou colônias em cultura líquida. Por estes motivos e pela facilidade em se padronizar os experimentos na metilcelulose, que já continha fatores de crescimento (exceção da eritropoietina que é adicionada ao final), optou-se pela utilização deste meio na maioria dos experimentos. Assim, nas outras 72 bolsas, as culturas foram feitas em meio semi - sólido de metilcelulose utilizando, como fatores de crescimento, stem cell factor, interleucina 3, GM-CSF e eritropoietina humana, todos recombinantes. Todas as culturas em metilcelulose foram feitas com 1×10^5 células/ml, conforme sugerido por Broxmeyer *et al* (1989) e Harris *et al* (1994). De fato, nestas culturas, a utilização de 1×10^6 células/ml induziu à proliferação intensa, dificultando a leitura.

Os resultados obtidos na leitura das culturas no 14^o dia indicam que as células proliferaram e se diferenciaram adequadamente, originando colônias de todas as linhagens hematopoiéticas, semelhante ao relatado nos estudos de Broxmeyer *et al* (1989) Glukman *et al* (1992), Harris *et al* (1994), Rubinstein *et al* (1995) e Bertolini *et al* (1995).

Nas amostras de prematuros houve um maior número de células precursoras viáveis quando comparadas com os de termo. Foram contadas 371×10^5 células/ml de sangue de cordão no grupo de prematuros e 74×10^5 células/ml no grupo de termo. Estes resultados se correlacionam com a ontogenia da linhagem hematopoiética, citado nos estudos de Clapp *et al*, 1989, Migliaccio *et al* 1986, Moore *et al*, 1970, e Lansdorp *et al* 1993, pois quanto mais prematuro o feto, maior o número de células precursoras circulando na

corrente sanguínea. Entre o 2^o e 3^o trimestre de gestação, o fluxo de células precursoras que são produzidas no fígado e baço em direção à medula óssea é intenso. Estes resultados se correlacionam, por sua vez, com os relatos de Haneline *et al*, 1996 que notaram grande proliferação de colônias nas culturas de sangue de cordão de prematuros, inferindo que o grande potencial proliferativo seria devido ao maior número de células precursoras existentes no sangue dos prematuros. Em estudo anterior, datado de 1988, Liang *et al* relataram que não havia diferença no número de colônias (capacidade proliferativa) obtidas de sangue de cordão de neonatos prematuros e de termo. Mesmo que a leitura das culturas nos 2 estudos tenha sido feita no mesmo dia (14^o dia), fica difícil compará-los porque Liang *et al*. utilizaram meio de agar e fatores de crescimento de meio condicionador derivado de placenta humana, enquanto que Haneline *et al* utilizaram metilcelulose e fatores de crescimento recombinantes. Em nosso estudo também observamos um maior número de colônias nas cultura de prematuros quando comparadas com as de termo (tabelas III e IV). Apesar da concentração celular utilizada para a realização das culturas nos 2 grupos ser a mesma (1×10^5 células / ml de meio), este aumento pode ser explicado pelo fato de existir maior número de células precursoras (CD34⁺) no sangue de cordão de prematuros que nos de termo. Entretanto, observamos nas culturas de prematuros, no 8^o dia, não só um maior número de colônias, como também uma diferenciação mais precoce, encontrando-se, já no 8^o dia de cultura, grande número de colônias mistas (CFU-GEMM). Assim, a cultura dos prematuros no 8^o dia se assemelharam às de termo no 14^o de cultura e no 14^o dia apresentavam colônias de BFU-E que é característico de cultura de 21 dias. Provavelmente estas células devem entrar antecipadamente em ciclo celular. Estes achados são inéditos e são, atualmente, objeto de estudo.

3. Criopreservação

O principal problema da padronização da criopreservação se relacionou com a temperatura de manipulação das células durante o processo de congelamento, que deve estar o mais próximo possível de 0^o C para que o DMSO não seja tóxico à célula.

Na tabela IV podemos notar que houve diminuição no número de células pós-descongelamento, mas a viabilidade se manteve entre 80 a 90% ao azul de tripan, dados estes comparáveis aos encontrados na literatura. Bertolini *et al* (1995) associaram, ao processo de criopreservação, uma perda ao redor de 12 a 21% no número de células. Almici *et al* (1996), por sua vez, relataram perda de $73 \pm 11\%$ com viabilidade acima de 97%. Em ambos os trabalhos, os resultados foram independentes do tipo de separação feita.

No nosso trabalho, também observamos, na análise por citometria de fluxo, manutenção ou até aumento da porcentagem de células CD34⁺, provavelmente porque as células que morreram durante o processo de criopreservação não foram as células CD34⁺.

Por sua vez, nos estudos clonogênicos realizados após o descongelamento das amostras, as células em cultura mantiveram sua capacidade proliferativa, apresentando número significativo de colônias das linhagens eritróide, granulomonocítica e mista, como pode ser observado na tabela III. Estes resultados também foram descritos nos estudos dos autores acima citados.

4. Transplante de células mononucleares de sangue de cordão umbilical humano em camundongos de linhagem SCID.

Os primeiros trabalhos com a linhagem SCID para estudo de diferenciação e função da linhagem hematolinfóide surgiram em 1988 com McCune *et al*. Os autores transplantaram células hematopoiéticas fetais humanas, timo, e linfonodo fetal em camundongos portadores de imunodeficiência severa combinada (SCID/SCID) que não apresentam linfócitos B e T, e demonstraram o aparecimento transitório de linfócitos T humanos (CD3⁺ e CD4⁺) e IgG (imunoglobulina G) na circulação destes animais.

No presente trabalho, foi escolhida a linhagem SCID para ser transplantada, devido ao consenso na literatura que este modelo murino é ideal para estudar hemopoiese de sangue de cordão humano e investigação de doenças imunes e hematológicas (Kollmann *et al* 1994, Leblond *et al*, 1997, Lubin *et al* 1991, Vomoor *et al*, 1994). A viabilidade do

sangue de cordão para reconstituir medula óssea dos camundongos SCID ficou comprovada através dos resultados da análise por citometria de fluxo de macerado de pulmão, de baço, do sangue periférico e de lavado de medula óssea dos camundongos, demonstrando o aparecimento de células humanas CD45⁺, incluindo linfócitos T e B. Ressalta-se que os camundongos foram analisados já na 8ª semana pós-transplante, podendo assim explicar a pequena porcentagem de linfócitos encontrada. Os dados obtidos em nosso estudo se correlacionam com os trabalhos de Lubin *et al* (1991) e Vomoor *et al* (1994). Em 1991, Lubin *et al* publicaram artigo relatando o sucesso de transplante de medula óssea humana em camundongos SCID e a proliferação de linhagem linfóide humana, tanto B quanto T, 2 a 4 meses após o transplante. Ao redor da 10ª semana pós-transplante, alguns camundongos apresentaram pequeno número de linfócitos T, que variaram entre 6,5 e 10,8%. População significativamente alta de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e de linhagem B só ocorreu 6 meses após o transplante. Em 1994, Vomoor *et al* publicaram estudo onde demonstraram a viabilidade de células precursoras de sangue de cordão umbilical humano para reconstituir linhagem hematopoiética em camundongos SCID submetidos à irradiação sub-letal, havendo, em cultura, intensa proliferação, como a observada em nosso estudo.

A utilização de fatores de crescimento humanos para pega do transplante de camundongos SCID foi objeto de estudo com resultados controversos. Kamel-Reid *et al* apontaram, pela primeira vez, em 1988, a necessidade de se infundir, nestes camundongos, fatores de crescimento de linhagem humana, já que os de linhagem murina foram ineficazes. Em estudo publicado por Lapidot *et al*, em 1992, foi relatada a estimulação da proliferação da linhagem hematopoiética nos camundongos SCID transplantados com medula óssea humana, através da infusão de interleucina 3 e GM-CSF (fator estimulante de crescimento de linhagem granulomonocítica), imediatamente ou durante o primeiro mês após o transplante,. Entretanto, Kollmann *et al* (1994) publicaram estudo sobre a reconstituição de linfócitos humanos em camundongos SCID, após transplante de medula óssea, sem administração de citocinas humanas exógenas. Os resultados de nosso estudo corroboram os obtidos por Kollmann *et al*.

As culturas obtidas a partir de células de medula óssea destes camundongos transplantados apresentaram intensa proliferação celular, dificultando a contagem das

colônias, apesar de terem sido semeadas 1×10^5 células /ml de meio de cultura e da baixa porcentagem de células CD34⁺ (0,03%), conforme observado na imunofenotipagem dos lavados de medula óssea dos camundongos. Estes resultados estão de acordo com os relatados por Vomoor *et al* (1994) e Wang *et al* (1997).

O alto número de mortes na 1ª semana pós-transplante deve-se, provavelmente, à grande sensibilidade, já descrita em literatura, que a linhagem SCID tem à irradiação, se comparada com outros camundongos, mesmo quando utilizada a dose de 300 rads (Cashman *et al*, 1997, Conneally *et al*, 1997, Vomoor *et al*, 1994 e Kamel-Reid, 1989). A utilização de fêmeas nos últimos experimentos de nosso trabalho, mais sensíveis e de menor peso que os machos, pode também ter influenciado as mortes precoces dos camundongos SCID.

Assim, o conjunto dos resultados apresentados neste trabalho, nos permite concluir que as células precursoras do sangue de cordão são capazes de reconstituir a linhagem hematopoiética após ablação da medula e devido às suas características, imaturidade, grande capacidade de proliferação e autogeração, podem ser adequadas para terapia gênica. Métodos eficazes de expansão *in vitro* destas células serão fundamentais para obtenção de número adequado de células para transplante de indivíduos adultos.



Conclusão

O sangue de cordão demonstrou ser material facilmente obtido e manipulável devendo se tornar importante fonte alternativa de células precursoras para reconstituir linhagem hematopoiética.

Os prematuros apresentaram maior número de células precursoras viáveis que os de termo. Nos estudos clonogênicos, as culturas dos prematuros no 8^o dia foram semelhantes às de termo no 14^o dia, já apresentando grande quantidade de CFU-GEMM. No 14^o dia foram semelhantes às de termo de 21 dias, apresentando colônias de BFU-E e intensa proliferação celular, demonstrando que além de maior número de células precursoras viáveis, diferenciam-se nos diversos tipos de colônias precocemente. Provavelmente as células de sangue de cordão de prematuros devam entrar em ciclo celular antes que as de termo.



Summary

During the past 14 years, human umbilical cord blood (UCB) has become an important source of hematopoietic stem cells. The collection and manipulation of UCB is easy and due to the rich content of progenitor cells, when cultured, these cells provide a high enough number of GM-CSF colonies to allow recovery of the hematopoietic lineage. UCB progenitor cells display a great ability to proliferate and self-renewal and are capable of multilineage expression in secondary colony cultures. In addition, UCB cells can be efficiently infected with retroviruses and provide a high level of expression of the introduced sequence. So, UCB cells can also be used in gene therapy. To evaluate the proliferative potential of UCB stem cells to recover hematopoietic lineage, we collected between June, 1996 to August 1998, 75 UCB bags and analyzed, before and after cryopreservation, their viability and proliferative capacity in methylcellulose culture, we also performed transplantation of these cells into SCID mice in order to recover bone marrow after ablative irradiation. The collected volume medium was 57ml, the medium viable number of mononuclear cells was $119 \times 10^5/\text{ml}$ of cord blood. The medium CFU-C founded in clonogenic studies were: 216 CFU-E, 134 CFU-GM and 22 CFU-GEMM. During our study we discovered that cultures from UCB cells of premature neonates had an early growth of CFU-E/BFU-E, CFU-GM and CFU-GEMM, on the 8th day of culture, and that the number and morphological characteristics of these colonies were comparable to those from full term neonates obtained on the 14th day. The prematures presented, on the 8th day of culture, 284 CFU/BFU-E while, in full term neonates there were 19 colonies ($p=0,003$). We found 196 CFU-GM colonies in the premature group and 15 colonies in the full term group ($p=0,003$), 27 CFU-GEMM colonies in the premature group and none in the full term group ($p=0,003$). On the 14th day of culture the results were as following: CFU/BFU-E - premature 358 x full term 216 ($p=0,061$), CFU-GM – premature 219 x full term 120 ($p=0,075$) and CFU-GEMM – premature 41 x full term 23 ($p=0,040$). These results indicated that premature UCB cells have a higher proliferative potential, this capacity may not be only related to their higher concentration of primitive hematopoietic progenitor cells, but rather to a different timing to entry into the cell cycle. The study about cryopreservation demonstrated that the viability and clonogenic results were comparable with the results before cryopreservation.

In order to evaluate the viability of UCB cells to recover hematopoietic lineage, fractionated UCB cells were transplanted into sublethally irradiated severe combined

immunodeficient (SCID) mice. We transplanted 21 mice, 6 engrafted and 15 dead during the first week post transplantation, probably by the fact that SCID lineage had great irradiation sensibility than the other mice lineages, even when we use 300 rads. The engrafted group demonstrated multilineage engraftment, analyzed by fluorescence-activated-cell sorting (FACS) with monoclonal antibody for human cells, and clonogenic studies with mice bone marrow cells, in methylcellulose culture with human recombinant stimulating factors. Our FACS results were: peripheral blood, 400 cells with 26,03% of CD45, 4,50% of CD2, 30,14% of CD3, 1,03% of CD19; lung, 2500 cells with 18,65% of CD45, 16,32% CD3 and 0,37% of CD19; bone marrow, 1000 cells with 12,80% of CD45, 4,45% of CD3, 0,85% of CD8 and 0,03% of CD34; spleen, 2300 cells with 36,84% of CD45, 28,27% of CD3, and 1,62% of CD19. We had done the same analysis with one untransplanted mouse. There was not any positive cell in the FACS analysis with monoclonal antibody for human cells.

These results demonstrated that umbilical cord blood cells were capable to recover bone marrow after ablative therapies and might be in the future, the ideal source of progenitor cells for transplantation and gene therapy.



Referência Bibliográfica

1. Abe T, Takaue Y, Kawano Y, Kuroda Y. **Effect of recombinant erythropoietin in interaction with stromal factors on cord blood hematopoiesis.** Blood 1996, Vol 87, 3212-3217.
2. Almici C, Carlo-Stella C, Wagner J E, Rizzoli V. **Density separation and cryopreservation of umbilical cord blood cells: Evaluation of recovery in short- and long term cultures.** Act Haematol 1996; 95; 171-175.
3. Apperley J F. **Umbilical cord blood progenitor cell transplantation.** Bone Marrow Transplant. 1994, 14; 187-196.
4. Bergan R, Hakim F, Schwartz G N, Kyle E. **Electroporation of synthetic oligodeoxynucleotides: A novel technique for ex vivo bone marrow purging.** Blood 1996, Vol 87, 731-741.
5. Bertolini F, Lazzari L, Corsini C, Lauri E. **Cord blood banking for stem cell transplant.** Int J of Artif Organs 1993, Vol 16; 111-112.
6. Bertolini F, Lazzari L, Lauri E, Corsini C. **Cord blood plasma-mediated ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells.** Bone Marrow Transplant. 1994, 14; 347-453.
7. Brossard Y, Niffterik J V, Lachaux V D, Huchet J. **Collection of placental blood with a view to hematopoietic reconstitution.** Nouv. Rev. Fr. Hematol. 1990.
8. Broxmeyer H E, Douglas G W, Hangoc G, Cooper S. **Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem I progenitor cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, Vol-86; 3828-3832.
9. Broxmeyer H E, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro R. **Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, Vol 89: 4109-4113.

10. Broxmeyer H E, Hangoc G, Cooper S. **Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells.** Bone Marrow Transplant. 1992, 9: 7-10.
11. Cairo MS, Wagner JE. **Placental and/or umbilical cord blood: A alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation.** Blood, 1997, 90, 4665-4678.
12. Carow C E, Hangoc G, Broxmeyer H E. **Human multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) have extensive repeating capacity for secondary CFU-GEMM; an effect enhanced by cord blood plasma.** Blood 1993 Vol 81; 942-949.
13. Cashman J, Bockhold K, Hogge D E, Eaves A C. **Sustained proliferation, multi-lineage differentiation and maintenance of primitive human haemopoietic cells in NOD/SCID mice transplanted with human cord blood.** Br J Haematol 1997, 97,1026-1036.
14. Champseix C, Maréchal V, Khazaal I, Schwartz O. **A Cell Surface Marker Gene Transferred With a Retroviral Vector Into CD34⁺ Cord Blood Cells Is Expressed by Their T-Cell Progeny in the SCID-hu Thymus.** Blood 1997, Vol 88, 107-113.
15. Champseix C, Marechtl V, Khazaal 1, Schwartz O. **A cell surface marker gene transferred with a retroviral vector into CD34⁺ cord blood cell is expressed by their T-cell progeny in the SCID-hu thymus.** Blood 1996,Vol 88, 107-113.
16. Charbord P, Newton 1, Schaal J P, Herve P. **The separation of human cord blood by density gradient does not induce a major loss of progenitor cells.** Bone Marrow Transplant. 1992, 9: 109-1 10.
17. Christensen RD, Harper TE, Rothsrein G. **granulocyte-macriphage progenitor cells in term and preterm neonates.** J Pedriatri 1986, 109, 1047-1051.
18. Christensen RD. **Hematopoiesis in fetus and neonate.** Pedriatri Res, 1989, 26. 531-535.

19. Chu G, Hayakawa H, Berg P. **Electroporation for efficient transfection of mammalian cells with DNA.** Nucl Acid Res 1987, Vol 15:1311-1326.
20. Clapp WD, Baley JE, Gerson ST. **Gestational age-dependent changes in circulating hematopoietic stem cells in newborn infants.** J Lab. Clin. Med, 1989, 3, 422-427.
21. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. **Expansion *in vitro* of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-SCID/SCID mice.** Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94, 9836-9841.
22. Conneally E, Eaves C J, Humphries RK. **Efficient retroviral-mediated gene transfer to human cord blood stem cells with *in vivo* repopulating potencial.** Blood, 1998, 91, 3487-3493.
23. Dzierzak E, Papayannopoulou T, Mulligan R C. **Lineage-specific expression of human β -globin gene in murine bone marrow transplant recipients reconstituted with retrovirus-transduced stem cells.** Nature 1988, Vol 331, N° 7, 35-41.
24. Falkenburg J H F, Luxemburg-Heijs S A P V, Zijlmans J M, Fibbe W E. **Separation, enrichment and characterization of human hematopoietic progenitor cells from umbilical cord blood.** Ann Hematol. 1993, 67: 231-236.
25. Freshney RI, Pragnell IB, Freshney MG. **Culture of Hematopoietic Cells.** Wiley-Liss ed, 1994, 265-268.
26. Gale R P, Reiffers J, Jufter C A **What is new in blood progenitor cell autotransplant?** Bone Marrow Transplant. 1994,14: 343-346
27. Gluckman E, **Current knowledg about the properties of umbilical cord blood hematopoietic stem cells.** Bone Marrow Transplantat 1994,14; 185.

28. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D. **Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking.** Bone Marrow Transplant. 1992, 9:114-117.
29. Gluckman E, Devergié A, Bourdeau-Esperou H, Thierry D. **Transplantation of umbilical cord blood in Fanconi's anemia.** Nouv. Rev. Fr. Hematol. 1990, 32: 423-425.
30. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F. **Outcome of Cord Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors.** N Eng J Med 1997 Vol 337 373- 381.
31. Haneline L S, Marshall K P, Wade Clapp D. **The Highest Concentration of Primitive Hematopoietic Progenitor Cells in Cord Blood Is Found In Extremely Premature Infants.** Pediatr Rese 1996, Vol 39 820 - 825.
32. Hao Q-L, Thiermann FT, Peterson D, Smogorzewska E M. **Extended Long-Term Culture Reveals a Highly Quiescent and Primitive Human Hematopoietic Progenitor Population.** Blood 1996 Vol 88, 3306-3313.
33. Harris D T, LoCascio J, Besencon F J. **Analysis of alloreactive capacity of human cord blood: implications for graft-versus-host disease.** Bone Marrow Transplant 1994, 14: 545-553.
34. Harris D T, Schumacher M J, LoCascio J, Besencon F J. **Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, Vol 89; 10006-10010.
35. Harris D T, Schumacher M J, LoCascio J, Booth A. **Immunoreactivity of umbilical cord blood and postpartum maternal peripheral blood with regard to HLA-haploidentical transplantation.** Bone Marrow Transplant. 1994, 14:63-68.
36. Harris D T, Schumacher M J, Rychlik S, Booth S. **Collection, separation, and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation.** Bone Marrow Transplant. 1994, 13: 135-143.

37. Harrison D E, Astie C M. **Short- and Long-Term Multilineage Repopulating Hematopoietic Stem Cells in Late Fetal and Newborn Mice: Models for Human Umbilical Cord Blood.** Blood 1997, Vol 90 174-181.
38. Hirao A, Kawano Y, Takaue Y, Suzue T. **Engraftment potential of peripheral and cord blood stem cells evaluated by a long-term culture system.** Exp Hematol. 1994, 22:521-526.
39. Hogan C J, Shpall E J, McNulty G, McNiece I. **Engraftment and Development of Human CD34⁺ - Enriched Cells From Umbilical Cord Blood in NOD/LtSz-SCID/SCID Mice.** Blood 1997 Vol 90 , 85-96.
40. Hows J M, Bradley B A, Marsh J C W, Luft T. **Growth of human umbilical cord blood in longterm haemopoietic cultures.** The Lancet 1992, Vol 340; 73-76.
41. Hows J M, Marsh J C W, Bradley B A, Luft T. **Human cord blood a source of transplantable stem cells?.** Bone Marrow Transplant. 1992, 9; 105-108.
42. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H. **Ontogeny-related changes in proliferative potential human hematopoietic cells.** J. Exp. Med., 1993, 178, 787-791.
43. Lièvre-Dieterlen F, Godin I, Pardanaud L, **Where Do Hematopoietic Stem Cells Come from?** Int. Arch. Allergy Immunol. 1997, 112, 3-8.
44. Issaragrisil S, Visuthisarkchai S, Suvafte V, Tanphaichitr V S. **Brief report: Transplantation of cord- blood stem cells into a patient with severe Thalassemia.** N. Eng. J Med 1995, Vol 332, 367-369.
45. Kamel-Reid S, Dick JE **Engraft of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells.** Science 1988, 242: 1702-1709.
46. Keever C A, Abu-Hajir M, Graf W, McFadden P. **Characterization of alloreactivity and anti-leukemia reactivity of cord blood mononuclear cells.** Bone Marrow Transplant 1995, 15, 407-419.

47. Kelly P, Kurtzberg J, Vichinsky E, Lubin B. **Umbilical cord blood stem cells: Application for the treatment of patients with hemoglobinopathies.** J Pediatric 1997,May: 695 - 783.
48. Kohn DB, Weinberg K I, Nolta J A, Heiss LN. **Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells inneonates with adenosine deaminase deficiency.** Nat .Med., 1995, 1, 1017-1023.
49. Kollmann TR, Kim A, Zhuang X, Hachamovich M. **Reconstitution of SCID mice with human fetal bone marrow without the requirement for exogenous human cytokines.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 8032-8036.
50. Lapidot T, Pflumio F, Doedens M, Murdoch B **Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice.** Science 1992, 255. 1137-1141.
51. Larochelle A, Vormoor J, Lapidot T, Sher G. **Engraftment of immune-deficient mice with primitive hematopoietic cells from B-thalassemia and sickle cell anemia patients: implications for evaluating human gene therapy protocols.** Hum Mol Genet 1995, Vol 4, 163-172.
52. Liang D C, Ma SW, Lin-Chu M, Lan C C. **Granulocyte/ Macrophage Colony-Forming Units from Cord Blood of Premature and Full-Term Neonates: Its Role in Ontogeny of Human Hemopoiesis.** Pediatr Rese 1988 Vol 24 701 - 702.
53. Lu L, Ge Y, Li Z, Keeble W. **Retroviral transfer of the recombinant human erythropoietin receptor gene into single hematopoeitic stem I progenitor cell from human cord blood increases the number of erythropoietin-dependent erythroid colonies.** Blood 1996,Vol 87, N° 2: 525-534.
54. Lu L, Xiao M, Schen R N, Grigsby S. **Enrichment, responssiveness of single primitive CD34⁺⁺⁺ human umbilical cord blood hematopoietic progenitors characterization and with high proliferative and replating potential.** Blood 1993 Vol 81; 41-48.

55. Lubin 1, Faktorowich Y, Lapidot T, Gan Y. **Engraftment and development of human T and B cells in mice after bone marrow transplantation.** Science 1991, 252:1137
56. Luskey B D, Rosenblatt M, Zsebo K, Williams DA. **Stem cell factor, interleukin-3, and interleukin-6 promote retroviral-mediated gene transfer into murine hematopoietic stem cells.** Blood 1992, Vol 80: 396-402.
57. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp P M. **Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells.** Blood 1993, Vol 81: 3252 -3258.
58. McCune J M, Namikawa R, Kaneshima H, Shultz LD. **The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function.** Science 1988, 241: 1632-1639.
59. Metcalf D, Moore MAS. **Hematopoietic cells.** Neuberger A Tatum EL,(ED), 1971, Frontier of Biology, North Holland, Amsterdam, 448-465.
60. Milosevits J, Pocsik E, Schmidt B, Rem6nyi P. **Immunophenotypic and functional characteristics of haematopoietic cells from human cord blood.** Scand. J. Immunol. 1995, 42: 493-500.
61. Miniero R. Ramenghi U, Crescenzo N, Perugini L. **Umbilical cord blood stem cell transplantation.** Int. J. Artif. Organs, 1993, 16, 113-115.
62. Migliaccio J, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F. **Human embryonic hemopoiesis: kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac→liver transition.** J.Clin.Invest., 1986, 78, 51-60.
63. Moore MAS, Metcalf D. **Ontogeny of hematopoietic system: Yolk sac of *in vivo* and *in vitro* colony forming cells in the developing mouse embryo.** Br j Haematol 1970, 18, 279-286

64. Moritz T, Keller D C, Williams D A. **Human cord blood cells as targets for gene transfer; Potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease.** J Exp Med 1993, Vol 178; 529-536.
65. Newton I, Charbord P, Schaal J P, Herve P. **Toward cord blood banking density-separation and cryopreservation of cord blood progenitors.** Exp Hematol 1993, 21 ; 671-674.
66. Piacibelo W, Sanavio F, Severino A, Bergandi D. **Extensive Amplification and Self-Renewal of Human Primitive Hematopoietic Stem Cells From Cord Blood.** Blood 1997, Vol 89; 2644-2653
67. Rabian-Berzog C, Lesage S, Gluckman E. **Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood.** Bone Marrow Transplant 1992, 9: 64-67.
68. Roberts I A G **Bone marrow transplantation in children: current results and controversies.** Bone Marrow Transplant 1994, 14: 197-199.
69. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield R E, Adamson J W. **Processing and cryopreservation of placental umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution.** Proc. Nati. Acad. Sci. USA 1995, Vol 92, 10119-10122.
70. Rubinstein, Rosenfield R E, Adamson J W, Stevens C E **Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution.** Blood 1993 Vol. 81, 1679-1690.
71. Silberstein LE, Jeffeties LC. **Placental-Blood Banking: A new frontier in transfusion medicine.** N. Eng. J. Med, 1996, 335, 199-201.
72. Schibler K R, Li Y, Ohis K, Nye N C. **Possible mechanisms accounting for the growth factor independence of hematopoietic progenitors from umbilical cord blood.** Blood 1994 Vol 84, 3679-3684.
73. Socié G, Gluckman E, Carosella E, Brossard Y. **Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two mini satellite sequences.** Blood 1994, Vol 83, 340-344.

74. Suntherland D R, Keating A, Nayar R, Anania S. **Sensitive detection and enumeration of CD34⁺ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry.** Exp Hematol 1994, 22: 1003-1010.
75. Tendeloo V F I Van, Snoeck H W, Lardon F. **Nonviral transfection of distinct types of human dendritic cells: high-efficiency gene transfer by electroporation into hematopoietic progenitor – but not monocyte-derived dendritic cells.** Gene Therapy, 1998, 5; 700-707.
76. Testa NG, Molineux G. **Hemopoiesis: A practical approach**, IRL Press Oxford University, 1993.
77. Thierry A R, Lunardi-Iskandar Y, Bryant J L, Rabinovich P. **Systemic gene therapy: Biodistribution and long-term expression of a transgene in mice.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, Vol 92: 9742-9746.
78. Thierry D, Hervatin F, Traineau R, Brossard Y. **Hematopoietic cells in cord blood.** Bone Marrow Transplant 1992, 9; 101-104.
79. Thierry D, Traineau R, Adam M, Delachaux V. **Hematopoietic stem cell potential from umbilical cord blood.** Nouv. Rev. Fr. Hematol., 1990, 32: 439-440.
80. Thompson C. **Umbilical cords: Turning garbage into clinical gold.** Science 1995, Vol 268; 805-806.
81. Traycoff C M, Abboud M R, Laver J, Brandt J. **Evaluation of the in vitro behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells.** Exp Hematol 1994, 22; 215-222.
82. Turner C W, Luzins J, Hutcheson C - **A modified harvest technique for cord blood hematopoietic stem cells.** Bone Marrow Transplant 1992, 10: 89-91.
83. Verma S, W offendin C, Bahner U. **Gene transfer into human umbilical cord-derived CD34⁺ cells by particle-mediated gene transfer.** Gene Therapy, 1998, 9, 692-699

84. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G. **Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice.** Blood 1994, Vol 83: 2489- 2497.
85. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G. **SCID mice as an in vivo model of human cord blood hematopoiesis.** Blood Cells, 1994, 20, 316-322.
86. Wagner EJ, Broxmeyer H E, Byrd R L, Zehnbauser B. **Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: Analysis of engraftment.** Blood 1992, Vol 79; 1874-1881.
87. Wagner EJ, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO. **Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors. Analysis of engraftment and acute graft-versus host disease.** Blood 1996, 88, 795-902.
88. Wang J C Y, Doedens M, Dick J E. **Primitive Human Hematopoietic Cells Are Enriched in Cord Blood Compared With Adult Bone Marrow or Mobilized Peripheral Blood as Measured by the Quantitative In Vivo SCID-Repopulating Cell Assay.** Blood 1997, vol 89, 3919- 3924.
89. Wet J R, Wood K V, DeLuca M, Helsinki D R. **Firefly luciferase gene: Structure and expression in mammalian cells.** Mol Cell Biol 1987, Feb: 725-737.
90. Yamaguchi B M, Ikebuchi K, Hirayama F. **Different Adhesive Characteristics and VLA-4 Expression of CD34⁺ Progenitors in G₀/G₁ Versus S+G₂/M Phases of the Cell Cycle.** Blood 1998, vol 92, 842-848.
91. Ye Z Q, Burkholder J K, Qiu P, Schultz J C. **Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth.** Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1994, Vol 91: 12140-12144.