



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Sofia Batalha Rodrigues

FATORES QUE INFLUENCIAM AS CARACTERÍSTICAS DE AMOSTRAS DE SANGUE DO CORDÃO UMBILICAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação da Dra. Ana Isabel Santos Cabeleira, Técnica Superior de Laboratório da Crioestaminal.

Tese de Mestrado em Bioquímica

Julho de 2016

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais e irmã, quero agradecer o apoio incondicional, o carinho e a dedicação que constantemente me oferecem e por acreditarem sempre em mim e no meu trabalho.

À Dra. Ana Cabeleira, agradeço a orientação científica, a disponibilidade, a amizade e a motivação e ajuda na análise estatística dos resultados e sugestões feitas ao longo da realização deste projeto.

À Dra. Margarida Vieira, o meu sincero agradecimento pela total disponibilidade, pelas opiniões e críticas, pelas correções e pelo esclarecimento de dúvidas que surgiram durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Crioestaminal, agradeço o acolhimento e por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha dissertação de Mestrado.

Aos colegas de trabalho, agradeço a amizade, o companheirismo e a constante ajuda e motivação demonstradas. Obrigada pela companhia e pela partilha de bons momentos.

Aos meus amigos e ao meu namorado, obrigada pela vossa amizade, pelo incentivo, pelo afeto e pelas palavras de força.

Resumo

O sangue do cordão umbilical é uma fonte alternativa de células estaminais hematopoiéticas para utilização clínica no tratamento de várias doenças oncológicas e não-oncológicas. Para que as amostras de sangue do cordão umbilical possam estar disponíveis para pacientes que necessitem de um transplante de células estaminais hematopoiéticas, é necessário armazená-las em bancos de criopreservação. De forma a garantir que as amostras guardadas apresentem as características necessárias para serem utilizadas, é importante otimizar todo o processo desde a colheita até à criopreservação, incluindo o processamento das amostras.

Neste trabalho foram analisadas retrospectivamente 8430 amostras de sangue do cordão umbilical no sentido de avaliar a influência de vários fatores neonatais (sexo, peso e idade gestacional do recém-nascido), fatores obstétricos (tipo de parto) e outros fatores (tempo entre a colheita e o processamento, bacteriologia e fase da lua na altura do nascimento) nos parâmetros laboratoriais de amostras de sangue do cordão umbilical antes e após o processamento. Foi também analisada a influência de fatores intrínsecos das amostras aquando da chegada ao laboratório, como a presença de coágulos, o volume, o número de células nucleadas totais, o número de células mononucleadas, o número de eritrócitos e o hematócrito nos parâmetros laboratoriais após o processamento. Adicionalmente, foram comparados dois métodos de processamento de sangue do cordão umbilical, o Sepax® e o AXP®, quanto à sua eficiência no processamento das amostras, nomeadamente nas recuperações celulares e na redução da fração de eritrócitos.

As amostras provenientes de recém-nascidos do sexo masculino, com maior peso, bem como com maior idade gestacional e cujo nascimento ocorreu por parto vaginal apresentaram, na generalidade, um aumento dos parâmetros laboratoriais analisados. A redução do intervalo de tempo entre a colheita e o processamento para menos de 48 horas e a diminuição da contaminação microbiológica das amostras poderá também contribuir para a melhoria das características das mesmas. Observou-se também que as amostras colhidas na fase de lua nova apresentaram um maior conteúdo em células CD34⁺. O volume de sangue do cordão umbilical demonstrou ser o principal fator responsável pelas variações observadas no número total de células. Quanto ao método de processamento, o AXP® foi mais eficiente na recuperação celular e na redução dos eritrócitos comparativamente ao Sepax®.

Abstract

Umbilical cord blood is an alternative source of hematopoietic stem cells for the treatment of several malignant and non-malignant diseases. In order to guarantee that umbilical cord blood samples are available for patients in need of hematopoietic stem cell transplants, samples must be stored in cryopreservation banks. To ensure that stored samples present the required proprieties for use in transplantation, it is mandatory to optimize the process from the collection of the samples to their cryopreservation, including their processing.

In the present work, 8430 umbilical cord blood samples were retrospectively analysed to evaluate the influence of several neonatal factors (gender, weight and gestational age), obstetric factors (type of delivery) and other factors (time from collection to processing, bacteriology and lunar phase at time of birth) on the laboratorial parameters of umbilical cord blood samples before and after processing. The influence of intrinsic factors such as volume, number of total nucleated cells, mononuclear cells, erythrocytes and the haematocrit on the laboratorial parameters was also evaluated. Additionally, two umbilical cord blood processing methods were compared, Sepax[®] and AXP[®], to evaluate their efficiency in sample processing, namely on cellular recovery and reduction of the erythrocyte fraction.

In general, samples from newborns with higher weight and longer gestational age as well as vaginal deliveries, showed higher laboratorial parameters. Decreasing time from collection to processing for less than 48 hours and reducing microbiology contamination rate could also lead to improved umbilical cord blood characteristics. A higher hematopoietic stem cell content in samples collected at new moon was also observed. Umbilical cord blood volume was showed to be the main factor affecting cell content variations. Regarding the processing method, AXP[®] was more efficient on cell recovery and erythrocyte reduction than Sepax[®].

Índice

1. Introdução	1
1.1. Células Estaminais	1
1.2. Células Estaminais Hematopoiéticas e Terapia Celular	2
1.3. Sangue do Cordão Umbilical como Fonte de Células Estaminais Hematopoiéticas	3
1.4. Da Colheita ao Armazenamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical	5
1.4.1. Colheita	5
1.4.2. Processamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical	6
1.4.3. Criopreservação	8
1.4.4. Controlo de Qualidade.....	9
1.4. Métodos de Processamento do Sangue do Cordão Umbilical.....	10
1.4.1. Sedimentação com Hidroxietilamido.....	10
1.4.2. <i>Top & Bottom</i>	11
1.4.3. Sepax®	12
1.4.4. AutoXpress®	14
1.4.5. Sistemas de Filtração	17
2. Objetivos	21
3. Material e Métodos	23
3.1. Estudo dos Parâmetros Críticos na Qualidade do Sangue do Cordão Umbilical.....	23
3.2. Colheita e Transporte das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical	23
3.3. Processamento do Sangue do Cordão Umbilical	24
3.3.1. Sepax®	24
3.3.2. AXP®	24
3.4. Criopreservação	25
3.5. Controlo de Qualidade.....	25
3.5.1. Contagens Hematológicas.....	25

3.5.2.	Citometria de Fluxo.....	25
3.5.3.	Análise da Presença de Agentes Contaminantes	26
3.6.	Análise Estatística	26
4.	Resultados	29
4.1.	Caracterização das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical	29
4.2.	Caracterização dos Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros.....	30
4.3.	Correlação Entre os Parâmetros Laboratoriais das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical.....	32
4.4.	Análise de Fatores que Influenciam as Características das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical.....	34
4.4.1.	Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros	34
4.4.2.	Fatores Intrínsecos das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical.	44
4.4.3.	Métodos de Processamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical	51
5.	Discussão	55
5.1.	Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros	55
5.1.1.	Sexo do Recém-Nascido	55
5.1.2.	Peso do Recém-Nascido	56
5.1.3.	Idade Gestacional.....	57
5.1.4.	Tipo de Parto	58
5.1.5.	Bacteriologia.....	59
5.1.6.	Tempo Entre a Colheita e o Processamento	59
5.1.7.	Fase da Lua	60
5.2.	Fatores Intrínsecos às Amostras de Sangue do Cordão Umbilical.....	61
5.3.	Métodos de Processamento de Sangue do Cordão Umbilical.....	64
6.	Conclusão	69
7.	Referências Bibliográficas	70

Índice de Figuras

Figura 1. Sistemas de separação dos componentes celulares utilizados no método <i>T&B</i> . A. Sistema Optipress II™ da Baxter Health Care (www.medquest.co.id). B. Sistema Compomat G4™, da Fresenius Kabi (www.bpharma-basic.net).....	12
Figura 2. A. Sistema Sepax® (Biosafe). B. Kit de processamento de amostras de SCU do sistema Sepax® (Adaptado de www.biosafe.ch).....	13
Figura 3. Esquema representativo do processamento do SCU com o sistema Sepax®. ■ SCU antes do processamento; ■ Fração de células nucleadas; ■ Plasma; ■ Eritrócitos ⁷⁹	14
Figura 4. Sistema AutoXpress®. A. Dispositivos de processamento do sistema AutoXpress® na base de comunicação (www.cescatherapeutics.com). B. Kit de processamento do sistema AutoXpress® ¹⁴⁹	15
Figura 5. Esquema representativo do processamento do SCU com o sistema AutoXpress®. A. Estratificação dos componentes celulares por centrifugação a alta velocidade. B. Centrifugação a baixa velocidade e redução dos eritrócitos. C. Transferência da fração de células nucleadas. (Adaptado de www.cescatherapeutics.com).	16
Figura 6. Representação do sistema de filtração Stem Cell Collection Filter ou Stem Quick™ E da Asahi Kasei Medical Corporation ⁹⁴	18
Figura 7. Representação do sistema de filtração Procord™ TF-4 da Terumo Corporation (Adaptado de Takahashi et al., 2008 ⁴⁷).....	18
Figura 8. Esquema representativo do sistema de filtração Celleffice CB da Kaneka Corporation (Adaptado de www.kaneka-celleffice.com).....	19
Figura 9. Correlação entre o peso do recém-nascido e volume de SCU ($r=0,260$; $p<0,001$).	37
Figura 10. Distribuição do sexo em função do peso do recém-nascido ($p<0,001$).....	37
Figura 11. Correlação entre o tempo compreendido entre a colheita e o processamento e a viabilidade celular total ($r=-0,448$; $p<0,001$).	43

Índice de Tabelas

Tabela 1. Caracterização das amostras de sangue do cordão umbilical antes e após o processamento.	30
Tabela 2. Caracterização dos fatores neonatais, obstétricos e outros.	31
Tabela 3. Correlação de Spearman entre os parâmetros laboratoriais antes e após o processamento.	33
Tabela 4. Influência do sexo do recém-nascido nos parâmetros laboratoriais.	35
Tabela 5. Influência do peso do recém-nascido nos parâmetros laboratoriais.	36
Tabela 6. Influência da idade gestacional nos parâmetros laboratoriais.	38
Tabela 7. Influência do tipo de parto nos parâmetros laboratoriais.	39
Tabela 8. Influência da bacteriologia nos parâmetros laboratoriais.	40
Tabela 9. Distribuição da bacteriologia em relação ao tipo de parto.	41
Tabela 10. Influência do tempo desde a colheita até ao processamento nos parâmetros laboratoriais.	42
Tabela 11. Influência da fase da lua nos parâmetros laboratoriais.	44
Tabela 12. Influência da presença de coágulos nos parâmetros laboratoriais.	45
Tabela 13. Influência do volume de SCU nos parâmetros laboratoriais.	46
Tabela 14. Influência do número de TNC do SCU nos parâmetros laboratoriais.	47
Tabela 15. Influência do número de MNC do SCU nos parâmetros laboratoriais.	48
Tabela 16. Influência do número de eritrócitos do SCU nos parâmetros laboratoriais.	49
Tabela 17. Influência do hematócrito do SCU nos parâmetros laboratoriais.	51
Tabela 18. Influência do método de redução de volume nos parâmetros laboratoriais.	52
Tabela 19. Diferenças dos parâmetros laboratoriais de amostras processadas com o Sepax® e com o AXP® de acordo com as categorias do volume de SCU inicial.	54

Abreviaturas

AXP	<i>AutoXpress</i>
CD	<i>Cluster de Diferenciação (Cluster of Differentiation)</i>
CMIA	<i>Método de Análise de Anticorpo/Antigénio por Imunoluminescência de Partículas (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay)</i>
CMV	<i>Citomegalovírus (Cytomegalovirus)</i>
CPD	<i>Citrato Fosfato Dextrose (Citrate Phosphate Dextose)</i>
DMSO	<i>Dimetil Sufóxido (Dimethyl Sulfoxide)</i>
DEX40	<i>Dextran 40</i>
HBV	<i>Vírus da Hepatite B (Hepatitis B Virus)</i>
HCV	<i>Vírus da Hepatite C (Hepatitis C Virus)</i>
HES	<i>Hidroxietilamido (Hydroxyethyl Starch)</i>
HIV	<i>Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus)</i>
HLA	<i>Antigénio Leucocitário Humano (Human Leukocyte Antigen)</i>
GVHD	<i>Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (Graft Versus Host Disease)</i>
MNC	<i>Células Mononucleadas (Mononuclear Cells)</i>
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)</i>
PBS	<i>Tampão Fosfato-Salino (Phosphate Buffered Saline)</i>
SCU	<i>Sangue do Cordão Umbilical</i>
T&B	<i>Top & Bottom</i>
TNC	<i>Células Nucleadas Totais (Total Nucleated Cells)</i>

1. Introdução

1.1. Células Estaminais

As células estaminais são células indiferenciadas que apresentam propriedades únicas e essenciais no organismo. Estas células diferem das restantes células do organismo por apresentarem 1) capacidade de autorrenovação, preservando o seu estado indiferenciado mesmo depois de vários ciclos de divisão, 2) capacidade de proliferação contínua ao longo da vida do organismo, permitindo manter a *pool* de células estaminais e 3) capacidade de diferenciação em vários tipos de células funcionais maduras do organismo ao adquirirem as características específicas das células a que vão dar origem^{1,2}. Existem vários tipos de células estaminais que podem ser distinguidas de acordo com a sua capacidade de diferenciação e a sua origem, estando presentes durante várias etapas do desenvolvimento do organismo, desde a formação do embrião até à fase adulta^{1,3}.

Após a fecundação, forma-se uma única célula designada por zigoto a partir da qual se inicia a embriogénese. O zigoto é a única célula capaz de gerar um organismo completo, dando origem a todas as células do organismo, bem como à placenta e aos tecidos extra-embriónicos. Esta capacidade, designada por totipotência, está presente no zigoto e nas primeiras células resultantes da sua divisão até este atingir a conformação de mórula. A diferenciação das células da mórula resulta na formação do blastocisto que é composto por células do trofoblasto e por uma massa interna de células indiferenciadas (*inner cell mass*) designadas por células estaminais embrionárias. As células estaminais embrionárias apresentam a capacidade de originar células dos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme), dando posteriormente origem a todos os tipos celulares do organismo, com exceção dos tecidos extra-embriónicos. Assim, as células estaminais embrionárias são classificadas como pluripotentes relativamente à sua capacidade de diferenciação^{1,4,5}.

À medida que o embrião se desenvolve, o espetro de tipos celulares nos quais as células se podem diferenciar diminui. Após a diferenciação das células estaminais embrionárias nos diferentes folhetos germinativos, estas células tornam-se multipotentes dada a sua especificidade para formar um número restrito de tipos celulares². As células da endoderme diferenciam-se em células do trato digestivo e respiratório; as células da mesoderme originam os músculos, os ossos, o tecido adiposo

e as células do sangue; e as células da ectoderme são responsáveis pela formação da pele e do sistema nervoso^{1,6}.

No organismo adulto encontram-se células estaminais multipotentes responsáveis pela regeneração dos tecidos danificados e por manter a sua homeostase ao longo da vida³, sendo a taxa de renovação variável entre os diferentes tecidos: por exemplo, enquanto as células estaminais epiteliais da pele e do sistema digestivo estão constantemente a ser recrutadas para substituir as células antigas ou lesadas, as células estaminais neuronais apresentam-se num estado quase quiescente e a taxa de renovação das células é muito baixa². As células estaminais adultas podem ser isoladas de vários tecidos do organismo, nomeadamente da medula óssea, tecido adiposo, músculos, polpa dentária, entre outros⁷. Apesar destas células originarem células maduras do tecido onde se encontram, há evidências de que pode haver conversão noutras linhagens celulares, propriedade esta designada por plasticidade celular^{6,8}.

Os tecidos fetais, como o líquido amniótico, a placenta, o tecido e o sangue do cordão umbilical são também fontes de células estaminais^{7,9}. Apesar de serem classificadas como adultas porque provém do organismo após o nascimento, as células estaminais fetais possuem alguns marcadores específicos das células estaminais embrionárias, apresentando um maior potencial relativamente às células estaminais adultas no que diz respeito à capacidade proliferativa e potencial de diferenciação⁹.

1.2. Células Estaminais Hematopoiéticas e Terapia Celular

Dado o potencial regenerativo das células estaminais, o desenvolvimento de terapias celulares baseadas nestas células tem sido explorado ao longo dos últimos 50 anos¹⁰. Os tratamentos clínicos com células estaminais têm maioritariamente como base a utilização de células estaminais hematopoiéticas para a reconstituição do sistema hematopoiético (células do sangue) e imunitário, provenientes tanto da medula óssea como do sangue periférico^{10,11}.

As células do sangue (leucócitos, eritrócitos e plaquetas) são produzidas pela proliferação e diferenciação das células estaminais hematopoiéticas. Através do processo de hematopoiese, as células estaminais hematopoiéticas passam por vários estágios de maturação gerando várias linhagens de progenitores hematopoiéticos com diferentes potenciais de diferenciação antes de concluírem a sua maturação¹². Assim, o comprometimento das células estaminais hematopoiéticas numa determinada linhagem celular é acompanhado pela perda da capacidade de autorrenovação e do potencial de diferenciação¹³. Nos adultos, a hematopoiese ocorre maioritariamente na medula óssea,

o que faz desta a maior fonte de células estaminais adultas. No entanto, as células estaminais podem também ser mobilizadas do sangue periférico recorrendo a tratamentos com citocinas e outros fármacos¹⁴.

Existem diversas patologias que podem ser tratadas com recurso às células estaminais hematopoiéticas, nomeadamente doenças hemato-oncológicas e doenças não-oncológicas¹⁵. No tratamento de doenças hemato-oncológicas, como leucemias e linfomas, o transplante de células estaminais tem como objetivo reconstruir o sistema hematopoiético após tratamentos de quimioterapia e radioterapia agressivos^{13,16}. Já nas doenças não-oncológicas, o objetivo do transplante é repor/substituir células ou fornecer novas fontes de enzimas que estão em falta no organismo no sentido de recuperar uma função perdida, como é o caso de deficiências medulares, hemoglobinopatias, imunodeficiências e doenças metabólicas^{15,17,18}.

O transplante de células estaminais hematopoiéticas pode ser realizado utilizando as células do próprio paciente (transplantação autóloga) ou provenientes de um dador (transplantação alogénica). Os transplantes alogénicos requerem um dador de células estaminais hematopoiéticas. Neste caso, é necessário que haja um elevado nível de compatibilidade HLA entre o dador e o paciente de forma a evitar o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), que resulta do ataque dos linfócitos T do dador às células do paciente, podendo ser mortal^{11,19}. No caso dos transplantes autólogos não há exigências relativamente à compatibilidade HLA.

1.3. Sangue do Cordão Umbilical como Fonte de Células Estaminais Hematopoiéticas

A existência de células estaminais hematopoiéticas no sangue do cordão umbilical (SCU) foi descrita pela primeira vez por Knudtzon em 1974²⁰, despertando o interesse da comunidade científica neste tecido que até então tinha sido considerado como um excedente do parto. Em 1982, Broxmeyer propôs a utilização do SCU como fonte de células estaminais transplantáveis e após vários anos de estudos sobre a biologia e a criopreservação destas células estaminais reuniram-se as condições para a realização do primeiro transplante de células estaminais do SCU²¹, que ocorreu em 1988 no tratamento de uma criança de 5 anos com anemia de Fanconi²². Foi colhido e criopreservado o SCU da irmã recém-nascida do doente que apresentava compatibilidade HLA total com o irmão. Os primeiros sinais do transplante apareceram 22 dias depois, tendo-se verificado mais tarde a reconstituição hematológica e

imunológica completa do paciente pela presença de células da sua irmã na sua medula óssea²². O paciente não apresentou GVHD e hoje é uma pessoa saudável após 25 anos^{21,22,23}. Outros transplantes foram realizados nos anos seguintes com doadores relacionados e não-relacionados no tratamento de várias doenças^{24,25,26,27}.

O sucesso do primeiro transplante de células estaminais hematopoiéticas mostrou que o sangue de um cordão umbilical contém células estaminais hematopoiéticas suficientes para reconstituir o sistema hematológico e imunológico e que as células estaminais hematopoiéticas podem ser descongeladas e transplantadas em pacientes depois de criopreservadas sem perderem a sua capacidade de regeneração²³.

O SCU constitui uma fonte alternativa de células estaminais com vantagens clínicas relativamente a outras fontes de células estaminais, nomeadamente a medula óssea. Para além da sua colheita não ser invasiva e de não apresentar qualquer risco para a mãe ou para o recém-nascido, o SCU apresenta baixa contaminação viral e, conseqüentemente, um baixo risco de transmissão de vírus latentes^{7,28}. Relativamente às células estaminais adultas, as células estaminais hematopoiéticas do SCU produzem mais colónias hematopoiéticas *in vitro*, apresentando maior capacidade de proliferação e taxas de divisão mais elevadas por serem células mais imaturas^{29,30}. Para além disso, nos transplantes alogénicos o transplante de células estaminais hematopoiéticas do SCU é mais tolerado pelo paciente quando não há compatibilidade HLA total, sendo que o risco de desenvolver GVHD é mais baixo porque grande parte dos linfócitos T do SCU ainda não estão ativados, ao contrário do que acontece na medula óssea^{7,28,29,30,31}.

Sendo a colheita do SCU uma oportunidade única, surgiu a necessidade de criar bancos de armazenamento de SCU no sentido deste ser criopreservado para futura utilização autóloga ou alogénica. Em 1993 surge o primeiro banco público nos Estados Unidos da América³² e a partir desse ano outros bancos foram criados em vários países da Europa³³. Os bancos públicos armazenam o SCU de recém-nascidos com o objetivo de ser posteriormente utilizado noutros pacientes que necessitem de um transplante de células estaminais hematopoiéticas (transplantação alogénica). Pacientes que não tenham um familiar ou um dador de medula óssea compatível podem recorrer a estes bancos. No entanto, não há garantias de que os doadores do SCU tenham acesso à sua amostra no futuro. Os SCU doados são analisados relativamente aos alelos HLA e ficam registados numa base de dados nacional ou internacional que permite que sejam encontrados pelos centros de transplantação quando alguém necessita de um transplante³⁴.

A compatibilidade HLA é importante para garantir que o transplante não é rejeitado pelo sistema imunitário do paciente e que este não desenvolve GVHD, sendo

este o principal parâmetro em que se baseia a seleção de uma unidade de SCU para a realização de um transplante alogénico. A probabilidade de encontrar um dador compatível não-relacionado é bastante baixa³⁵. Os transplantes autólogos apresentam uma vantagem nesse sentido, visto que é utilizado o SCU do próprio paciente e a compatibilidade HLA é total. Da mesma forma, nos transplantes alogénicos relacionados, em que é utilizado o SCU de um familiar próximo do paciente, a probabilidade de haver compatibilidade HLA é maior. Os bancos familiares armazenam o SCU para uso autólogo ou familiar na eventualidade do recém-nascido ou de um familiar vir a desenvolver uma doença que possa ser tratada recorrendo à terapia com células estaminais³⁶.

Antes de serem armazenadas nos bancos de criopreservação, as amostras de SCU são sujeitas a uma série de controlos e testes com o objetivo de serem avaliadas quanto ao cumprimento de vários requisitos para serem criopreservadas. Os requisitos para uso terapêutico das amostras de SCU baseiam-se em contagens celulares, viabilidade celular, entre outros.

1.4. Da Colheita ao Armazenamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

De modo a garantir que as amostras de SCU armazenadas possam ser utilizadas clinicamente com sucesso, é necessário otimizar os vários passos desde a colheita ao congelamento das amostras, passando pelo transporte, processamento e controlo analítico. De seguida, será descrita cada uma destas etapas em pormenor.

1.4.1. Colheita

O método de colheita do SCU varia consoante o banco onde este será criopreservado ou o hospital onde será colhido. Nos primeiros transplantes com SCU, a colheita consistia no corte do cordão umbilical após o parto do recém-nascido, seguido da recolha do sangue da veia do cordão umbilical na zona de corte para um recipiente de vidro graduado que continha citrato de sódio como anticoagulante³⁷. Atualmente, este processo é realizado através de punção venosa e o SCU é drenado para um saco de colheita de plástico esterilizado contendo uma solução anticoagulante. O SCU pode ser colhido antes da remoção da placenta (*in utero*) ou após a expulsão da mesma (*ex*

utero), sendo o primeiro método mais utilizado pela facilidade com que é executado. Enquanto que a colheita *ex utero* requer a presença de pessoal especializado, a colheita *in utero* pode ser realizada pela equipa de médicos/enfermeiros presente na sala de parto, não interferindo com a sua rotina habitual³⁴. Na colheita *in utero*, o cordão umbilical é duplamente clampeado e cortado entre os *clamps* para separar o recém-nascido da placenta. Depois do cordão umbilical ser devidamente desinfetado, insere-se a agulha do kit de recolha na veia do cordão umbilical e o sangue é recolhido por gravidade para o saco de colheita esterilizado. Na colheita *ex utero*, após a separação do recém-nascido, a placenta é expulsa e colocada em suspensão num suporte apropriado e o sangue é colhido da veia do cordão umbilical por gravidade para o saco de colheita³⁴. Existem várias evidências de que a colheita *in utero* promove a recolha de um maior volume de sangue relativamente à colheita *ex utero*, bem como uma maior número de células nucleadas totais (TNC)^{38,39,40} devido à pressão exercida pelo útero sobre a placenta³⁴.

Depois de colhida, a amostra é transportada para o laboratório sob condições de temperatura controladas.

1.4.2. Processamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Antes de serem criopreservadas, as amostras de SCU são processadas, regra geral, através de um processo de redução de volume por concentração das células nucleadas da amostra. O objetivo primário da redução de volume consiste em reduzir todas as amostras de SCU a um volume padronizado, mantendo a quantidade e funcionalidade das células de interesse sem risco de contaminação. O SCU pode também ser criopreservado na sua totalidade sem qualquer tipo de manuseamento⁴¹. Apesar de terem sido já realizados transplantes com amostras de SCU não-manipuladas com sucesso⁴², a criopreservação do SCU com grandes volumes não apresenta uma boa relação custo/benefício. Um dos principais problemas reside no espaço ocupado nos contentores de azoto. Cada SCU pode ter até 200mL⁴³, pelo que seria necessário uma grande área para armazenar milhares de amostras. Para além disso, seria necessário adicionar uma grande quantidade de crioprotetor a cada amostra, o que não é benéfico para os futuros pacientes, visto que o crioprotetor apresenta efeitos tóxicos após a sua administração^{37,44}. Diminuindo o volume do SCU, os custos com azoto, com contentores de armazenamento e com a sua manutenção são reduzidos e, acima de tudo, haverá menos consequências nefastas para o doente após o transplante⁴⁵.

A maioria dos métodos de processamento de SCU por redução de volume tem como objetivo reduzir o volume inicial através da remoção dos componentes que não

tem interesse guardar no contexto da transplantação (eritrócitos e plasma). Os primeiros estudos realizados no sentido de melhorar o processo de redução de volume resultaram no desenvolvimento de várias metodologias distintas que tinham como base a formação de gradientes de densidade com *Percoll*⁴¹ ou *Ficoll*^{46, 47}, a sedimentação dos eritrócitos com gelatina⁴⁸, metilcelulose, dextrano⁴⁹ ou hidroxietilamido (HES)^{50,51} e a lise dos eritrócitos⁵². Apesar de apresentarem boas recuperações celulares, estes métodos são bastante trabalhosos, pelo que não eram adequados para processar grandes quantidades de amostras de SCU⁵².

A necessidade de desenvolver métodos que permitissem o processamento eficiente de amostras em larga escala levou ao aparecimento de metodologias parcialmente automatizadas. O método *Top & Bottom (T&B)* surgiu como uma melhoria dos métodos manuais no sentido em que não implica a manipulação direta da amostra pelo operador e, portanto, demora menos tempo a processar as amostras⁵³.

Mais tarde, foram desenvolvidos sistemas automáticos que permitem a sedimentação e a separação das células num único passo, como o sistema Sepax[®] e o sistema AutoXpress[®] (AXP). Estes métodos têm a vantagem de reduzir todas as amostras de SCU a um volume final padronizado num sistema fechado e sem manipulação das amostras pelo operador⁵⁴, garantindo a segurança e esterilidade das mesmas. A uniformização do processo de redução de volume do SCU garante produtos finais de qualidade sem comprometer a viabilidade e potencialidade das células estaminais e progenitoras hematopoiéticas, para além de permitir a uniformização dos restantes passos do processamento.

Outra metodologia que surgiu como uma alternativa aos métodos semi-automáticos e automáticos tem por base um sistema de filtração de células totalmente manual e que não requer equipamentos específicos que estejam dependentes de energia elétrica⁵⁵.

Embora os métodos de redução de volume tenham sofrido uma evolução ao longo do tempo, o principal objetivo é sempre obter produtos celulares de alta qualidade que possam ser utilizados com sucesso como terapia celular. A descrição destes métodos, incluindo as vantagens e desvantagens de cada um, será detalhado mais à frente neste capítulo.

1.4.3. Criopreservação

A criopreservação consiste na utilização de temperaturas muito baixas para preservar amostras biológicas sem promover danos celulares e mantendo as células viáveis⁵⁶. Embora ainda não se saiba se a criopreservação por mais de 25 anos tem impacto no resultado dos transplantes de SCU⁵⁷, já foi reportado que as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas se mantêm viáveis e com capacidade proliferativa após criopreservadas durante mais de 20 anos⁵⁸.

Regra geral, as amostras de SCU são armazenadas na fase gasosa de azoto líquido que se encontra a -196°C ⁵⁹. Para que as amostras atinjam temperaturas negativas sem perderem a sua viabilidade celular, é importante ter em conta fatores como a solução crioprotetora adicionada e o protocolo de congelamento/taxa de descida da temperatura⁶⁰.

Antes de serem armazenadas, as amostras são normalmente congeladas em equipamentos de congelação abastecidos com azoto líquido que permitem uma descida controlada da temperatura das amostras até estas atingirem uma temperatura de cerca de -150°C ^{61,62,63}.

Em alternativa à descida controlada da temperatura, pode arrefecer-se o SCU até -4°C e depois armazená-lo diretamente a -80°C ou em azoto na fase gasosa (descida não-controlada da temperatura). Apesar de este não ser o protocolo padrão dos bancos de SCU, há estudos que comprovam a segurança deste tipo de congelamento⁶². A descida controlada da temperatura apresenta vantagens relativamente à descida não-controlada visto manter a viabilidade celular após o congelamento. Na descida não-controlada da temperatura, as células sofrem uma variação de temperatura brusca, o que pode afetar a sua integridade e viabilidade dada a maior suscetibilidade à ocorrência de danos celulares^{63,64}.

Durante o congelamento, ocorre a formação de cristais de gelo dentro e fora da célula que leva à sua rutura, tornando-as inviáveis para futura utilização. Para prevenir esta consequência do abaixamento de temperatura, é necessária a adição de um crioprotetor às amostras de SCU antes de se proceder ao seu congelamento. O crioprotetor mais utilizado é o dimetil sulfóxido (DMSO) que atravessa a membrana celular devido à sua baixa hidrofiliabilidade e forma ligações de hidrogénio com as moléculas de água, evitando a formação de cristais de gelo no interior das células e, conseqüentemente, a lise celular^{63,65}. Normalmente, o DMSO é utilizado a uma concentração de 10% combinado com um polissacarídeo, por exemplo dextrano^{60,66,65}.

1.4.4. Controlo de Qualidade

Para garantir que as amostras de SCU criopreservadas podem ser utilizadas com sucesso é necessário efetuar um rigoroso controlo de qualidade. Os principais parâmetros associados ao resultado dos transplantes de SCU são o número de TNC, o número de células estaminais hematopoiéticas e a capacidade de formação de colónias *in vitro*, sendo o conteúdo em TNC o parâmetro mais utilizado na seleção de uma unidade de SCU para a sua utilização num transplante^{67,68}. Estas características, assim como outros parâmetros, podem ser avaliados antes e após o processamento das amostras, isto é, antes da sua criopreservação, e/ou após o seu descongelamento, sendo que o momento desta avaliação, bem como os métodos utilizados, variam entre os bancos de criopreservação e centros de transplantação.

A realização de contagens hematológicas utilizando um contador hematológico permite quantificar o número de TNC, que inclui o número de leucócitos e eritrócitos imaturos. Algumas subpopulações de leucócitos também são quantificadas, particularmente os linfócitos e os monócitos que constituem as células mononucleadas (MNC). São também obtidos os valores do hematócrito, da concentração de eritrócitos e de plaquetas. A percentagem de TNC e MNC recuperadas após o processamento pode ser obtida a partir de contagens celulares realizadas antes e após o processamento.

As células estaminais e progenitoras hematopoiéticas são caracterizadas pela expressão de vários antigénios/marcadores à sua superfície, o que permite a sua distinção de outros tipos celulares. A presença do *cluster* de diferenciação 34 (CD34) na superfície das células estaminais hematopoiéticas é o principal elemento de caracterização desta população celular, que é altamente expresso em células indiferenciadas e cuja expressão vai diminuindo à medida que estas se diferenciam e se tornam maduras^{69,70}. No sentido de avaliar o número de células estaminais hematopoiéticas existentes em cada amostra, procede-se à quantificação das células que expressam o antigénio CD34 à sua superfície por citometria de fluxo.

A viabilidade celular é avaliada após o processamento através da utilização de um marcador que permite distinguir as células vivas das células mortas. Existem vários marcadores de viabilidade que podem ser utilizados, como o 7-aminoactinomicina D (7-AAD), o azul de tripano, o brometo de etídio-laranja de acridina ou o iodeto de propídio-laranja de acridina⁷¹. A viabilidade celular pode ser obtida por uma técnica manual ou automática, como a citometria de fluxo.

A avaliação da capacidade de formação de colónias celulares *in vitro* é um importante indicador do potencial regenerativo das células do SCU. Este parâmetro é geralmente avaliado após a criopreservação da amostra, antes da sua transplantação, não sendo rotineiramente avaliado nos bancos de criopreservação.

Outro ensaio de controlo de qualidade realizado em todas as amostras de SCU é a avaliação da presença de microrganismos. Esta pode ser avaliada pela inoculação de um pequeno volume de amostra de SCU em diferentes meios de cultura, específicos para microrganismos aeróbios e anaeróbios. São também feitas análises a uma amostra de sangue materno colhida na altura do parto no sentido de pesquisar agentes infecciosos tais como o HIV-1 e HIV-2, HBV e HCV, *Treponema pallidum* (sífilis), citomegalovirus (CMV), entre outros, através de técnicas como o PCR e serologia³⁷.

1.4. Métodos de Processamento do Sangue do Cordão Umbilical

1.4.1. Sedimentação com Hidroxietilamido

O método de sedimentação com HES foi desenvolvido pelo New York Cord Blood Center em 1995⁵⁰. Este método permite o isolamento da fração de células nucleadas do SCU através de duas centrifugações. Após a adição de HES 6% ao SCU inicial (concentração final de 1,2% HES), este é centrifugado a 50xg de forma a sedimentar os eritrócitos e obter um plasma rico em células nucleadas⁵⁰. Nesta fase, o HES promove uma melhor sedimentação dos eritrócitos visto estas células serem mais densas. Ao mesmo tempo, o HES impede que as células nucleadas sejam arrastadas juntamente com os eritrócitos, ficando suspensas no plasma^{72,73}. O plasma rico em células nucleadas e uma pequena fração dos eritrócitos são transferidos para outro recipiente e sofrem uma segunda centrifugação a 400xg para sedimentar os leucócitos e os eritrócitos de forma a remover posteriormente o plasma em excesso até perfazer o volume final pretendido, obtendo-se um produto final concentrado em células nucleadas pronto para ser criopreservado⁵⁰. Por ser um método manual, o método do HES é bastante moroso e requer sensibilidade e controlo por parte dos operadores para conseguir remover o início da fração dos eritrócitos e o plasma rico em células nucleadas de forma a obter uma boa recuperação celular. Contudo, a maioria dos métodos desenvolvidos posteriormente a este método têm como base a eliminação dos eritrócitos, recorrendo, por vezes, à utilização deste reagente.

1.4.2. *Top & Bottom*

O método *Top & Bottom (T&B)*, descrito inicialmente por Ademokun *et al.*⁷⁴ para o processamento de amostras de SCU, tem como base uma centrifugação para sedimentar os componentes do sangue e a separação dos componentes através de um sistema automatizado. O SCU é transferido para o saco principal de um kit de processamento constituído por três compartimentos distintos conectados entre si. O saco do SCU está conectado a um compartimento pela parte superior e a outro compartimento pela parte inferior. Depois de transferido para o kit, o SCU sofre uma centrifugação intensa e é colocado num dispositivo de separação dos componentes sanguíneos pelo operador. Este dispositivo exerce pressão sobre o saco de SCU centrifugado fazendo com que o plasma seja transferido para o compartimento de cima e os eritrócitos para o compartimento de baixo, mantendo a fração de células nucleadas no saco principal. A patilha que faz pressão sobre o saco de SCU tem uma célula fotossensível que regula o fluxo do plasma. Como o plasma é menos viscoso do que os eritrócitos, flui mais rápido e a camada de células nucleadas tende a subir com o plasma. Quando esta camada de células é detetada pela célula fotossensível é ativado um sistema de clampagem que para o fluxo de plasma. Quando a camada de células nucleadas está novamente mais abaixo no saco devido à saída contínua dos eritrócitos, o sistema de clampagem volta a permitir o fluxo de plasma mantendo, assim, a camada de células nucleadas no centro do saco⁷⁵. Este processo ocorre até que o plasma e os eritrócitos tenham sido removidos e fração de células estaminais atinja o volume previamente programado no dispositivo.

Existem dois dispositivos que permitem fazer a separação dos componentes celulares após a centrifugação^{45,76,77}. Optipress II™ (Baxter Health) (Figura 1A) e Compomat G4™ (Fresenius Hemocare Inc.) (Figura 1B). Ambos os equipamentos apresentam recuperações celulares semelhantes. Contudo, o sistema Optipress II™ consegue recuperar uma maior percentagem de linfócitos e eliminar os eritrócitos mais eficientemente⁷⁷.

A maior desvantagem do método T&B reside na menor capacidade de eliminar os eritrócitos relativamente ao método de sedimentação com HES^{45,72}. Contudo, o método *T&B* tem a vantagem de processar o SCU em menos tempo e em apenas uma centrifugação, ao contrário do método de sedimentação com HES que requer duas centrifugações. Para além disso, permite processar amostras de SCU em larga escala sem implicar a manipulação direta das amostras pelo operador.

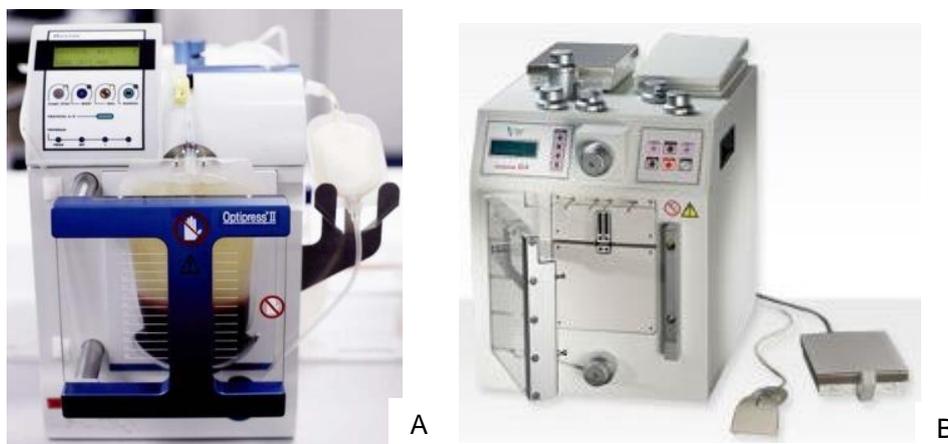


Figura 1. Sistemas de separação dos componentes celulares utilizados no método *T&B*. **A.** Sistema Optipress II™ da Baxter Health Care (www.medquest.co.id). **B.** Sistema Compomat G4™ da Fresenius Kabi (www.bpharma-basic.net).

1.4.3. Sepax®

O sistema Sepax® (Figura 2A) foi o primeiro método automático de redução de volume implementado nos bancos de criopreservação de SCU. Este sistema foi desenvolvido pela Biosafe (www.biosafe.ch) e permite a separação e redução de volume de várias fontes de células estaminais, nomeadamente do SCU, medula óssea, tecido adiposo e sangue periférico.

O dispositivo Sepax® consiste num sistema pneumático e de centrifugação com a capacidade de encher e esvaziar uma câmara de separação pela exerceção de vácuo ou pressão, respetivamente, através de um êmbolo. O kit de processamento para amostras de SCU é constituído por uma câmara de separação, um saco de recolha dos eritrócitos, um saco de recolha do plasma e um saco de criopreservação para onde vai ser transferida a fração de células nucleadas no final do processamento (Figura 2B). O SCU é transferido para a câmara de separação do kit de processamento por força da gravidade, onde vai ser centrifugado, passando por um filtro de coágulos. Na primeira fase da centrifugação, que ocorre a 1250xg, os componentes celulares vão ser sedimentados nas paredes laterais da câmara. Os eritrócitos são os primeiros a ser sedimentados, ficando as células nucleadas em cima dos eritrócitos, e no centro da câmara o plasma. A velocidade da centrifugação decresce para 600xg para proceder à

transferência dos componentes celulares. Através de um sensor ótico, as variações da transmitância da luz derivadas dos diferentes componentes sanguíneos vão ser detetadas e estes são transferidos para diferentes compartimentos através da subida do êmbolo e da abertura de válvulas associadas ao kit de processamento. O primeiro componente a sair é o plasma, depois a fração de células nucleadas e finalmente os eritrócitos (Figura 3)^{52,78,79}.

O sistema Sepax[®] inclui dois protocolos para a redução do volume de SCU. Um dos protocolos inclui a adição do agente de sedimentação HES^{80,81,82}, enquanto que o outro não requer a adição de nenhum reagente adicional^{78,83}. As recuperações celulares são ligeiramente mais baixas com o protocolo sem adição de HES. No entanto, não adicionando nenhuma solução à amostra durante o processo, o risco de contaminação diminui. Em ambos os protocolos o volume final pode ser pré-definido pelo operador. No final do processamento de cada amostra de SCU é gerado um relatório que indica exatamente o volume final obtido de cada um dos componentes celulares.

A redução dos eritrócitos com o Sepax[®] não é tão eficiente como com o método de sedimentação com HES⁷⁸ ou métodos de gradientes de densidade, como o *Ficoll-Hypaque*⁸⁴, sendo este um aspeto a melhorar neste dispositivo automático. A uniformização do volume após o processamento é uma das principais vantagens do Sepax[®], assim como a automatização do processamento das amostras de SCU.

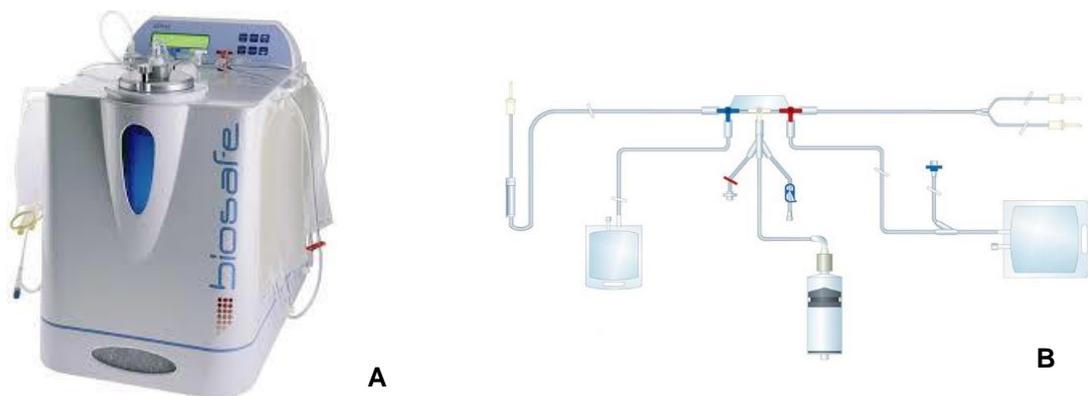


Figura 2. A. Sistema Sepax[®] (Biosafe). **B.** Kit de processamento de amostras de SCU do sistema Sepax[®] (Adaptado de <https://www.biosafe.ch>).

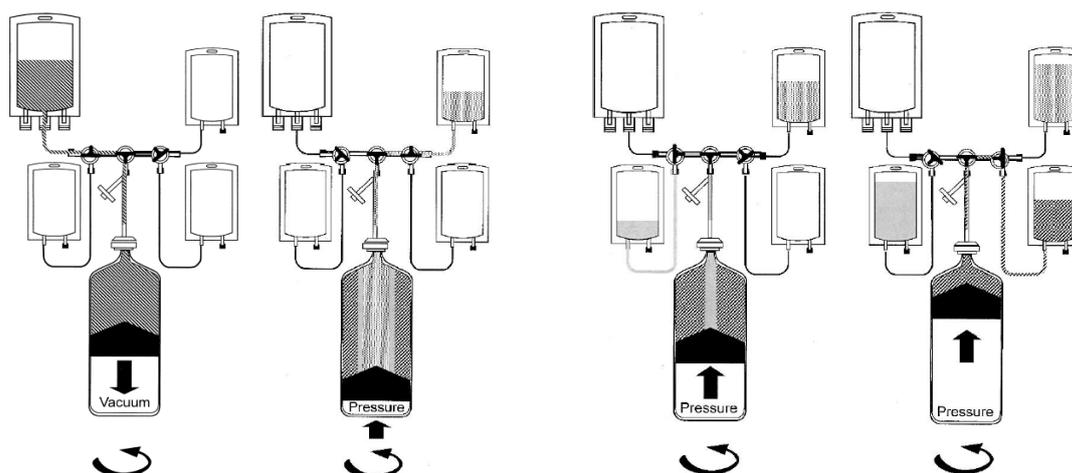


Figura 3. Esquema representativo do processamento do SCU com o sistema Sepax®.
 ▨ SCU antes do processamento; ▩ Fração de células nucleadas; ▧ Plasma; ▦ Eritrócitos.⁷⁹

1.4.4. AutoXpress®

O sistema AXP® (Figura 4A) é outro método automático de processamento celular desenvolvido pela Cesca™ Therapeutics para processar amostras de SCU. Este sistema consiste num dispositivo recarregável controlado por um microprocessador e que contém compartimentos específicos para acomodar um conjunto de sacos do kit de processamento que mantém a amostra num ambiente totalmente fechado e estéril. O kit de processamento é constituído por um saco principal onde ocorre o processamento do SCU, um filtro de coágulos, um compartimento para os eritrócitos, e um saco de criopreservação para a fração de células nucleadas. Para além disso, ele contém duas ampolas para a remoção de alíquotas de SCU antes e após o processamento para a realização do controlo de qualidade e um filtro para a adição de DMSO antes da criopreservação (Figura 4B).

Após a transferência do SCU para o saco principal do kit de processamento, este é acoplado ao dispositivo de processamento que é posteriormente colocado numa centrífuga. Cada centrífuga tem a capacidade de processar entre 4 a 6 amostras simultaneamente. Durante o processamento, ocorrem duas centrifugações: uma a alta velocidade e outra a baixa velocidade. Na centrifugação a alta velocidade, os componentes ficam estratificados, sendo os eritrócitos os primeiros a sedimentar e de seguida as células nucleadas, ficando o plasma por cima. Durante a centrifugação a baixa velocidade, os componentes são transferidos para os respetivos compartimentos,

sendo os eritrócitos os primeiros a sair. À medida que ocorre a transferência dos eritrócitos, a variação da transmitância da luz devido à diminuição da concentração dos eritrócitos é detetada por um sensor ótico presente no fundo do saco de processamento, levando à rotação de uma válvula associada ao kit de processamento e iniciando a transferência da fração de células nucleadas para o saco de criopreservação que é acompanhada de uma pequena porção de eritrócitos (Figura 5). O volume final, que foi previamente programado, será atingido pela adição da quantidade de plasma que for necessária. O plasma que não foi utilizado para perfazer o volume final permanece no saco de processamento, fazendo com que os três componentes (eritrócitos, plasma e fração celular) fiquem em sacos separados^{37,52}.

Cada dispositivo de processamento está associado a um *software* (XpressTRAK[®]) que permite o armazenamento dos dados do processamento de cada amostra bem como os dados do funcionamento de cada dispositivo durante cada ciclo de processamento para assegurar a conformidade do mesmo. A transferência de dados dos dispositivos para o *software* ocorre através de uma base de comunicação (*docking station*), que é também o local onde a bateria dos dispositivos é recarregada.

O AXP[®] destaca-se dos restantes métodos pela sua eficiência na redução dos eritrócitos, que consegue ser superior à do método de sedimentação com HES^{85,86}. Para além disso, segundo a uma meta-análise da Cesca[™] Therapeutics, as recuperações celulares obtidas com este sistema são maiores relativamente ao sistema Sepax[®], nomeadamente a recuperação de MNC que incluem as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas⁸⁶.

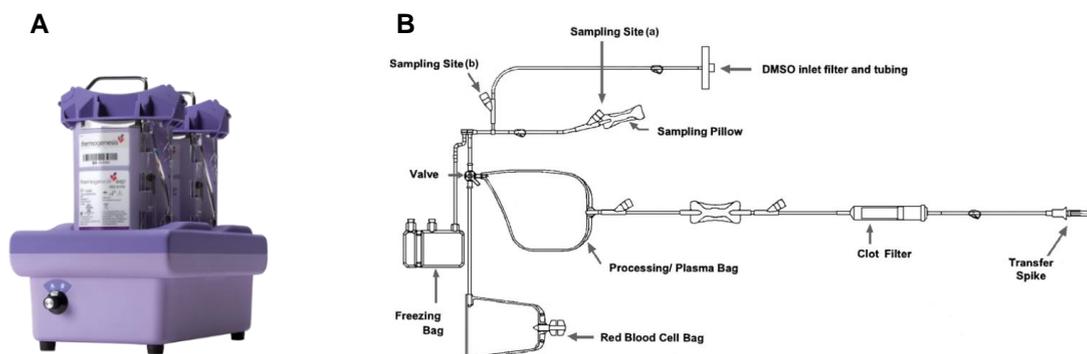


Figura 4. Sistema AutoXpress[®]. **A.** Dispositivos de processamento do sistema AutoXpress[®] na base de comunicação (www.cescatherapeutics.com). **B.** Kit de processamento do sistema AutoXpress[®] ¹⁴⁷.

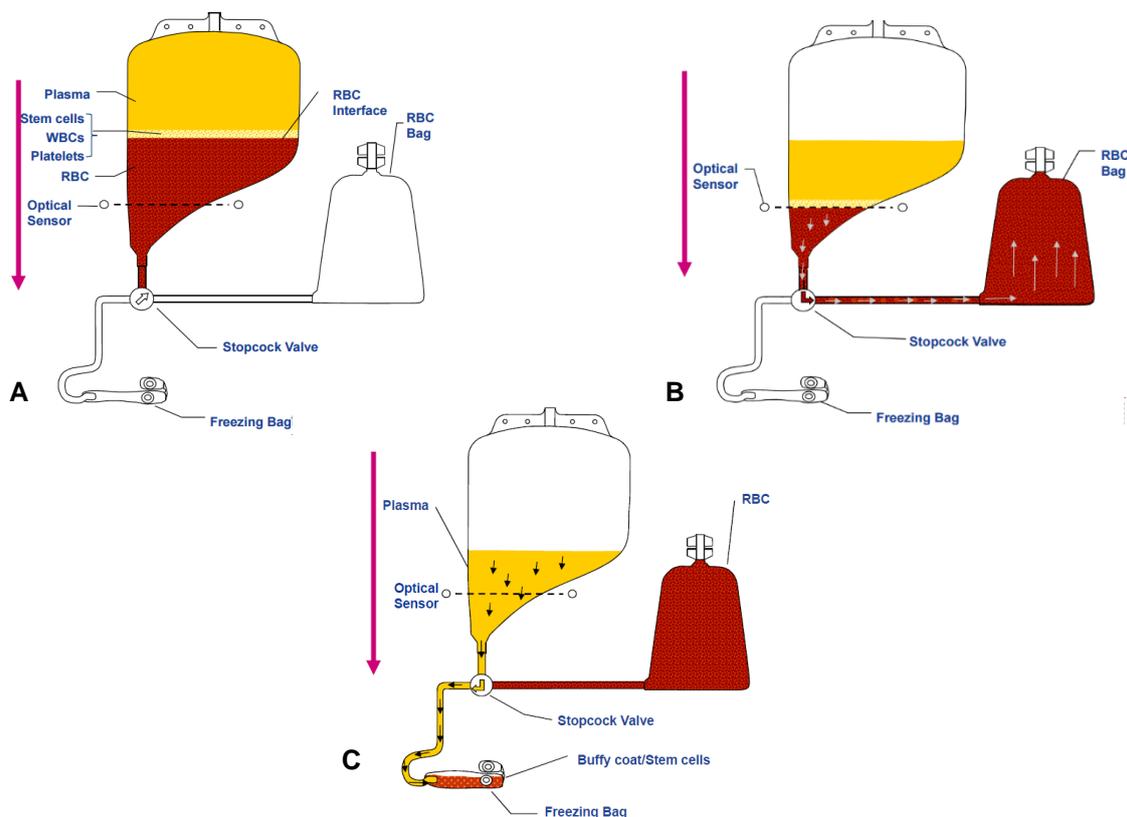


Figura 5. Esquema representativo do processamento do SCU com o sistema AutoXpress[®]. **A.** Estratificação dos componentes celulares por centrifugação a alta velocidade. **B.** Centrifugação a baixa velocidade e redução dos eritrócitos. **C.** Transferência da fração de células nucleadas. (Adaptado de www.cescatherapeutics.com).

Ambos os sistemas Sepax[®] e AXP[®] permitem o processamento automático do SCU num ambiente fechado que garante a segurança e esterilidade das amostras. Estes sistemas conseguem ultrapassar as limitações dos métodos manuais no que respeita à variabilidade associada a cada operador, o risco de contaminação e o tempo do processamento. A automatização é a chave para garantir unidades de SCU de alta qualidade sem comprometer a viabilidade e potencialidade das células.

1.4.5. Sistemas de Filtração

Os filtros de sangue foram inicialmente desenvolvidos no sentido de reduzir o conteúdo em leucócitos e remover microagregados de leucócitos, de plaquetas e de fibrina do sangue que estão associados ao desenvolvimento de reações transfusionais não-hemolíticas que levam à ocorrência de tromboembolismo, ao desenvolvimento de GVHD e outras complicações em pacientes sujeitos a transfusões sanguíneas^{87,88,89}.

A maioria dos filtros utilizados na remoção dos leucócitos do sangue antes de se proceder a uma infusão é constituída por fibras sintéticas cuja densidade varia ao longo do filtro, promovendo a formação de poros com diferentes tamanhos. Normalmente, o tamanho dos poros diminui nas camadas mais profundas do filtro. Os leucócitos ficam retidos ao longo do filtro, sendo que os eritrócitos conseguem atravessar os poros devido à sua maior deformabilidade⁸⁸. Embora a retenção dos leucócitos nos filtros baseada no tamanho dos poros seja uma propriedade importante, este não é o único mecanismo conhecido que promove a retenção destas células. Outros mecanismos como a tensão superficial e a densidade de carga à superfície das fibras promovem uma maior adesão dos leucócitos ao filtro. As fibras que constituem os filtros podem ser modificadas de forma a melhorar estes mecanismos, sendo normalmente revestidas por um composto hidrofílico de forma a melhorar o contacto do sangue com o filtro, permitindo a passagem do sangue pelos espaços mais reduzidos nas camadas mais profundas do filtro⁹⁰. Contudo, a contribuição de cada mecanismo adjacente à retenção dos leucócitos ainda não é conhecida. Outros fatores como a temperatura e a composição do sangue no momento da filtração também têm um papel na capacidade de adesão e deformabilidade dos leucócitos⁹¹.

Existem vários sistemas de filtros utilizados para eliminar os leucócitos do sangue antes de transfusões sanguíneas que foram estudados no sentido de isolar as células nucleadas do SCU para posterior utilização em terapia celular, como o filtro Stem Cell Collection Filter ou filtro Stem Quick™ E da Asahi Kasei Medical Corporation (Tóquio, Japão)^{45,92,93,94,95} (Figura 6) e o filtro Procord™ TF-4 da Terumo Corporation (Tóquio, Japão)^{45,96} (Figura 7). Mais recentemente, o filtro CellEffic CB da Kaneka Corporation (Osaka, Japão)^{55,97} (Figura 8) foi desenvolvido exclusivamente para o processamento do SCU.

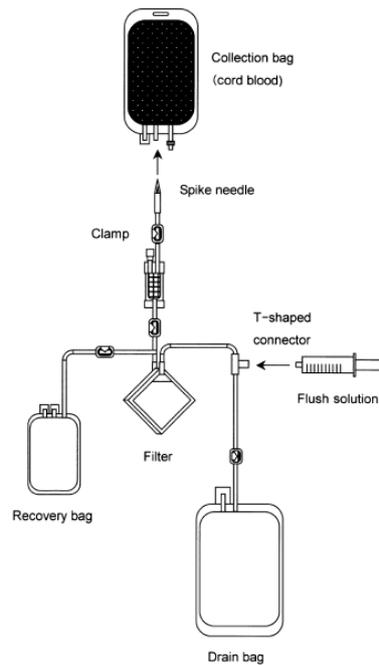


Figura 6. Representação do sistema de filtração Stem Cell Collection Filter ou Stem Quick™ E da Asahi Kasei Medical Corporation ⁹².

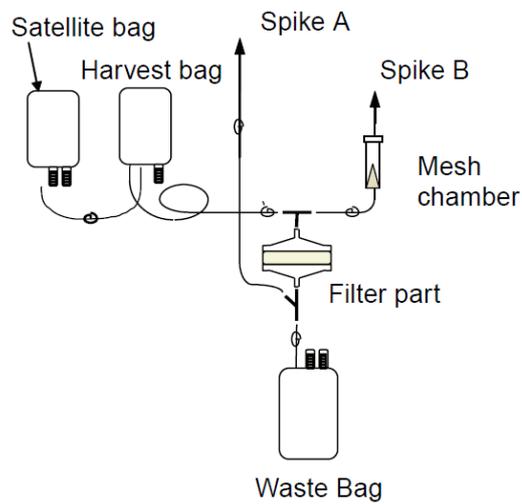


Figura 7. Representação do sistema de filtração Procord™ TF-4 da Terumo Corporation (Adaptado de Takahashi *et al.*, 2008⁴⁵).

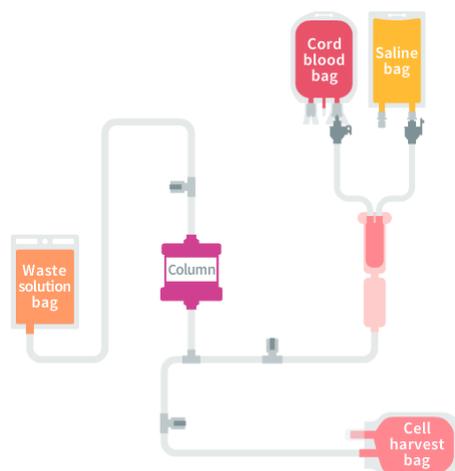


Figura 8. Esquema representativo do sistema de filtração CellEffic CB da Kaneka Corporation (Adaptado de www.kaneka-celleffic.com).

Todos estes sistemas de filtração apresentam os mesmos princípios de funcionamento, variando apenas no tipo de fibra do filtro e no seu revestimento. O SCU é transferido para o sistema por força da gravidade, passando pelo filtro onde vão ficar retidas as células nucleadas, enquanto os eritrócitos vão atravessar o filtro e são direcionados para um compartimento de resíduos. As células retidas no filtro vão ser eluídas para o saco de criopreservação final através da injeção de uma solução de albumina na direção inversa ao fluxo inicial do SCU. A injeção de um volume fixo desta solução de eluição permite padronizar o volume final para todas as amostras⁵².

Os sistemas de filtros surgiram como uma alternativa aos métodos automatizados por permitirem uma padronização do volume final de SCU sem a utilização de equipamentos dispendiosos e que requerem eletricidade e manutenção, para além de não ser necessária a intervenção do operador durante o processamento⁵⁵. No entanto, os sistemas de filtros apresentam recuperações celulares ligeiramente baixas relativamente aos métodos automáticos, T&B e sedimentação com HES^{45,52}, sendo que esta metodologia ainda não foi introduzida nos bancos de criopreservação onde o processamento de amostras de SCU ocorre em larga escala⁵².

Criada em 2003, a Crioestaminal é um banco de células estaminais que se dedica ao processamento e armazenamento de amostras de sangue e tecido do cordão umbilical. Anualmente, são processadas na Crioestaminal milhares de amostras de SCU através de sistemas de processamento automatizados. Inicialmente, o sistema de

processamento utilizado foi o Sepax[®], mas desde Maio de 2013 que este sistema foi substituído pelo AXP[®], dadas as vantagens apresentadas ao nível das recuperações celulares e redução dos eritrócitos.

2. Objetivos

Um dos objetivos do presente estudo foi a avaliação do impacto de vários fatores obstétricos, neonatais e outros em parâmetros laboratoriais das amostras de SCU antes e após o seu processamento. Estudaram-se fatores neonatais, como o sexo, o peso e a idade gestacional do recém-nascido, fatores obstétricos, nomeadamente o tipo de parto, e outros fatores como o tempo entre a colheita e o processamento, a bacteriologia e a fase da lua na altura do nascimento do recém-nascido. Para além destes, foram estudados alguns fatores intrínsecos às amostras de SCU, como a presença de coágulos, o volume, o número de TNC, o número de MNC, o número de eritrócitos e o hematócrito, no sentido de avaliar o seu impacto nos parâmetros laboratoriais após o processamento.

Com este trabalho, pretendeu-se também analisar e comparar dois métodos de redução de volume de SCU distintos, o Sepax[®] e o AXP[®], no que diz respeito à sua eficácia no processamento das amostras, que é traduzida principalmente pela percentagem de células recuperadas e pela capacidade de reduzir a fração de eritrócitos.

3. Material e Métodos

3.1. Análise Retrospectiva das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

No presente estudo, foram analisadas retrospectivamente 8430 amostras de SCU processadas e armazenadas na Crioestaminal entre 2012 e 2015. Foram recolhidos os dados laboratoriais relativos às amostras de SCU antes e após o seu processamento. Antes do processamento recolheram-se os dados relativos à presença de coágulos, ao volume, ao número e concentração de TNC e MNC e à concentração relativa de MNC em função do número de TNC (MNC/TNC). Após o processamento, foram recolhidos os valores do número de TNC, MNC e células CD34⁺, as concentrações relativas de MNC e células CD34⁺ em função do número de TNC (MNC/TNC e CD34⁺/TNC, respetivamente), as recuperações de TNC e MNC, a percentagem de redução dos eritrócitos e a viabilidade celular total e a viabilidade das células CD34⁺.

Foram também recolhidos os dados relativos aos fatores neonatais, como o peso, o sexo e a idade gestacional do recém-nascido, aos fatores obstétricos, nomeadamente o tipo de parto, e outros fatores como o tempo decorrido entre a colheita e o processamento, a bacteriologia e a fase da lua na altura do nascimento com o objetivo de avaliar o seu impacto nos parâmetros laboratoriais das amostras de SCU. Outro fator analisado foi o método utilizado no processamento das amostras de SCU.

3.2. Colheita e Transporte das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

O SCU foi colhido na sala de partos pela equipa médica imediatamente após o parto ainda antes da expulsão da placenta, após a clampagem do cordão umbilical. Após a desinfecção do cordão umbilical, o SCU foi colhido da veia do cordão por força da gravidade para um saco estéril revestido com 21mL de anticoagulante (CPD, Citrato Fosfato Dextrose) com capacidade de 150mL. Junto com o SCU foi enviada uma amostra de sangue materno para a realização de várias análises. As amostras foram devidamente acondicionadas e transportadas à temperatura ambiente para o laboratório da Crioestaminal, evitando choques mecânicos e variações de temperatura. Durante o transporte, a temperatura da amostra foi monitorizada continuamente. Chegadas ao laboratório, as amostras foram identificadas, pesadas e analisadas relativamente ao

cumprimento dos pré-requisitos estabelecidos pelo laboratório para proceder ao processamento das mesmas: massa superior a 46,5g ou, se o peso for inferior a este valor, concentração de TNC superior a $4 \times 10^3/\mu\text{L}$. As amostras que cumpriam estes critérios foram processadas com o sistema Sepax[®] ou com o sistema AXP[®].

3.3. Processamento do Sangue do Cordão Umbilical

3.3.1. Sepax[®]

Depois de registar o peso inicial do SCU, o saco de colheita foi acoplado ao kit de processamento (Biosafe) e foi retirada uma alíquota de 0,5mL de sangue antes de se proceder ao processamento para a realização do controlo de qualidade. Depois de seleccionar o protocolo pretendido, que não incluiu a adição de HES, instalou-se a câmara de separação e os restantes componentes do kit de processamento no sistema Sepax[®]. No final do processamento obteve-se uma fração de células nucleadas enriquecida em células estaminais e progenitoras hematopoiéticas, uma fração de plasma e uma fração de eritrócitos, todas elas separadas em sacos diferentes. À fração de células nucleadas foi removida uma alíquota de 0,5mL para o controlo de qualidade antes de proceder à sua criopreservação. O volume final obtido no saco de criopreservação foi de, aproximadamente, 20mL.

3.3.2. AXP[®]

O saco de colheita foi acoplado ao kit de processamento (*Processing Bag Set*, Thermogenesis) e todo o sangue foi transferido para o saco de processamento do kit por força da gravidade, passando por um filtro de coágulos. Antes de se proceder à montagem do kit no dispositivo de processamento, foi removida uma alíquota de 0,5mL de sangue para a realização do controlo de qualidade. Após a programação do dispositivo no software *XpressTrak*, procedeu-se a uma centrifugação de dois ciclos a 10°C: o primeiro ciclo realizou-se a 1400xg durante 20 minutos, e o segundo ciclo a 80xg durante 10 minutos. No final do processamento obteve-se uma fração de células nucleadas enriquecida em células progenitoras e estaminais hematopoiéticas, uma fração de eritrócitos e uma fração de plasma, que permaneceu no saco de processamento. Foi removida uma alíquota de 0,5mL à fração de células nucleadas para o controlo de qualidade antes de proceder à sua criopreservação. O volume final obtido no saco de criopreservação foi de, aproximadamente, 20mL.

3.4. Criopreservação

Os produtos finais obtidos pelos dois métodos de redução de volume foram criopreservados num volume final de 25mL. Foi realizada a adição automática de 5mL de uma solução de 55% DMSO e 5% DEX40 (Origen Biomedical e Cryo Sore) durante 12 minutos de forma a obter uma concentração final de 10% DMSO. As amostras foram congeladas num equipamento de descida controlada da temperatura até as amostras atingissem cerca de 150°C negativos. Finalmente, as amostras foram armazenadas em contentores de azoto (State Bourne Cryogenics e Air Liquide), mantendo-se criopreservadas a uma temperatura de aproximadamente -196°C.

3.5. Controlo de Qualidade

Foram retiradas alíquotas das amostras de SCU antes e após o processamento para a realização de vários ensaios. A partir de alíquotas de plasma do SCU foram realizadas análises microbiológicas no sentido de avaliar a existência de contaminações e o despiste de agentes infecciosos foi efetuado a partir de uma amostra de sangue materno colhida na altura do parto.

3.5.1. Contagens Hematológicas

Foram realizadas contagens hematológicas antes e após o processamento das amostras de SCU para quantificar o número de TNC, que incluem todos os leucócitos e eritroblastos imaturos, o número MNC, que incluem os linfócitos, monócitos e células estaminais e progenitoras hematopoiéticas, e quantificar as várias subpopulações leucocitárias (linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos), as plaquetas, os eritrócitos e o hematócrito através da utilização do contador hematológico Sysmex XE-2100L.

3.5.2. Citometria de Fluxo

As células CD34⁺ foram quantificadas por citometria de fluxo após o processamento utilizando o citómetro de fluxo Beckman Coulter Cytomics FC500. Adicionou-se 10µL dos anticorpos monoclonais CD45-FITC (Beckman Coulter-A07782) e CD34-PE (Beckman Coulter-A07776), que permitem quantificar as TNC e as células

estaminais hematopoiéticas, respetivamente, e 10µL do marcador de viabilidade celular 7-AAD (Beckman Coulter-A07704). Após incubação no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 1mL de solução de lise celular (*Versalyse™ Lysing Solution*, Beckman Coulter) para lisar os eritrócitos presentes, incubando-se novamente a preparação no escuro durante 20 minutos. Após uma centrifugação a 150xg durante 5 minutos, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 300µL de PBS. Adicionaram-se 50µL de uma suspensão de microesferas fluorescentes de concentração conhecida que serviram como referência para a quantificação das células (*Flow-Count™ Fluorosphere Counting Beads*, Beckman Coulter).

Para a análise por citometria de fluxo foi utilizado o protocolo ISHAGE (100), que recorre a uma estratégia de *gating* e marcações específicas para a determinação dos parâmetros referidos.

3.5.3. Análise da Presença de Agentes Contaminantes

Várias análises foram feitas na fração do plasma do SCU e do plasma do sangue materno para pesquisar a presença de agentes infecciosos. Técnicas de serologia permitiram rastrear na amostra de sangue materno a presença de vírus como HBV, HCV, HIV-1 e HIV-2, CMV e sífilis através de ensaios analíticos com o método CMIA (Método de análise de Anticorpo/Antigénio por Imunoluminescência de partículas) com o equipamento ARCHITECT i2000sr. Os mesmos vírus foram pesquisados também por PCR em tempo real utilizando o termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA).

A presença de fungos e bactérias nas amostras foi avaliada pelo sistema *Bact/Alert 3D* (Biomérieux, França) através da inoculação de 5mL de plasma de cada amostra de SCU após o processamento num meio de cultura para o crescimento de microrganismos aeróbios e outros 5mL de plasma num meio de cultura para o crescimento de microrganismos anaeróbios.

3.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *Microsoft Office Excel 2013* (Microsoft, EUA) e do SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 23.0 para o Windows.

O estudo descritivo dos dados foi feito para as variáveis categóricas pelas frequências absolutas e relativas percentuais e para as variáveis contínuas pela média, desvio padrão, mediana e limites mínimo e máximo.

A normalidade das distribuições foi analisada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, tendo-se verificado que nenhuma assumia a normalidade. As diferenças entre os grupos das variáveis foram obtidas pelo teste de *Mann-Whitney* e pelo teste de *Kruskal-Wallis*. O teste Qui-quadrado foi utilizado para analisar diferenças entre as proporções de variáveis categóricas. A presença de correlações entre as variáveis foi avaliada pelos Coeficientes de Correlação de *Spearman*.

Para todos os testes foram consideradas diferenças estatisticamente significativas sempre que $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. Caracterização das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Foram analisadas 8430 amostras de SCU processadas e armazenadas na Criostaminal entre 2012 e 2015.

Na Tabela 1 encontram-se as características das amostras de SCU antes e após o seu processamento. Aquando da chegada ao laboratório, as amostras de SCU analisadas apresentaram volumes compreendidos entre 34,42mL e 195,03mL, em média 81,32 mL (SCU + 21mL CPD), das quais apenas 2,7% apresentaram coágulos visíveis. O número médio de TNC das amostras foi de $8,83 \times 10^8$, o número de MNC foi de $3,96 \times 10^8$ e o número de eritrócitos foi de $263,56 \times 10^9$. A média da concentração de TNC, MNC e eritrócitos foi de $0,11 \times 10^8/\text{mL}$ e $0,05 \times 10^8/\text{mL}$ e $3,15 \times 10^9/\text{mL}$, respetivamente. A média da razão MNC/TNC foi de 0,45, tendo variado entre 0,19 e 0,88. As amostras apresentaram um hematócrito médio de 34,73% (Tabela 1).

Após o processamento, as frações de células nucleadas obtidas apresentaram, em média, $6,95 \times 10^8$ TNC, $3,10 \times 10^8$ MNC, 2 364 789 células CD34⁺, $3,31 \times 10^9$ eritrócitos e um hematócrito de 37,94%. A média das razões MNC/TNC e CD34⁺/TNC foi de 0,44 e 0,32, respetivamente. A fração de eritrócitos foi reduzida em 68,9%, em média, e as recuperações de TNC e MNC médias foram de 82,50% e 80,68%, respetivamente. A viabilidade total das amostras foi avaliada através da viabilidade dos leucócitos, cuja média foi de 92,31%. A média da viabilidade das células CD34⁺ foi de 99,48% (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização das amostras de sangue do cordão umbilical antes e após o processamento.

Variáveis	n	%	Média ± SD	Mediana	Mínimo	Máximo
Antes do processamento						
Presença de coágulos						
Não	8202	97,3	NA	NA	NA	NA
Sim	228	2,7				
Volume (mL)			81,32 ± 24,24	78,54	34,42	195,03
TNC (x10 ⁸)			8,83 ± 4,77	7,90	0,95	45,19
[TNC] (x10 ⁸ /mL)			0,11 ± 0,37	0,10	0,02	0,44
MNC (x10 ⁸)			3,96 ± 2,33	3,41	0,35	35,89
[MNC] (x10 ⁸ /mL)	8430	100	0,05 ± 0,02	0,04	0,01	0,35
MNC/TNC			0,45 ± 0,08	0,44	0,19	0,88
Eritrócitos (x10 ⁹)			263,56 ± 107,45	249,96	44,41	799,42
[Eritrócitos] (x10 ⁹ /mL)			3,15 ± 0,50	3,17	1,12	5,51
Hematócrito (%)			34,73 ± 5,43	35,00	9,50	62,20
Após o processamento						
TNC (x10 ⁸)			6,95 ± 3,53	6,35	0,76	36,20
MNC (x10 ⁸)			3,10 ± 1,82	2,68	0,2	24,13
MNC/TNC			0,44 ± 0,10	0,43	0,10	1,43
Células CD34 ⁺			2 364 789 ± 2 295 867	1 678 875	117 689	28 552 264
CD43 ⁺ /TNC			0,32 ± 0,19	0,27	0,03	2,33
Eritrócitos (x10 ⁹)	8430	100	3,31 ± 0,83	62,20	1,15	30,30
Hematócrito (%)			37,94 ± 8,35	35,70	8,00	80,00
Redução Eritrócitos (%)			68,90 ± 17,76	73,66	0,00	95,84
Recuperação TNC (%)			82,50 ± 7,59	83,50	38,50	99,80
Recuperação MNC (%)			80,68 ± 7,79	81,57	17,11	99,89
Viabilidade CD34 ⁺ (%)			99,48 ± 0,71	99,70	85,30	100
Viabilidade Total (%)			92,31 ± 4,64	93,30	45,40	100

n – número de amostras; SD – Desvio Padrão; NA – Não Aplicável

4.2. Caracterização dos Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros

A caracterização dos fatores neonatais, obstétricos e outros das amostras analisadas encontra-se na Tabela 2. As amostras de SCU analisadas pertenciam a recém-nascidos com um peso médio de aproximadamente 3200g e que eram maioritariamente do sexo masculino (51,8%). A maioria dos nascimentos ocorreu por parto vaginal (54%) e a idade gestacional média do total de recém-nascidos foi de,

aproximadamente, 39 semanas. Do total das amostras, apenas 7,7% apresentavam bacteriologia positiva (Tabela 2).

O tempo compreendido entre a colheita e o processamento das amostras foi calculado com base na data e hora de parto do recém-nascido e na data e hora da chegada das amostras ao laboratório, tendo sido reorganizado em intervalos de 24 horas. Em média, as amostras demoraram cerca de 35 horas a chegar ao laboratório, sendo que a maioria demorou entre 24 horas e 48 horas (72,6%). A percentagem de amostras colhidas foi semelhante nas diferentes fases da lua (aproximadamente 25%) (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização dos fatores neonatais, obstétricos e outros.

Variável	n	%	Média ± SD	Mediana	Mínimo	Máximo
Sexo						
Feminino	4062	48,2	NA	NA	NA	NA
Masculino	4368	51,8				
Peso						
			3199,84 ± 440,20	3200	1160	5470
≤ 2500g	462	5,5				
2500g - 3000g	2156	25,6				
3000g - 3500g	3903	46,3				
> 3500g	1909	22,6				
Tipo de parto						
Vaginal	4556	54	NA	NA	NA	NA
Cesariana	3874	46				
Idade gestacional						
			38,61 ± 1,28	39	28	43
≤ 37 semanas	1179	14				
37 - 40 semanas	6906	81,9				
> 40 semanas	345	4,1				
Bacteriologia						
Positiva	645	7,7	NA	NA	NA	NA
Negativa	7785	92,3				
Tempo entre a colheita e o processamento						
			35,04 ± 10,55	36,27	2	93
≤ 24h	1763	20,9				
24h - 48h	6124	72,6				
48h - 72h	519	6,2				
>72h	24	0,3				
Fase da Lua						
Nova	2106	25,0				
Crescente	2115	25,1	NA	NA	NA	NA
Cheia	2114	25,1				
Minguante	2095	24,9				

n – número de amostras; SD – Desvio Padrão; NA – Não Aplicável

4.3. Correlação Entre os Parâmetros Laboratoriais das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Os valores de correlação entre os parâmetros laboratoriais foram bastante variáveis, tendo sido observadas correlações positivas e negativas entre eles.

O volume está positivamente correlacionado com o número de TNC ($r=0,795$, $p<0,001$) e MNC ($r=0,810$; $p<0,001$) antes do processamento, assim como com o número de células CD34⁺ ($r=0,591$; $p<0,01$) após o processamento. Da mesma forma, o número de células CD34⁺ apresentam uma correlação positiva com o número de TNC ($r=0,742$, $p<0,001$) e com o número de MNC ($r=0,741$; $p<0,001$).

A recuperação de TNC está negativamente correlacionada com o volume de SCU ($r=-0,265$; $p<0,001$). A redução dos eritrócitos apresenta uma correlação positiva forte com o volume ($r=0,894$; $p<0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3. Correlação de Spearman entre os parâmetros laboratoriais antes e após o processamento.

	Antes do processamento							Após o processamento										
	Volume (mL)	TNC (x10 ⁶)	[TNC] (x10 ⁹ /mL)	MNC (x10 ⁶)	[MNC] (x10 ⁹ /mL)	Eritrócitos (x10 ⁶)	[Eritrócitos] (x10 ⁹ /mL)	Hematócrito (%)	TNC (x10 ⁶)	MNC (x10 ⁶)	Células CD34 ⁺	Eritrócitos (x10 ⁶)	Hematócrito (%)	Redução Eritrócitos (%)	Recuperação TNC (%)	Recuperação MNC (%)	Viabilidade CD34 ⁺ (%)	Viabilidade Total (%)
Volume (mL)		.795 ^{***}	.365 ^{***}	.810 ^{***}	.424 ^{***}	.961 ^{***}	.657 ^{***}	.642 ^{***}	.769 ^{***}	.831 ^{***}	.591 ^{***}	-.391 ^{***}	-.404 ^{***}	.894 ^{***}	-.265 ^{***}	.215 ^{***}	.161 ^{***}	.229 ^{***}
TNC (x10 ⁶)			.839 ^{***}	.943 ^{***}	.768 ^{***}	.818 ^{***}	.671 ^{***}	.668 ^{***}	.978 ^{***}	.928 ^{***}	.742 ^{***}	-.396 ^{***}	-.392 ^{***}	.792 ^{***}	-.269 ^{***}	.064 ^{***}	.196 ^{***}	.172 ^{***}
[TNC] (x10 ⁹ /mL)				.740 ^{***}	.858 ^{***}	.431 ^{***}	.470 ^{***}	.480 ^{***}	.831 ^{***}	.699 ^{***}	.629 ^{***}	-.266 ^{***}	-.248 ^{***}	.447 ^{***}	-.175 ^{***}	-.086 ^{***}	.165 ^{***}	.076 ^{***}
MNC (x10 ⁶)					.860 ^{***}	.828 ^{***}	.668 ^{***}	.675 ^{***}	.918 ^{***}	.960 ^{***}	.741 ^{***}	-.393 ^{***}	-.383 ^{***}	.797 ^{***}	-.281 ^{***}	.055 ^{***}	.194 ^{***}	.212 ^{***}
[MNC] (x10 ⁹ /mL)						.482 ^{***}	.492 ^{***}	.514 ^{***}	.774 ^{***}	.813 ^{***}	.653 ^{***}	-.278 ^{***}	-.252 ^{***}	.489 ^{***}	-.205 ^{***}	-.102 ^{***}	.166 ^{***}	.139 ^{***}
Eritrócitos (x10 ⁶)							.832 ^{***}	.802 ^{***}	.787 ^{***}	.845 ^{***}	.610 ^{***}	-.385 ^{***}	-.410 ^{***}	.923 ^{***}	-.280 ^{***}	.204 ^{***}	.170 ^{***}	.208 ^{***}
[Eritrócitos] (x10 ⁹ /mL)								.945 ^{***}	.642 ^{***}	.673 ^{***}	.507 ^{***}	-.278 ^{***}	-.318 ^{***}	.761 ^{***}	-.235 ^{***}	.135 ^{***}	.149 ^{***}	.135 ^{***}
Hematócrito (%)									.643 ^{***}	.672 ^{***}	.497 ^{***}	-.336 ^{***}	-.314 ^{***}	.762 ^{***}	-.226 ^{***}	.097 ^{***}	.152 ^{***}	.127 ^{***}
TNC (x10 ⁶)										.919 ^{***}	.737 ^{***}	-.410 ^{***}	-.402 ^{***}	.776 ^{***}	-.120 ^{***}	.109 ^{***}	.197 ^{***}	.154 ^{***}
MNC (x10 ⁶)											.716 ^{***}	-.409 ^{***}	-.407 ^{***}	.817 ^{***}	-.223 ^{***}	.206 ^{***}	.192 ^{***}	.215 ^{***}
Células CD34 ⁺												-.359 ^{***}	-.362 ^{***}	.618 ^{***}	-.176 ^{***}	-.059 ^{***}	.218 ^{***}	.143 ^{***}
Eritrócitos (x10 ⁶)													.967 ^{***}	-.692 ^{***}	-.065 ^{***}	-.146 ^{***}	-.123 ^{***}	-.084 ^{***}
Hematócrito (%)														-.698 ^{***}	-.047 ^{***}	-.183 ^{***}	-.119 ^{***}	-.076 ^{***}
Redução Eritrócitos (%)															-.181 ^{***}	.226 ^{***}	.180 ^{***}	.202 ^{***}
Recuperação TNC (%)																.369 ^{***}	-.035 ^{***}	-.113 ^{***}
Recuperação MNC (%)																	.000	.054 ^{***}
Viabilidade CD34 ⁺ (%)																		.148 ^{***}
Viabilidade Total (%)																		

***p<0,001; □ r < 0; □ 0 ≤ r < 0,6; □ 0,6 < r ≤ 0,8; □ 0,8 < r ≤ 1

4.4. Análise de Fatores que Influenciam as Características das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Os resultados apresentados consistem numa análise de diferentes fatores neonatais (sexo, peso e idade gestacional do recém-nascido), obstétricos (tipo de parto) e outros (bacteriologia, tempo entre a colheita e o processamento e fase da lua na altura do parto) que podem influenciar as características das amostras de SCU. Foi avaliado também o impacto de fatores intrínsecos das amostras, como a presença de coágulos, o volume, o número de TNC, MNC e eritrócitos e o hematócrito.

Compararam-se amostras processadas por dois métodos de processamento, o Sepax® e o AXP®, no sentido de avaliar a eficiência do processamento dos mesmos.

Para todos os fatores considerados, os parâmetros laboratoriais analisados foram o volume, o número e concentração das populações de TNC e MNC e a concentração relativa de MNC em função do número de TNC (razão MNC/TNC) antes do processamento. Após o processamento, analisou-se o número de TNC, MNC e células CD34⁺, a concentração relativa de células CD34⁺ e de MNC em função do número de TNC (razões CD34⁺/TNC e MNC/TNC, respetivamente) e a viabilidade celular total e a viabilidade da população de células CD34⁺. Para os fatores intrínsecos e para a avaliação do método de processamento incluiu-se na análise a redução dos eritrócitos e as recuperações de TNC e de MNC.

4.4.1. Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros

No estudo dos fatores neonatais (peso, sexo e idade gestacional do recém-nascido), obstétricos (tipo de parto) e outros (bacteriologia, tempo entre a colheita e o processamento e a fase da lua na altura do parto), os resultados foram apresentados para o total de amostras analisadas, independentemente do tipo de processamento utilizado.

4.4.1.1. Sexo do Recém-Nascido

Os recém-nascidos do sexo masculino apresentaram um maior volume de SCU ($p < 0,01$), assim como maior número de MNC ($p < 0,05$) e maior razão MNC/TNC ($p < 0,001$) antes do processamento. Após o processamento, o número de MNC ($p < 0,05$) e de células CD34⁺ ($p < 0,001$) e as razões MNC/TNC ($p < 0,001$) e CD34⁺/TNC ($p < 0,001$), também foram mais elevados nas amostras de recém-nascidos do sexo masculino.

Contrariamente, as amostras de recém-nascidos do sexo feminino apresentaram maior número ($p < 0,05$) e concentração ($p < 0,001$) de TNC (Tabela 4).

Tabela 4. Influência do sexo do recém-nascido nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Feminino	Masculino	p
Antes do processamento			
Volume (mL)	80,53	82,06	<0,01
TNC ($\times 10^8$)	9,00	8,67	<0,05
[TNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,11	0,10	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	3,93	3,98	<0,05
[MNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,05	0,05	NS
MNC/TNC	0,44	0,46	<0,001
Após o processamento			
TNC ($\times 10^8$)	7,02	6,88	NS
MNC ($\times 10^8$)	3,08	3,12	<0,05
MNC/TNC	0,43	0,45	<0,001
Células CD34 ⁺	2 321 154	2 405 367	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,31	0,33	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,49	99,47	NS
Viabilidade TNC (%)	92,25	92,35	NS
<i>n</i>	4062	4368	
%	48,2	51,8	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.1.2. Peso do Recém-Nascido

O peso do recém-nascido, medido em gramas, foi agrupado em cinco categorias com variação de 500g entre si (<2500g até >4000g).

Foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre as categorias do peso dos recém-nascidos em todos os parâmetros laboratoriais considerados na análise ($p < 0,001$), verificando-se um aumento dos parâmetros laboratoriais ao longo das categorias de peso consideradas (Tabela 5).

Os recém-nascidos com peso superior a 4000g apresentaram a maioria dos parâmetros laboratoriais mais elevados relativamente às restantes categorias, com

exceção da razão MNC/TNC antes ($p < 0,001$) e após o processamento ($p < 0,001$) que foi superior nos recém-nascidos com menos de 2500g. (Tabela 5).

Tabela 5. Influência do peso do recém-nascido nos parâmetros laboratoriais.

Variável	≤ 2500g	2500 - 3000g	3000 - 3500g	3500 - 4000g	> 4000g	p
Antes do processamento						
Volume (mL)	66,81	75,81	81,79	89,02	96,48	<0,001
TNC ($\times 10^9$)	5,40	7,63	9,01	10,45	11,75	<0,001
[TNC] ($\times 10^9$ /mL)	0,08	0,10	0,11	0,11	0,12	<0,001
MNC ($\times 10^9$)	2,62	3,46	4,00	4,66	5,26	<0,001
[MNC] ($\times 10^9$ /mL)	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	<0,001
MNC/TNC	0,50	0,45	0,44	0,44	0,44	<0,001
Após o processamento						
TNC ($\times 10^9$)	4,31	6,07	7,11	8,12	8,88	<0,001
MNC ($\times 10^9$)	1,97	2,72	3,15	3,64	4,08	<0,001
MNC/TNC	0,46	0,44	0,44	0,44	0,45	<0,001
Células CD34 ⁺	1 296 368	1 900 223	2 419 293	2 964 177	3 459 701	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,30	0,30	0,32	0,34	0,37	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,35	99,43	99,49	99,54	99,59	<0,001
Viabilidade TNC (%)	91,34	92,03	92,26	92,89	93,25	<0,001
<i>n</i>	462	2156	3903	1630	279	
%	5,5	25,6	46,3	19,3	3,3	

n – número de amostras; **Negrito** – valores mais elevados

Em particular, verificou-se uma correlação positiva entre o peso do recém-nascido e o volume de SCU ($r=0,260$; $p < 0,001$; Figura 9).

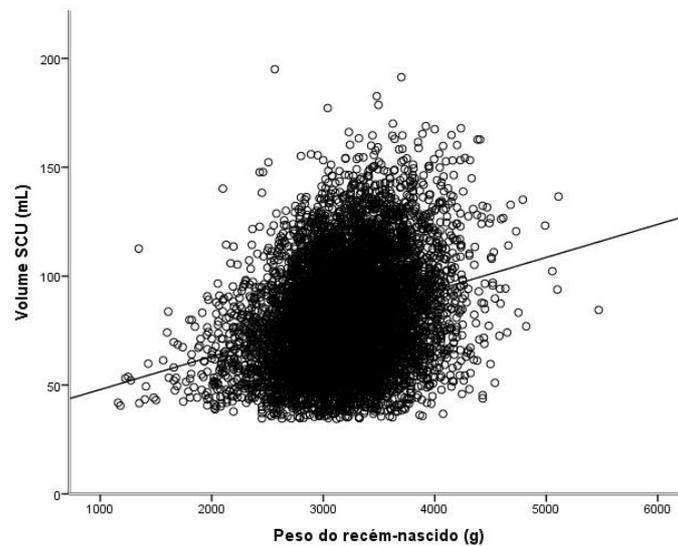


Figura 9. Correlação entre o peso do recém-nascido e volume de SCU ($r=0,260$; $p<0,001$).

Verificou-se também que o peso está associado ao sexo do recém-nascido ($p<0,001$) na medida em que a percentagem de recém-nascidos do sexo feminino é superior à dos recém-nascidos do sexo masculino quando o peso é inferior a 3000g. Para pesos superiores a 3000g, a percentagem de recém-nascidos do sexo masculino aumenta relativamente à dos recém-nascidos do sexo feminino, mostrando que recém-nascidos do sexo masculino estão normalmente associados a um maior peso, e vice-versa (Figura 10).

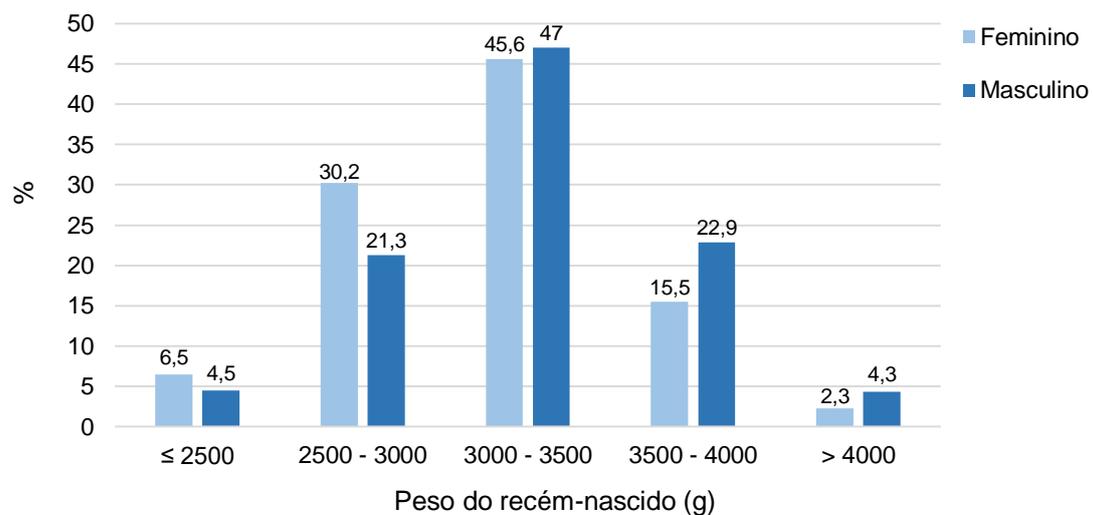


Figura 10. Distribuição do sexo em função do peso do recém-nascido ($p<0,001$).

4.4.1.3. Idade Gestacional

A idade gestacional foi medida em semanas e dividida em três categorias: idade gestacional inferior a 37 semanas (recém-nascidos prematuros), idade gestacional entre 37 e 40 semanas (recém-nascidos de termo), e idade gestacional superior a 40 semanas.

As amostras de recém-nascidos com idade gestacional entre 37 e 40 semanas apresentaram um volume maior relativamente às amostras das restantes categorias ($p < 0,001$). O número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes do processamento, bem como o número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento, foram superiores nas amostras de recém-nascidos com mais de 40 semanas de gestação. Contudo, a razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$) e as razões MNC/TNC ($p < 0,001$) antes e após o processamento apresentaram-se mais elevadas nas amostras de recém-nascidos prematuros (Tabela 6).

Tabela 6. Influência da idade gestacional nos parâmetros laboratoriais.

Variável	≤ 37 semanas	37 - 40 semanas	> 40 semanas	p
Antes do processamento				
Volume (mL)	77,43	81,99	81,32	<0,001
TNC (x10 ⁸)	6,79	9,10	10,36	<0,001
[TNC] (x10 ⁸ /mL)	0,08	0,11	0,12	<0,001
MNC (x10 ⁸)	3,33	4,03	4,51	<0,001
[MNC] (x10 ⁸ /mL)	0,04	0,05	0,05	<0,001
MNC/TNC	0,50	0,44	0,43	<0,001
Após o processamento				
TNC (x10 ⁸)	5,39	7,16	8,07	<0,001
MNC (x10 ⁸)	2,59	3,17	3,49	<0,001
MNC/TNC	0,48	0,44	0,42	<0,001
Células CD34 ⁺	2 076 539	2 411 370	2 417 416	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,36	0,31	0,28	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,43	99,49	99,46	<0,01
Viabilidade TNC (%)	92,02	92,36	92,15	<0,05
<i>n</i>	1179	6906	345	
%	14	81,9	4,1	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.1.4. Tipo de parto

O volume e a razão CD34⁺/TNC foram semelhantes nas amostras de recém-nascidos cujo parto foi vaginal e por cesariana. O número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes do processamento, assim como o número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento foi maior nas amostras de recém-nascidos provenientes de partos vaginais. Nos partos por cesariana, ambas as razões MNC/TNC ($p < 0,001$) foram superiores relativamente aos partos vaginais (Tabela 7).

Tabela 7. Influência do tipo de parto nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Vaginal	Cesariana	p
Antes do processamento			
Volume (mL)	81,32	81,33	NS
TNC ($\times 10^8$)	9,65	7,86	<0,001
[TNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,11	0,09	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	4,28	3,58	<0,001
[MNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,05	0,04	<0,001
MNC/TNC	0,44	0,46	<0,001
Após o processamento			
TNC ($\times 10^8$)	7,60	6,18	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	3,33	2,82	<0,001
MNC/TNC	0,43	0,46	<0,001
Células CD34 ⁺	2 599 676	2 088 550	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,32	0,32	NS
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,51	99,45	<0,01
Viabilidade TNC (%)	92,10	92,54	<0,001
<i>n</i>	4556	3874	
%	54	46	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.1.5. Bacteriologia

A concentração de TNC e MNC antes do processamento, a razão CD34⁺/TNC e a viabilidade das células CD34⁺ após o processamento foram semelhantes nas amostras que apresentavam bacteriologia positiva e negativa. O número de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes e após o processamento, o número de células CD34⁺ ($p < 0,01$), as razões MNC/TNC antes ($p < 0,01$) e após ($p < 0,001$) o processamento e a viabilidade total ($p < 0,001$) foram maiores nas amostras com bacteriologia negativa. (Tabela 8).

Tabela 8. Influência da bacteriologia nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Positiva	Negativa	p
Antes do processamento			
Volume (mL)	73,05	82,01	<0,001
TNC ($\times 10^8$)	8,02	8,89	<0,001
[TNC] ($\times 10^9$ /mL)	0,11	0,10	NS
MNC ($\times 10^8$)	3,54	3,99	<0,001
[MNC] ($\times 10^9$ /mL)	0,05	0,05	NS
MNC/TNC	0,44	0,45	<0,01
Após o processamento			
TNC ($\times 10^8$)	6,42	6,99	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	2,72	3,13	<0,001
MNC/TNC	0,42	0,44	<0,001
Células CD34 ⁺	2 189 304	2 379 328	<0,01
CD34 ⁺ /TNC	0,32	0,32	NS
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,45	99,48	NS
Viabilidade TNC (%)	91,63	92,36	<0,01
<i>n</i>	645	7785	
%	7,7	92,3	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

Como indicado anteriormente (Tabela 1), observou-se que 7,7% da totalidade das amostras de SCU apresentaram bacteriologia positiva. Destas, 87,9% são provenientes de recém-nascidos cujo nascimento foi por parto vaginal, sendo que apenas 12,1% provieram de partos por cesariana, evidenciando uma associação entre a bacteriologia das amostras e o tipo de parto ($p < 0,001$) (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição da bacteriologia em relação ao tipo de parto.

		Bacteriologia					Total
		Positiva		Negativa		Total	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%		
Tipo de parto	Vaginal	<i>n</i>	567	87,9	3989	51,2	4556
		%	12,4	87,6		100	
	Cesariana	<i>n</i>	78	12,1	3796	48,8	3874
		%	2	98		100	
Total			645	100	7785	100	8430

$p < 0,001$; *n* – número de amostras

4.4.1.6. Tempo Entre a Colheita e o Processamento

O tempo decorrido entre a colheita da amostra até ao seu processamento foi dividido em quatro categorias com diferença de 24 horas entre si ($\leq 24h$ até $> 72h$).

O volume ($p < 0,05$), o número de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes do processamento, bem como o número de TNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento foram maiores nas amostras que tinham entre 24h e 48h. Nas amostras com menos de 24h, a viabilidade celular total foi mais elevada ($p < 0,001$), assim como o número de MNC após o processamento ($p < 0,001$), as razões MNC/TNC antes ($p < 0,001$) e após ($p < 0,001$) o processamento e a razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$). Relativamente à viabilidade das células CD34⁺, não se verificaram diferenças entre os intervalos considerados (Tabela 10).

Tabela 10. Influência do tempo desde a colheita até ao processamento nos parâmetros laboratoriais.

Variável	<24h	24h - 48h	48h-72h	>72h	p
Antes do processamento					
Volume (mL)	81,19	81,62	78,66	72,53	<0,05
TNC ($\times 10^8$)	8,43	8,96	8,62	7,21	<0,001
[TNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,10	0,11	0,11	0,09	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	3,97	3,99	3,58	2,78	<0,001
[MNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,05	0,05	0,04	0,04	<0,001
MNC/TNC	0,48	0,44	0,41	0,38	<0,001
Após o processamento					
TNC ($\times 10^8$)	6,36	7,12	6,97	5,99	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	3,13	3,12	2,78	2,11	<0,001
MNC/TNC	0,49	0,43	0,39	0,36	<0,001
Células CD34 ⁺	2 231 092	2 430 696	2 075 582	1 622 786	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,33	0,32	0,28	0,24	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,48	99,48	99,45	99,47	NS
Viabilidade TNC (%)	94,92	91,91	88,51	83,77	<0,001
<i>n</i>	1763	6124	519	24	
%	20,9	72,6	6,2	0,3	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

Constatou-se também que a viabilidade celular total está negativamente correlacionada com o tempo entre a colheita e o processamento ($r=-0,448$, $p<0,001$; Figura 11).

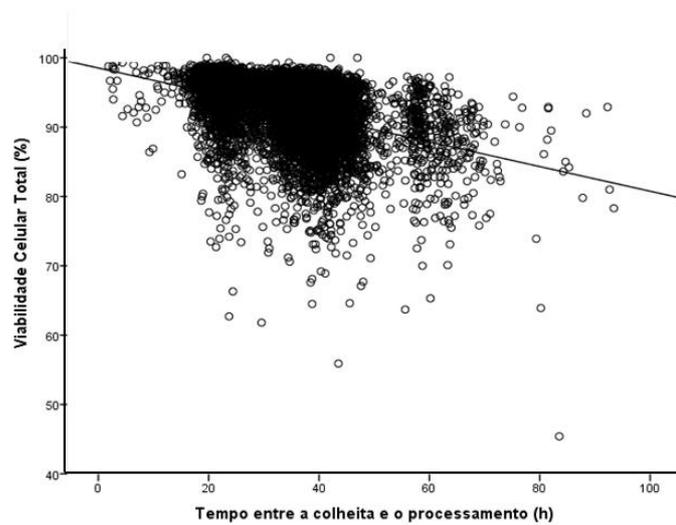


Figura 11. Correlação entre o tempo compreendido entre a colheita e o processamento e a viabilidade celular total ($r=-0,448$; $p<0,001$).

4.4.1.7. Fase da Lua

A fase da lua na altura do parto dos recém-nascidos influenciou o número ($p<0,05$) e concentração de MNC antes do processamento ($p<0,05$), o número de células CD34⁺ ($p<0,05$) e a razão CD34⁺/TNC ($p<0,05$) após o processamento. O número de células CD34⁺ foi mais elevado nas amostras de recém-nascidos cujo parto ocorreu na fase de lua nova ($p<0,05$) (Tabela 11).

Tabela 11. Influência da fase da lua nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Nova	Crescente	Cheia	Minguante	p
Antes do processamento					
Volume (mL)	81,18	82,01	80,74	81,36	NS
TNC ($\times 10^8$)	8,79	8,98	8,60	8,94	NS
[TNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,10	0,11	0,10	0,11	NS
MNC ($\times 10^8$)	3,95	4,04	3,83	4,01	<0,05
[MNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,05	0,05	0,05	0,05	<0,05
MNC/TNC	0,45	0,45	0,45	0,45	NS
Após o processamento					
TNC ($\times 10^8$)	6,93	7,05	6,76	7,03	NS
MNC ($\times 10^8$)	3,09	3,15	3,01	3,13	NS
MNC/TNC	0,44	0,44	0,44	0,44	NS
Células CD34 ⁺	2 408 049	2 391 843	2 264 425	2 395 262	<0,05
CD34 ⁺ /TNC	0,32	0,32	0,31	0,32	<0,05
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,48	99,47	99,47	99,50	NS
Viabilidade TNC (%)	92,45	92,46	92,23	92,08	NS
<i>n</i>	2106	2115	2114	2095	
%	25	25,1	25,1	24,9	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2. Fatores Intrínsecos das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Os fatores intrínsecos das amostras de SCU são todos aqueles que, aquando da chegada ao laboratório, não podem ser alterados, tais como a presença de coágulos, o volume, o número de TNC, MNC e eritrócitos e o hematócrito iniciais. Todos estes fatores podem sofrer grandes variações dependendo dos fatores neonatais, obstétricos e outros analisados anteriormente.

Tal como para os fatores obstétricos, neonatais e outros, os resultados da análise dos fatores inerentes às amostras de SCU foram apresentados para o total das amostras em estudo, independentemente do tipo de processamento utilizado.

4.4.2.1. Presença de Coágulos

A presença de coágulos nas amostras de SCU não influenciou o volume, as razões MNC/TNC, o número de células CD34⁺, a razão CD34⁺/TNC, a redução dos eritrócitos, as recuperações celulares nem as viabilidades celulares. O número ($p < 0,01$) e concentração ($p < 0,001$) de TNC e MNC antes do processamento foram superiores nas amostras sem coágulos, assim como o número de TNC ($p < 0,05$) e MNC ($p < 0,01$) após o processamento. (Tabela 12).

Tabela 12. Influência da presença de coágulos nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Sim	Não	p
Antes do processamento			
Volume (mL)	79,80	81,36	NS
TNC ($\times 10^8$)	7,90	8,85	<0,01
[TNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,10	0,11	<0,01
MNC ($\times 10^8$)	3,53	3,97	<0,01
[MNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,04	0,05	<0,01
MNC/TNC	0,45	0,45	NS
Após o processamento			
TNC ($\times 10^8$)	6,32	6,96	<0,05
MNC ($\times 10^8$)	2,73	3,11	<0,01
MNC/TNC	0,43	0,44	NS
Células CD34 ⁺	2 189 703	2 369 656	NS
CD34 ⁺ /TNC	0,34	0,32	NS
Redução Eritrócitos (%)	69,37	68,88	NS
Recuperação TNC (%)	83,56	82,47	NS
Recuperação MNC (%)	80,03	80,70	NS
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,45	99,48	NS
Viabilidade TNC (%)	92,66	92,30	NS
<i>n</i>	228	8202	
%	2,7	97,3	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2.2. Volume

O volume das amostras de SCU foi dividido em cinco categorias com diferença de 20mL entre si (≤ 60 mL até >120 mL).

As amostras com volume superior a 120mL apresentaram maior número e concentração de TNC e MNC e antes do processamento ($p < 0,001$), maior número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento, maior razão MNC/TNC antes ($p < 0,001$) e após ($p < 0,001$) o processamento, maior razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$) e maior viabilidade celular ($p < 0,001$), verificando-se um aumento destes parâmetros ao longo das categorias. A redução dos eritrócitos também foi mais eficiente nestas amostras ($p < 0,001$). A recuperação de TNC diminuiu ao longo das categorias, tendo sido superior nas amostras com menos de 60mL ($p < 0,001$). A recuperação de MNC foi superior nas amostras com volume entre 100mL e 120mL ($p < 0,001$) (Tabela 13).

Tabela 13. Influência do volume de SCU nos parâmetros laboratoriais.

Variável	≤ 60 mL	60 - 80mL	80 - 100mL	100 - 120mL	> 120 mL	p
Antes do processamento						
Volume (mL)	50,84	70,11	89,05	108,88	133,26	$< 0,001$
TNC ($\times 10^8$)	4,33	7,11	9,93	13,03	16,62	$< 0,001$
[TNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,08	0,10	0,11	0,12	0,12	$< 0,001$
MNC ($\times 10^8$)	1,89	3,09	4,43	6,00	7,78	$< 0,001$
[MNC] ($\times 10^8$ /mL)	0,04	0,04	0,05	0,06	0,06	$< 0,001$
MNC/TNC	0,44	0,44	0,45	0,46	0,47	$< 0,001$
Após o processamento						
TNC ($\times 10^8$)	3,52	5,80	7,97	9,95	11,89	$< 0,001$
MNC ($\times 10^8$)	1,42	2,38	3,51	4,80	6,08	$< 0,001$
MNC/TNC	0,41	0,42	0,45	0,49	0,52	$< 0,001$
Células CD34 ⁺	1 026 106	1 732 873	2 677 308	3 687 982	5 138 524	$< 0,001$
CD34 ⁺ /TNC	0,28	0,29	0,32	0,36	0,42	$< 0,001$
Redução Eritrócitos (%)	42,74	66,56	78,30	83,76	88,33	$< 0,001$
Recuperação TNC (%)	84,59	84,19	82,93	79,12	74,26	$< 0,001$
Recuperação MNC (%)	77,94	79,99	82,11	83,10	81,31	$< 0,001$
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,28	99,45	99,55	99,62	99,65	$< 0,001$
Viabilidade TNC (%)	89,96	92,52	93,03	93,21	93,44	$< 0,001$
<i>n</i>	1698	2689	2234	1202	607	
%	20,1	31,9	26,5	14,3	7,2	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2.3. Número de Células Nucleadas Totais

O número de TNC inicial das amostras de SCU foi dividido em quatro categorias com diferença de 4×10^8 células entre si: $\leq 4 \times 10^8$ células até $> 12 \times 10^8$ células. Tanto o volume ($p < 0,001$) como o número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes do processamento foram mais elevados nas amostras com mais de 12×10^8 TNC. Nestas amostras, o número de células CD34⁺ ($p < 0,001$), a razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$), a redução dos eritrócitos ($p < 0,001$) e a viabilidade das células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento também foram mais elevados. A razão MNC/TNC antes do processamento e a recuperação de TNC foram superiores nas amostras com menos de 4×10^8 células. A recuperação de MNC foi maior nas amostras com número de TNC entre 8 e 12×10^8 (Tabela 14).

Tabela 14. Influência do número de TNC do SCU nos parâmetros laboratoriais.

Variável	$\leq 4 (x10^8)$	4 - 8 ($x10^8$)	8 - 12 ($x10^8$)	$> 12 (x10^8)$	p
Antes do processamento					
Volume (mL)	51,39	70,57	88,98	108,37	<0,001
TNC ($x10^8$)	3,05	6,05	9,79	16,03	<0,001
[TNC] ($x10^8$ /mL)	0,06	0,09	0,11	0,15	<0,001
MNC ($x10^8$)	1,44	2,69	4,34	7,24	<0,001
[MNC] ($x10^8$ /mL)	0,03	0,04	0,05	0,07	<0,001
MNC/TNC	0,47	0,45	0,44	0,45	<0,001
Após o processamento					
TNC ($x10^8$)	2,51	4,96	7,81	12,05	<0,001
MNC ($x10^8$)	1,09	2,11	3,44	5,63	<0,001
MNC/TNC	0,44	0,43	0,44	0,47	<0,001
Células CD34 ⁺	681 727	1 415 455	2 517 153	4 889 159	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,27	0,28	0,32	0,40	<0,001
Redução Eritrócitos (%)	40,08	64,11	76,61	84,18	<0,001
Recuperação TNC (%)	84,93	84,24	82,35	78,07	<0,001
Recuperação MNC (%)	78,66	80,62	81,63	80,70	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,20	99,41	99,56	99,67	<0,001
Viabilidade TNC (%)	89,21	92,45	92,97	92,94	<0,001
n	1024	3288	2340	1778	
%	12,1	39	27,8	21,1	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2.4. Número de Células Mononucleadas

O número de MNC inicial das amostras de SCU foi dividido em quatro categorias com diferença de 2×10^8 células: $\leq 2 \times 10^8$ células até $> 6 \times 10^8$ células.

As amostras com mais de 6×10^8 células apresentaram maior volume ($p < 0,001$), maior número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) antes do processamento, assim como maior razão MNC/TNC ($p < 0,001$) relativamente às amostras das restantes categorias. Após o processamento, o número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$), a razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$) e a redução dos eritrócitos ($p < 0,001$) também foi superior nas amostras com mais de 6×10^8 células. A recuperação de TNC ($p < 0,001$) após o processamento foi mais elevada nas amostras com menos de 2×10^8 células, sendo que a recuperação de MNC foi maior nas amostras com número de MNC entre 4 e 6×10^8 ($p < 0,001$) (Tabela 15).

Tabela 15. Influência do número de MNC do SCU nos parâmetros laboratoriais.

Variável	$\leq 2 (x10^8)$	2 - 4 ($x10^8$)	4 - 6 ($x10^8$)	$> 6 (x10^8)$	p
Antes do processamento					
Volume (mL)	53,67	74,41	94,39	111,61	<0,001
TNC ($x10^8$)	3,65	6,94	10,89	16,75	<0,001
[TNC] ($x10^8$ /mL)	0,07	0,09	0,12	0,15	<0,001
MNC ($x10^8$)	1,50	2,95	4,88	8,12	<0,001
[MNC] ($x10^8$ /mL)	0,03	0,04	0,05	0,07	<0,001
MNC/TNC	0,43	0,44	0,46	0,49	<0,001
Após o processamento					
TNC ($x10^8$)	3,01	5,66	8,57	12,48	<0,001
MNC ($x10^8$)	1,16	2,32	3,88	6,26	<0,001
MNC/TNC	0,40	0,42	0,47	0,51	<0,001
Células CD34 ⁺	765348	1613859	2944153	5379958	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,26	0,29	0,35	0,43	<0,001
Redução Eritrócitos (%)	43,98	67,50	79,20	84,83	<0,001
Recuperação TNC (%)	85,06	83,95	81,28	77,42	<0,001
Recuperação MNC (%)	79,23	80,86	81,86	79,95	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,21	99,46	99,60	99,68	<0,001
Viabilidade TNC (%)	89,84	92,51	93,20	93,10	<0,001
n	1460	3655	2018	1297	
%	17,3	43,4	23,9	15,4	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2.5. Número de Eritrócitos

O número de glóbulos vermelhos das amostras de SCU foi dividida em três categorias com diferença de 100×10^9 células entre si: $\leq 200 \times 10^9$ até $> 300 \times 10^9$ células.

O volume ($p < 0,001$), o número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) e a razão MNC/TNC ($p < 0,001$) antes do processamento foram mais elevados nas amostras com mais de 300×10^9 células. Após o processamento o número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$), a razão CD34⁺/TNC ($p < 0,001$), a redução de eritrócitos ($p < 0,001$), a recuperação de MNC ($p < 0,001$) e as viabilidades celulares ($p < 0,001$) foram igualmente superiores nas amostras com mais de 300×10^9 células. A recuperação de TNC ($p < 0,001$) foi mais elevada nas amostras com menos de 200×10^9 células (Tabela 16).

Tabela 16. Influência do número de eritrócitos do SCU nos parâmetros laboratoriais.

Variável	$\leq 200 (x10^9)$	200 - 300 ($x10^9$)	$> 300 (x10^9)$	p
Antes do processamento				
Volume (mL)	56,06	78,33	107,98	<0,001
TNC ($x10^8$)	4,90	8,24	13,11	<0,001
[TNC] ($x10^8$ /mL)	0,09	0,11	0,12	<0,001
MNC ($x10^8$)	2,13	3,64	6,00	<0,001
[MNC] ($x10^8$ /mL)	0,04	0,05	0,06	<0,001
MNC/TNC	0,44	0,45	0,46	<0,001
Após o processamento				
TNC ($x10^8$)	4,01	6,70	9,94	<0,001
MNC ($x10^8$)	1,62	2,83	4,76	<0,001
MNC/TNC	0,41	0,43	0,49	<0,001
Células CD34 ⁺	1 141 985	2 075 343	3 811 085	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,28	0,30	0,37	<0,001
Redução Eritrócitos (%)	48,70	72,25	84,02	<0,001
Recuperação TNC (%)	84,57	83,98	78,98	<0,001
Recuperação MNC (%)	78,64	80,73	82,52	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,31	99,50	99,62	<0,001
Viabilidade TNC (%)	90,71	92,98	93,06	<0,001
n	2604	3020	2806	
%	30,9	35,8	33,3	

n – número de amostras; NS – Não significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.2.6. Hematócrito

O hematócrito consiste na percentagem de volume ocupada pelos eritrócitos no volume total de sangue de cada amostra.

Este parâmetro foi dividido em quatro categorias com diferenças de 5% entre si: <30% até >40%. Tal como nos fatores anteriores, também se verificaram diferenças significativas nos parâmetros laboratoriais entre as categorias de hematócrito consideradas. As amostras com hematócrito superior a 40% apresentaram maior número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$), bem como maior razão MNC/TNC ($p < 0,001$) antes do processamento. Apresentaram também maior número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$), maiores razões MNC/TNC ($p < 0,001$) e CD34⁺/TNC ($p < 0,001$), maior recuperação de MNC ($p < 0,001$) e viabilidade das células CD34⁺ mais elevada ($p < 0,001$) após o processamento, observando-se um aumento destes parâmetros com o aumento do hematócrito. A recuperação de TNC diminuiu com o aumento do hematócrito ($p < 0,001$) (Tabela 17).

Tabela 17. Influência do hematócrito do SCU nos parâmetros laboratoriais.

Variável	≤ 30 %	30 - 35 %	35 - 40 %	> 40 %	p
Antes do processamento					
Volume (mL)	57,66	75,88	89,96	102,40	<0,001
TNC (x10 ⁸)	4,66	7,47	10,35	13,35	<0,001
[TNC] (x10 ⁸ /mL)	0,08	0,10	0,11	0,13	<0,001
MNC (x10 ⁸)	2,03	3,29	4,64	6,18	<0,001
[MNC] (x10 ⁸ /mL)	0,03	0,04	0,05	0,06	<0,001
MNC/TNC	0,44	0,45	0,45	0,46	<0,01
Após o processamento					
TNC (x10 ⁸)	3,86	6,03	8,09	10,09	<0,001
MNC (x10 ⁸)	1,57	2,57	3,64	4,85	<0,001
MNC/TNC	0,41	0,43	0,45	0,48	<0,001
Células CD34 ⁺	1 089 114	1 842 262	2 816 588	4 008 845	<0,001
CD34 ⁺ /TNC	0,28	0,30	0,33	0,38	<0,001
Redução Eritrócitos (%)	45,53	66,28	77,18	84,48	<0,001
Recuperação TNC (%)	85,19	83,53	81,58	79,09	<0,001
Recuperação MNC (%)	79,39	80,41	81,16	81,74	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,30	99,45	99,54	99,63	<0,001
Viabilidade TNC (%)	90,24	92,80	92,97	92,33	<0,001
<i>n</i>	1576	2697	2864	1293	
%	18,7	32	34	15,3	

n – número de amostras; NS – Não significativo; **Negrito** – valores mais elevados

4.4.3. Métodos de Processamento das Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

A influência do método de processamento nas características finais das amostras de SCU foi avaliada pela comparação dos parâmetros laboratoriais, bem como das recuperações celulares e da redução dos eritrócitos, entre as amostras processadas com o Sepax[®] e com o AXP[®].

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre todos os parâmetros laboratoriais de amostras processadas com o Sepax[®] e com o AXP[®] ($p < 0,001$), com exceção da razão MNC/TNC obtida antes do processamento. As amostras processadas com o Sepax[®] apresentaram maior volume ($p < 0,001$), maior

número de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) e maior concentração de TNC ($p < 0,001$) antes do processamento, tal como maior número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e razão MNC/TNC ($p < 0,001$) após o processamento. Contudo, as amostras processadas com o AXP[®] apresentaram maior número de células CD34⁺ ($p < 0,001$) e maiores recuperações ($p < 0,001$) e viabilidade celular ($p < 0,001$), assim como maior redução dos eritrócitos ($p < 0,001$) após o processamento (Tabela 18).

Tabela 18. Influência do método de redução de volume nos parâmetros laboratoriais.

Variável	Sepax [®]	AXP [®]	p
Antes do processamento			
Volume (mL)	84,75	78,61	<0,001
TNC ($\times 10^8$)	9,31	8,44	<0,001
[TNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,11	0,10	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	4,17	3,79	<0,001
[MNC] ($\times 10^8/\text{mL}$)	0,05	0,05	<0,001
MNC/TNC	0,45	0,45	NS
Após o processamento			
TNC ($\times 10^8$)	7,03	6,88	<0,001
MNC ($\times 10^8$)	3,25	2,98	<0,001
MNC/TNC	0,46	0,43	<0,001
Células CD34 ⁺	2 264 651	2 443 992	<0,01
CD34 ⁺ /TNC	0,30	0,33	<0,001
Redução Eritrócitos (%)	66,43	70,85	<0,001
Recuperação TNC (%)	79,28	85,04	<0,001
Recuperação MNC (%)	79,56	81,56	<0,001
Viabilidade CD34 ⁺ (%)	99,47	99,49	<0,01
Viabilidade TNC (%)	92,13	92,44	<0,001
<i>n</i>	3723	4707	
%	44,2	55,8	

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

De forma a eliminar o volume como possível variável responsável pelas diferenças verificadas nos restantes parâmetros entre os dois métodos de processamento, dividiu-se esta variável em categorias. A Tabela 19 mostra os parâmetros laboratoriais das amostras de SCU antes e após o processamento com o Sepax® e com o AXP®, de acordo com várias categorias de volume.

O AXP® apresentou maior recuperação de TNC e maior redução dos eritrócitos comparativamente ao Sepax® em todas as categorias de volume. As recuperações de MNC com o AXP foram superiores nas amostras com menos de 100mL de volume, embora tenham sido semelhantes entre os dois métodos de processamento em amostras com volume superior a 100mL (Tabela 19).

Tabela 19. Diferenças dos parâmetros laboratoriais de amostras processadas com o Sepax® e com o AXP® de acordo com as categorias do volume de SCU inicial.

		< 60mL	60 - 80mL	80 - 100mL	100 - 120mL	> 120mL	p
Antes do processamento	Volume (mL)						
	Sepax®	51,02	70,57	89,11	108,97	134,09	<0,001
	AXP®	50,75	69,76	88,99	108,79	132,36	<0,001
	p	NS	<0,001	NS	NS	NS	
	TNC (x10⁹)						
	Sepax®	4,37	7,15	9,89	13,10	16,61	<0,001
	AXP®	4,31	7,07	9,98	12,95	16,63	<0,001
	p	NS	NS	NS	NS	NS	
	[TNC] (x10⁹/mL)						
	Sepax®	0,08	0,10	0,11	0,12	0,12	<0,001
	AXP®	0,08	0,10	0,11	0,12	0,13	<0,001
	p	NS	NS	NS	NS	NS	
MNC (x10⁹)							
Sepax®	1,89	3,12	4,41	5,98	7,69	<0,001	
AXP®	1,90	3,07	4,44	6,03	7,87	<0,001	
p	NS	NS	NS	NS	NS		
[MNC] (x10⁹/mL)							
Sepax®	0,04	0,04	0,05	0,05	0,06	<0,001	
AXP®	0,04	0,04	0,05	0,06	0,06	<0,001	
p	NS	NS	NS	NS	NS		
MNC/TNC							
Sepax®	0,44	0,44	0,45	0,46	0,47	<0,001	
AXP®	0,45	0,44	0,45	0,47	0,48	<0,001	
p	NS	NS	NS	NS	NS		
Após o processamento	TNC (x10⁹)						
	Sepax®	3,39	5,69	7,68	9,52	11,33	<0,001
	AXP®	3,59	5,88	8,24	10,40	12,49	<0,001
	p	<0,01	NS	<0,001	<0,001	<0,01	
	MNC (x10⁹)						
	Sepax®	1,34	2,35	3,48	4,79	6,05	<0,001
	AXP®	1,45	2,41	3,53	4,81	6,11	<0,001
	p	<0,001	NS	NS	NS	NS	
	MNC/TNC						
	Sepax®	0,40	0,42	0,46	0,51	0,55	<0,001
	AXP®	0,41	0,42	0,43	0,47	0,50	<0,001
	p	<0,05	NS	<0,001	<0,001	<0,001	
	Células CD34⁺						
	Sepax®	894 819	1 571 982	2 376 561	3 410 065	4 609 243	<0,001
	AXP®	1 089 514	1 855 864	2 956 257	3 978 189	5 713 277	<0,001
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
CD34⁺/TNC							
Sepax®	0,25	0,27	0,30	0,35	0,39	<0,001	
AXP®	0,30	0,31	0,35	0,38	0,45	<0,001	
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01		
Redução Eritrócitos (%)							
Sepax®	33,59	60,45	75,13	81,43	87,19	<0,001	
AXP®	47,16	71,24	81,24	86,19	89,57	<0,001	
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
Recuperação TNC (%)							
Sepax®	80,49	81,83	80,32	75,68	71,24	<0,001	
AXP®	86,57	85,99	85,34	82,71	77,54	<0,001	
p	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		
Recuperação MNC (%)							
Sepax®	73,51	77,81	81,71	83,40	81,88	<0,001	
AXP®	80,08	81,66	82,49	82,80	80,69	<0,001	
p	<0,001	<0,001	0,001	NS	NS		
Viabilidade CD34⁺ (%)							
Sepax®	99,19	99,42	99,53	99,62	99,64	<0,001	
AXP®	99,33	99,47	99,58	99,61	99,66	<0,001	
p	<0,001	<0,01	<0,05	NS	NS		
Viabilidade Total (%)							
Sepax®	89,82	92,43	92,57	92,55	92,78	<0,001	
AXP®	90,02	92,60	93,47	93,89	94,16	<0,001	
p	NS	NS	<0,001	<0,001	<0,001		
n (%)							
Sepax®	553 (14,9%)	1165 (31,3%)	1075 (28,9%)	614 (16,5%)	316 (8,5%)		
AXP®	1145 (24,3%)	1524 (32,4%)	1159 (24,6%)	588 (12,5%)	291 (6,2%)		

n – número de amostras; NS – Não Significativo; **Negrito** – valores mais elevados

5. Discussão

Nesta análise foi avaliada a influência de diferentes fatores nos parâmetros laboratoriais de amostras de SCU. Os parâmetros considerados na análise, tendo em conta o tipo de amostras estudadas, foram o volume, as populações de TNC MNC e células CD34⁺, a viabilidade das células CD34⁺ e a viabilidade celular total. Exclusivamente na análise dos fatores intrínsecos e do método de processamento, as recuperações de TNC e MNC e a redução dos eritrócitos também foram consideradas.

As populações celulares foram avaliadas em número absoluto de células, em concentração e em quantidade relativa, nomeadamente em relação à população de TNC no caso das células CD34⁺ (razão CD34⁺/TNC) e das MNC (razão MNC/TNC). Os números de TNC e MNC foram avaliados antes e após o processamento das amostras. A concentração de TNC e MNC foram avaliados apenas antes do processamento e o número de células CD34⁺ foi avaliado exclusivamente após o processamento. As concentrações de TNC, MNC e CD34⁺ após o processamento não foram consideradas na análise uma vez que o processamento das amostras de SCU permite a normalização do volume, concentrando a fração de células nucleadas do SCU num volume de aproximadamente 20mL, pelo que o volume final após o processamento pode ser considerado igual para todas as amostras. Desta forma, uma variação no número de células está obrigatoriamente associada a uma variação da concentração das mesmas.

5.1. Fatores Neonatais, Obstétricos e Outros

5.1.1. Sexo do Recém-Nascido

Na presente análise, o sexo do recém-nascido parece influenciar alguns dos parâmetros laboratoriais das amostras de SCU (Tabela 4). As amostras de recém-nascidos do sexo masculino apresentaram um volume de SCU superior ao das amostras de recém-nascidos do sexo feminino, bem como um maior número de células CD34⁺ após o processamento e, conseqüentemente, uma maior razão CD34⁺/TNC, tal como foi verificado por outros estudos^{98,99,100,101}.

Os recém-nascidos do sexo masculino apresentaram maior peso relativamente aos recém-nascidos do sexo feminino, tal como observado na Figura 10, a qual indica que os recém-nascidos com mais de 3000g eram maioritariamente do sexo masculino.

O aumento de peso dos recém-nascidos está associado a um aumento de volume de SCU (Figura 9) e, conseqüentemente, ao aumento do número de TNC, MNC e células CD34⁺ devido à correlação positiva entre o volume e estes parâmetros (Tabela 3). Assim, o aumento de peso verificado nos recém-nascidos masculinos poderá justificar o aumento de volume das amostras de recém-nascidos masculinos e, conseqüentemente, o aumento do número de células CD34⁺ e dos restantes parâmetros que se encontram mais elevados nestas amostras.

Contudo, as amostras de recém-nascidos do sexo feminino apresentaram um ligeiro aumento do número e concentração de TNC antes do processamento. Este aumento do número de TNC nas amostras de recém-nascidos do sexo feminino também foi observado por outros autores^{98,100,99}. Tendo em conta o coeficiente de correlação entre o volume e o número de TNC inicial, seria esperado haver um aumento do número de TNC com o aumento do volume. De facto, não há um acompanhamento do número de TNC com o volume de SCU, uma vez que houve um aumento de TNC quer em número quer em concentração nas amostras do sexo feminino, indicando que este aumento é independente do volume. Apesar deste resultado ser reportado por muitos autores, há estudos em que não se verifica qualquer relação entre o número de TNC e o sexo do recém-nascido^{102,101,103}, não existindo uma unanimidade em relação à influência deste fator.

Embora as amostras de recém-nascidos do sexo feminino tenham apresentado maior número de TNC, a razão MNC/TNC antes do processamento foi superior nas amostras de recém-nascidos do sexo masculino, pelo que estas são mais ricas em MNC e, conseqüentemente, mais ricas em células CD34⁺, como também se verificou pelo aumento do número destas células nas amostras de recém-nascidos do sexo masculino. Importa referir que as amostras de recém-nascidos do sexo masculino apresentaram, em média, um maior volume e que o aumento do número de células CD34⁺ pode estar relacionado com este facto.

5.1.2. Peso do Recém-Nascido

As amostras de recém-nascidos com peso mais elevado (mais de 4000g) apresentaram um volume maior, bem como um maior número e concentração de TNC e MNC antes do processamento e maior número de células CD34⁺ após o processamento (Tabela 5). Dada a correlação positiva entre o peso e o volume de SCU verificada ($r=0,260$, $p<0,001$; Figura 9), era esperado este aumento das populações celulares com o aumento do peso, visto que estas também estão correlacionadas com o volume (Tabela 3).

Existem vários estudos que mostram uma correlação positiva entre o peso do recém-nascido e o volume de SCU^{100,101,103,104,105}, o número de TNC^{100,101,105,106}, o número de MNC¹⁰⁷ e o número de células CD34^{+100,101,103,106,108}, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

5.1.3. Idade Gestacional

A idade gestacional mostrou ser um fator importante para as amostras de SCU. O número de TNC e MNC, bem como a concentração de TNC antes do processamento foi maior nas amostras de recém-nascidos com mais de 40 semanas de gestação (Tabela 6). Vários estudos também verificaram um aumento do número de células com o aumento da idade gestacional^{40,109,110}. Durante as 32 e 41 semanas de gestação ocorre um aumento do número de TNC, provavelmente devido ao maior desenvolvimento do feto¹¹¹, levando ao aumento desta população celular com o aumento do tempo de gestação e, também ao aumento das restantes populações (MNC e células CD34⁺).

Um aumento do volume com a idade gestacional também foi reportado por outros autores¹⁰⁴, embora na presente análise não se tenha verificado um maior volume nas amostras de recém-nascidos com mais de 40 semanas.

A razão CD34⁺/TNC apresentou-se mais elevada nas amostras de recém-nascidos com menos de 37 semanas de gestação, o que foi também reportado por outros autores^{100,103,106,109,112}. Durante a gravidez ocorrem alterações ao nível das células progenitoras na circulação do feto associadas ao tempo de gestação, sendo que estas apresentam um pico durante o segundo trimestre de gestação que vai decaindo com o progresso da gravidez. Desta forma, o SCU de recém-nascidos prematuros é relativamente mais rico em células estaminais e progenitoras hematopoiéticas^{109,110}. A mesma justificação pode explicar o aumento da razão MNC/TNC antes e depois do processamento nas amostras de recém-nascidos prematuros, visto que as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas se incluem na população de MNC.

5.1.4. Tipo de Parto

Embora o volume tenha sido semelhante entre amostras de recém-nascidos que nasceram por parto vaginal e por cesariana, o número e concentração de TNC ($p < 0,001$) e MNC ($p < 0,001$) iniciais e o número de TNC ($p < 0,001$), MNC ($p < 0,001$) e células CD34⁺ ($p < 0,001$) após o processamento foram mais elevados em amostras de recém-nascidos cujo parto foi vaginal (Tabela 7). Embora vários autores tenham verificado um aumento do volume^{109,113,107} do número de TNC e de células CD34^{+107,109} em partos por cesariana, outros estudos verificaram um aumento do número de TNC^{105,109,114,115}, MNC¹⁰⁷ e células CD34⁺¹¹⁵ nos partos vaginais, tal como se verificou no presente trabalho.

Esta diversidade de resultados relativamente ao impacto do tipo de parto nas características do SCU pode estar dependente de vários fatores associados ao parto, nomeadamente o tipo de colheita realizado, o atraso na clampagem do cordão umbilical e ainda o *stress* fetal associado ao parto.

Relativamente ao tipo de colheita, quando esta é realizada *in utero* verifica-se um aumento de volume e do número de TNC no SCU relativamente às colheitas *ex utero*^{116,117}.

A clampagem tardia do cordão umbilical também tem influência no volume de SCU colhido, sendo recolhido um menor volume quando há uma maior atraso na clampagem^{118,119}.

O *stress* neonatal associado ao parto vaginal pode também justificar as diferenças nos parâmetros laboratoriais, uma vez que induz a libertação de citocinas que vão mobilizar células estaminais e progenitoras para a circulação sanguínea do feto, resultando num maior número destas células após o nascimento¹²⁰.

Foi sugerido que o processo de leucocitose pode ocorrer em resposta ao *stress* neonatal associado aos partos vaginais, levando a um aumento dos níveis de várias subpopulações de leucócitos, nomeadamente neutrófilos, linfócitos T e monócitos¹¹³, tal como se verificou nesta análise.

No entanto, o *stress* fetal não pode justificar por si só o aumento observado nos parâmetros laboratoriais nos partos vaginais. Outros fatores como a duração prolongada do parto¹⁰⁴, a utilização de ventosas ou outros procedimentos que tenham o objetivo de forçar o parto podem induzir *stress* e promover um aumento de TNC nas amostras de SCU.

5.1.5. Bacteriologia

A contaminação microbiológica das amostras de SCU é um fator importante a ter em consideração. Diversas variáveis como o tipo de parto, o tipo de colheita¹¹⁷ e o método antisséptico utilizado durante a colheita podem estar na origem da contaminação microbiológica das amostras de SCU¹²¹.

Neste trabalho verificou-se que a taxa de contaminação microbiológica nas amostras de SCU ronda os 7,7% (Tabela 2). Destas, 87,9% pertenciam a recém-nascidos que nasceram por parto vaginal, sendo que apenas 12,1% das amostras com bacteriologia positiva foram provenientes de partos por cesariana (Tabela 9). O cordão umbilical, ao passar pelo canal vaginal entra em contacto com as bactérias aí presentes¹²². Para além disso, a proximidade anatómica ao reto pode levar à contaminação pela flora intestinal¹²². São vários os estudos que associaram os partos vaginais a uma maior taxa de contaminação do SCU relativamente aos partos por cesariana^{121,122,123}, tal como foi observado nesta análise. Em dois trabalhos anteriormente desenvolvidos pela Crioestamina^{124,125}, concluiu-se que a grande maioria dos microrganismos presentes nas amostras de SCU tinham origem na flora intestinal, vaginal e da pele.

A presença de contaminação microbiológica nas amostras de SCU está associada a uma diminuição do número de TNC, MNC e células CD34⁺ e das razões MNC/TNC antes e/ou após o processamento (Tabela 8), o que está de acordo com alguns estudos já publicados. No estudo de Solves *et al*⁶⁹ observou-se uma diminuição do número de células CD34⁺ em amostras com bacteriologia positiva. Visto existir uma diferença estatisticamente significativa entre o volume das amostras com bacteriologia positiva e negativa, não pode concluir-se que a diminuição do número de células CD34⁺ nas amostras contaminadas tenha sido devido à presença de agentes contaminantes.

5.1.6. Tempo Entre a Colheita e o Processamento

Na análise do tempo decorrido entre a colheita e o processamento, observa-se uma diminuição do número de TNC, MNC e células CD34⁺ nas amostras com tempo superior a 48h (Tabela 10).

Este resultado está de acordo com um estudo publicado por Pereira-Cunha *et al*¹²⁶ no qual se verificou uma diminuição das MNC 96h após a colheita relativamente às primeiras 24h, nomeadamente de linfócitos B e monócitos. Esta diminuição das MNC deve-se à elevada taxa apoptótica dos linfócitos B do SCU, levando à sua morte ao

longo do tempo¹²⁶. Para além deste, outros estudos corroboram o decréscimo da população de MNC com o aumento do tempo desde a colheita até ao processamento¹²⁷.

A partir das 48h, o número de TNC diminui provavelmente devido à morte dos granulócitos maduros e de algumas subpopulações de MNC, como foi referido. Esta diminuição do número de TNC é acompanhada pela diminuição da razão MNC/TNC, indicando que há uma maior perda de MNC relativamente a outras subpopulações celulares de TNC.

Por outro lado, o número de células CD34⁺ é superior nas amostras com processadas entre 24h e 48h comparativamente às amostras com menos de 24h. São vários os estudos que reportaram um aumento do número de células CD34⁺ com o aumento do tempo desde a colheita até ao processamento^{126,127,128}. Este aumento pode ser explicado pela produção de fatores anti-apoptóticos pelas células CD34⁺ que em combinação com citocinas promovem a manutenção destas células através de interações autocrinas e parácrinas¹²⁷. Contudo, há estudos que mostram uma diminuição do número de células CD34⁺ ao longo do tempo^{100,129,130}, o que também foi verificado nesta análise 48h após a colheita.

A viabilidade total das amostras também foi afetada pelo tempo entre a colheita e o processamento, verificando-se uma diminuição da viabilidade celular com o aumento do tempo até ao processamento (Tabela 10). As diferentes populações de TNC do SCU apresentam diferentes suscetibilidades à morte celular por apoptose e necrose, sendo que os granulócitos maduros e algumas subpopulações de MNC são os mais suscetíveis. Contrariamente, as células CD34⁺ apresentam maiores níveis de expressão de alguns genes anti-apoptóticos relativamente às restantes MNC, pelo que se mantêm viáveis durante mais tempo^{131,132}. A maior estabilidade das células CD34⁺ é visível nos resultados obtidos, uma vez que não se verificaram diferenças na viabilidade das células CD34⁺ entre as categorias de tempo desde a colheita até ao processamento, tal como já reportado por outros estudos^{126,128,131,132,133}.

5.1.7. Fase da Lua

A hipótese de que a fase da lua na altura do parto poderia influenciar o número de células estaminais presentes no SCU surgiu na sequência de dois estudos que demonstram que o volume, o número de TNC e de células CD34⁺ do SCU são influenciados por variações temporais rítmicas ao longo do ano, mês e dia^{134,135}. Anteriormente, foi reportado que as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas nos adultos circulam da medula óssea para o sangue periférico consoante o ritmo circadiano, levando a variações circadianas da sua concentração no sangue¹³⁶. Os

ritmos circadianos regulam uma variedade de processos fisiológicos como a secreção de hormonas, a temperatura corporal e o ciclo do sono através de “relógios” moleculares internos¹³⁷. O “relógio” que regula estes processos está localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo e capta informações ambientais como a luz, a temperatura e as marés, alterando a expressão de um grupo de genes consoante as variações da informação recebida^{136,137}.

Já foram reportadas variações nos ritmos circadianos de ratos correlacionadas com a lua, assim como noutros animais¹³⁸. Desta forma, avaliou-se o possível impacto da fase da lua na altura do nascimento nos parâmetros laboratoriais das amostras de SCU. Surpreendentemente, observou-se um aumento do número de células CD34⁺ nas amostras colhidas em fase de lua nova, sendo este aumento independente do volume colhido (Tabela 11). Já o número e concentração de MNC foi superior nas amostras de SCU colhidas em fase de lua crescente. Embora sejam necessários outros estudos para analisar a influência da fase da lua nas amostras de SCU, o aumento do número de células CD34⁺ na fase de lua nova indica que, de facto, a fase da lua pode ter um impacto significativo nas características das amostras de SCU.

5.2. Fatores Intrínsecos às Amostras de Sangue do Cordão Umbilical

Os fatores intrínsecos das amostras de SCU são todos aqueles que, aquando da chegada ao laboratório, não são passíveis de ser alterados, tais como a presença de coágulos, o volume, o número de TNC, MNC e eritrócitos e o hematócrito. Estes fatores podem sofrer grandes variações dependendo dos fatores neonatais, obstétricos e outros analisados anteriormente. Não sendo possível, na maioria dos casos, haver um controlo sobre alguns dos fatores extrínsecos às amostras, como o tipo de parto, o tipo de colheita, o sexo e peso do recém-nascido, entre outros, existe uma grande variabilidade de amostras, o que pode ter impacto nas suas características após o processamento.

A presença de coágulos nas amostras de SCU é avaliada antes de se proceder ao seu processamento e verificou-se apenas em 2,7% das amostras (Tabela 1). Existem vários estudos que relacionam a presença de coágulos no SCU com o tipo de colheita realizado, sendo estes mais abundantes quando a colheita é realizada *ex utero* devido às hemorragias presentes na mãe e no feto pela expulsão da placenta^{39,139}.

Contudo, as amostras consideradas nesta análise foram todas recolhidas com a placenta *in utero*, o que pode explicar o baixo número de amostras com presença de coágulos. Os coágulos sanguíneos são constituídos por polímeros de fibrina e a sua presença no SCU pode promover a agregação de células, incluindo as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas. Como os coágulos são eliminados das amostras de SCU antes destas serem processadas, era expectável uma diminuição do número e concentração de TNC e MNC inicial das amostras com coágulos visíveis, tal como se verificou para o número de TNC e MNC (Tabela 12).

Mesmo na presença de uma solução anticoagulante no saco de colheita, o decréscimo da atividade de alguns inibidores da coagulação ao longo do tempo após a colheita pode contribuir para a formação de coágulos nas amostras de SCU, influenciando a perda de células estaminais e progenitoras hematopoiéticas¹⁴⁰. Apesar do número e concentração de TNC e MNC ter sido mais elevado nas amostras sem coágulos antes e após o processamento, o número de células CD34⁺ foi estatisticamente semelhante entre as amostras com e sem coágulos no presente estudo (Tabela 12).

O volume do SCU está intimamente correlacionado com o número de TNC, com o número de MNC e com o número de células CD34⁺ (Tabela 3), verificando-se um aumento destas populações celulares com o aumento de volume (Tabela 13). São vários os estudos que evidenciam uma correlação positiva entre o volume e o número de TNC^{74,100,103,132,141}, o número de MNC^{103,141} e o número de células CD34^{+103,108,141}.

O volume inicial tem bastante impacto na eficiência do processamento das amostras, nomeadamente ao nível das recuperações celulares e redução dos eritrócitos. Apesar do número de TNC após o processamento se manter mais elevado nas amostras com mais de 120mL, a recuperação de TNC foi mais baixa nestas amostras (mais elevada nas amostras com menos de 60mL) (Tabela 13).

Os métodos de redução de volume atualmente utilizados no processamento do SCU não permitem processar amostras tão grandes de forma eficaz, havendo uma maior perda de células e conseqüentemente, menores recuperações celulares. Neste sentido, é necessário otimizar o processo de redução de volume.

Uma forma de otimizar o processamento do SCU seria aumentar o volume final após o processamento para mais de 20mL, que é o valor padrão para a redução do volume de amostras de SCU. Contudo, o aumento do volume final tem a desvantagem de não permitir uma redução dos eritrócitos tão eficiente.

Outra forma de aumentar as recuperações celulares segundo o estudo de Papassavas *et al.*⁸¹ é a divisão de amostras com grandes volumes em duas

subunidades com volumes menores, o que já é feito nalguns bancos de criopreservação de SCU, incluindo a Crioestaminal.

A redução dos eritrócitos consequente do processamento das amostras de SCU também está associada ao volume. Pela análise da Tabela 13, constata-se que quanto maior é o volume de SCU, maior é a redução dos eritrócitos, como se verifica também pela correlação positiva entre estes dois parâmetros ($r=0,894$; $p<0,001$; Tabela 3). Num estudo de Pilar Solves *et al*¹⁴² também se verificou uma melhor redução dos eritrócitos em amostras com volumes superiores a 140mL e com mais de 14×10^8 TNC, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Estando o volume correlacionado positivamente com o número de TNC, MNC, eritrócitos e com o hematócrito, verifica-se também uma correlação negativa entre a recuperação de TNC e estas populações celulares (Tabela 3), traduzindo-se numa diminuição do valor da recuperação de TNC com o aumento do número de TNC, MNC, eritrócitos e hematócrito (Tabelas 14, 15, 16 e 17).

O volume também influenciou a viabilidade celular total das amostras de SCU, tendo-se verificado um aumento da viabilidade celular com o aumento de volume, tal como observado pela correlação positiva entre estes dois parâmetros ($r=0,229$; $p<0,001$; Tabela 3). A influência do volume na viabilidade celular pode dever-se à concentração final de anticoagulante no saco de colheita do SCU¹³³. O plasma do SCU contém citocinas e fatores de crescimento responsáveis por manter a viabilidade celular e ao entrar em contacto com o anticoagulante presente no saco de colheita estes fatores são diluídos. Como todos os sacos contêm um volume fixo de anticoagulante, a concentração dos fatores vai depender do volume de SCU colhido, sendo que para volumes inferiores há uma maior diluição do SCU e, conseqüentemente, uma menor exposição das células às citocinas e fatores de crescimento que inibem a apoptose^{133,143}.

O número de TNC inicial das amostras de SCU apresenta uma correlação positiva com o volume, como foi mencionado anteriormente. Desta forma, as amostras com maior número de TNC ($>12 \times 10^8$ TNC) apresentaram maior volume e, conseqüentemente, maior número de MNC e células CD34⁺ (Tabela14).

Uma correlação positiva entre o número de TNC e o número de células CD34⁺ foi também reportada por vários autores^{108,132,141,144}, bem como uma correlação entre o número de TNC e o número de MNC¹⁴¹. Tanto o aumento de volume como o aumento do número de TNC correspondem a um aumento da população de células CD34⁺. Contudo, o coeficiente de correlação entre o número de TNC e o número de células CD34⁺ ($r=0,742$, $p<0,001$, Tabela 3) é mais elevado do que o coeficiente de correlação

entre o volume e o número de células CD34⁺ ($r=0,591$, $p<0,001$; Tabela 3), indicando que o número de TNC poderá ser um melhor indicador do conteúdo em células CD34⁺ das amostras de SCU, tal como também já foi reportado por outros estudos^{108,145}.

O número de MNC apresenta uma correlação com o volume e com o número de TNC, como já referido. O número de MNC apresenta também uma correlação positiva com o número de células CD34⁺, observando-se um aumento do número de células CD34⁺ nas amostras com mais de 6×10^8 MNC (Tabela 15). Esta correlação foi também observada por outros autores^{107,141}, o que não é surpreendente uma vez que as células CD34⁺ são uma subpopulação de MNC.

Relativamente ao número de eritrócitos e ao hematócrito, não existem estudos que reportem a influência destes fatores no conteúdo de TNC, MNC ou células CD34⁺ do SCU após o processamento. Sendo o hematócrito a percentagem do volume de sangue ocupada pelos eritrócitos, é natural que estes dois fatores estejam fortemente correlacionados entre si ($r=0,945$, $p<0,001$; Tabela 3). Do mesmo modo, existe uma forte correlação destes fatores com o volume, indicando que o aumento dos eritrócitos e do hematócrito pelas respetivas categorias está associado ao aumento de volume correspondente (Tabela 16 e 17).

Resumindo, o volume de SCU colhido é o principal fator que influencia as características das amostras, quer em relação ao número de células das populações celulares (TNC, MNC, células CD34⁺) quer em relação às recuperações celulares e redução dos eritrócitos.

5.3. Métodos de Processamento de Sangue do Cordão Umbilical

O objetivo do processamento do SCU é preparar as amostras para serem criopreservadas, mantendo a quantidade e funcionalidade das células de interesse sem risco de contaminação. Para isso, é essencial otimizar as várias etapas do processamento das amostras de SCU, principalmente a fase de redução de volume que tem um papel determinante no conteúdo celular final. Vários métodos de redução de volume têm sido implementados nos bancos de armazenamento de SCU, existindo vários estudos que comparam diferentes métodos até hoje utilizados. Nesta análise, comparou-se a eficiência do processamento com dois métodos automáticos utilizados no laboratório da Crioestaminal, o Sepax[®] e o AXP[®].

As amostras processadas com o Sepax[®] apresentaram, em média, um volume inicial superior às amostras que foram processadas pelo AXP[®]. Consequentemente, devido às correlações positivas entre o volume e o número e concentração de TNC e MNC antes do processamento, os valores destes parâmetros também foram mais elevados nas amostras processadas com o Sepax[®] (Tabela 18).

Após o processamento, as amostras processadas com o Sepax[®] apresentaram maior número de TNC e MNC relativamente às amostras processadas com o AXP[®] dada a correlação positiva entre os valores do número de TNC ($r=0,831$, $p<0,001$; Tabela 3) e MNC ($r=0,813$, $p<0,001$; Tabela 3) antes e após o processamento, ou seja, um aumento do número de TNC e MNC antes do processamento é acompanhado por um aumento destes parâmetros após o processamento. Contudo, o número de células CD34⁺ foi mais elevado nas amostras processadas com o AXP[®], ainda que a média do volume das amostras processadas com este sistema tenha sido inferior. As recuperações celulares foram igualmente superiores nas amostras processadas pelo AXP[®], assim como a redução dos eritrócitos (Tabela 18).

No sentido de controlar a influência do volume nas diferenças verificadas nos parâmetros laboratoriais antes do processamento entre os dois métodos, o volume foi dividido em categorias. Pela análise da Tabela 19 conclui-se que o aumento das recuperações celulares e redução dos eritrócitos nas amostras processadas com o AXP em relação às amostras processadas com o Sepax[®] foi independente do volume inicial, com exceção das amostras com volume entre 60 e 80mL. Contudo, o volume inicial influenciou as recuperações celulares em ambos os métodos de processamento, observando-se uma diminuição da recuperação de TNC mais acentuada a partir das amostras com mais de 80mL (Tabela 19).

As recuperações de TNC obtidas com o Sepax[®] e com o AXP[®] em vários estudos apresentam uma grande variabilidade que pode estar associada ao protocolo utilizado e às diferenças de volumes das amostras de SCU de cada estudo. A recuperação de TNC média obtida com o Sepax[®] neste trabalho foi de 79,28%. Este valor é semelhante à recuperação de TNC de amostras processadas com o Sepax[®] observada no estudo de Zingsem *et al*⁷⁸, em que também não foi adicionado HES às amostras de SCU. Outros estudos reportaram recuperações de TNC médias entre 80-87%³⁷, 90,0%¹⁴⁶ e 88%⁵² para amostras de SCU processadas com o Sepax[®], que são superiores ao valor médio obtido neste trabalho. Este facto pode ser justificado pela utilização do protocolo com adição de HES na maioria dos estudos, o que melhora a sedimentação celular e, consequentemente, as recuperações celulares obtidas.

No que diz respeito ao AXP[®], a média da recuperação de TNC obtida (85,04%) foi semelhante à recuperação de TNC observada noutros estudos: 88,4%¹⁴⁷, 84,8%⁵² e

entre 76-82%³⁷. Segundo o estudo de Pilar Solves *et al*⁶⁵, a recuperação de TNC com o AXP[®] é semelhante à do método de sedimentação com HES e ligeiramente maior relativamente ao método T&B quando o volume final programado é semelhante para os dois métodos.

Apesar do AXP[®] ter apresentado uma maior recuperação média de TNC em relação ao Sepax[®] na maioria das categorias de volume consideradas neste trabalho, no estudo comparativo dos sistemas Sepax[®] e AXP[®] de Pilar Solves *et al*¹⁴² verificou-se uma diminuição desta recuperação nas amostras processadas com o AXP[®]. A perda de grande parte dos granulócitos e neutrófilos durante o processamento é a principal causa da diminuição da recuperação de TNC com o AXP[®]. Como estas células são maduras, não é esperado que a sua perda diminua o potencial hematopoiético das amostras de SCU^{37,86,142} dado que o AXP[®] consegue recuperar uma grande percentagem de MNC, onde estão incluídas as células estaminais e progenitoras hematopoiéticas.

Segundo uma meta-análise do Sepax[®] e do AXP[®] realizada pela CESCOTM Therapeutics⁸⁶, as amostras de SCU processadas com o AXP[®] apresentaram, em média, uma recuperação de MNC de 94,5%, enquanto a recuperação de MNC das amostras processadas pelo Sepax[®] foi de 86,7%. Apesar da recuperação de MNC no presente trabalho ter sido superior nas amostras processadas com o AXP[®] para volumes até 100mL e ter sido semelhante entre os dois métodos de processamento em amostras com volume superior, os valores médios das recuperações de MNC observados foram inferiores aos valores previamente reportados^{37,86,147,148}.

A redução dos eritrócitos é um dos principais objetivos dos métodos de redução de volume. Embora a redução dos eritrócitos apresente uma correlação positiva com o volume de SCU ($r=0,894$, $p<0,001$; Tabela 3) e as amostras processadas com o Sepax[®] tenham apresentado um volume médio superior às amostras processadas pelo AXP[®], a redução dos eritrócitos foi mais eficiente nas amostras processadas com o AXP[®] (Tabelas 18 e 19). No estudo de Pilar Solves *et al*⁶⁵, o AXP[®] reduziu os eritrócitos mais eficientemente do que o método T&B, embora a percentagem de eritrócitos eliminada tenha sido semelhante à percentagem eliminada com o método de sedimentação com HES. No estudo de Takanashi *et al*¹⁴⁷ a redução dos eritrócitos obtida pelo AXP[®] foi inferior ao método HES. Comparando o Sepax[®] com o AXP[®], vários estudos reportaram uma redução dos eritrócitos mais eficiente com o AXP[®] do que com o Sepax[®]^{86,142}, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Enquanto que a recuperação de TNC diminui com o aumento do volume, a redução dos eritrócitos aumenta com o aumento de volume, pelo que a recuperação de TNC e a redução dos eritrócitos estão correlacionados negativamente ($r=-0,181$,

$p < 0,001$; Tabela 3). Uma hipótese que pode explicar a influência do volume na recuperação de TNC e na redução dos eritrócitos baseia-se no facto de uma fração de TNC ser arrastada com os eritrócitos durante o processamento¹⁴⁹. Como as amostras de SCU com maior volume apresentam um maior número de células, a camada destas células que fica acima da fração de eritrócitos após a centrifugação vai ser maior e a quantidade de células que vão ser arrastadas com os eritrócitos durante a centrifugação também vai aumentar. Dado que uma maior quantidade de eritrócitos vai ser removida, também vai ser eliminado um maior número de células, traduzindo-se numa diminuição da recuperação de TNC.

Deste modo, as diferenças observadas entre os métodos Sepax® e AXP® podem estar associadas à dinâmica do processamento que difere entre os dois métodos. No AXP®, os eritrócitos estão sedimentados no fundo do saco e são os primeiros a ser eliminados. Quando o sensor ótico deteta o início da fração de células nucleadas, inicia-se a recolha destas células que são transferidas juntamente com algum plasma de modo a fazer o volume final programado. No Sepax®, o plasma é o primeiro componente a ser descartado, sendo o volume final atingido pela adição da fração de eritrócitos, o que pode justificar a menor redução dos eritrócitos com este método.

6. Conclusão

Ao longo deste trabalho foram estudados vários fatores neonatais e obstétricos, bem como fatores intrínsecos às amostras de SCU e outros fatores, como o tempo decorrido entre a colheita e o processamento, a bacteriologia e a fase da lua na altura do nascimento, que parecem influenciar o número de células nucleadas presentes no SCU. Embora fatores como o sexo, o peso, a idade gestacional e o tipo de parto não possam ser controlados de forma a melhorar as características do SCU, o tempo entre a colheita e o processamento e a presença de contaminação microbiológica, nomeadamente o método de desinfecção utilizado, são fatores que podem ser otimizados.

As amostras provenientes de recém-nascidos do sexo masculino, com maior peso, bem como com maior idade gestacional e cujo nascimento ocorreu por parto vaginal apresentaram, na generalidade, um aumento dos parâmetros laboratoriais analisados. Observou-se também que as amostras colhidas na fase de lua nova apresentaram um maior conteúdo em células CD34⁺.

O volume de SCU colhido é o principal fator que influencia as características das amostras, quer em relação ao número de células das populações celulares (TNC, MNC, células CD34⁺) quer em relação às recuperações celulares e redução dos eritrócitos. Desta forma, deverá ser reforçada a sensibilização dos profissionais de saúde para efetuar colheitas com maior volume de SCU possível.

Para além destes fatores, o método de processamento utilizado tem também influência nas características finais das amostras. Diferentes métodos de processamento apresentam algumas variações ao nível das recuperações celulares e redução dos eritrócitos. Apesar de haver influência de fatores como o volume, o número de TNC, MNC, eritrócitos e do hematócrito nas características das amostras após o seu processamento, o método AXP[®] mostrou ser mais eficaz tanto nas recuperações celulares como na redução dos eritrócitos relativamente ao método Sepax[®].

7. Referências Bibliográficas

1. Girlovanu, M. *et al.* Stem Cells - biological update and cell therapy progress. *Clujul Med.* **88**, 265 (2015).
2. Weiss, M. L. & Troyer, D. L. Stem Cells in the Umbilical Cord. *Stem Cell Rev* **2**, 155–162 (2006).
3. Blau, H. M., Brazelton, T. R. & Weimann, J. M. The Evolving Concept of a Stem Cell : Entity or Function? **105**, 829–841 (2001).
4. Fischbach, G. D. & Fischbach, R. L. Science and society Stem cells : science , policy , and ethics. **114**, (2004).
5. Wobus, A. M. & Boheler, K. R. Embryonic Stem Cells : Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. 635–678 (2005). doi:10.1152/physrev.00054.2003.
6. Fortier, L. Stem Cells : Classifications , Controversies , and Clinical Applications. 415–423 (2005). doi:10.1111/j.1532-950X.2005.00063.x
7. Ven, C. Van De, Collins, D., Bradley, M. B., Morris, E. & Cairo, M. S. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. **35**, 1753–1765 (2007).
8. Martin-Rendon, E. & Watt, S. M. Exploitation of stem cell plasticity. 325–349 (2003).
9. Mihiu, C. M. *et al.* Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **49**, 441–446 (2008).
10. Main, H., Munsie, M. & Connor, M. D. O. Managing the potential and pitfalls during clinical translation of emerging stem cell therapies. **3**, 1–10 (2014).
11. Daley, G. Q. Perspective The Promise and Perils of Stem Cell Therapeutics. *STEM* **10**, 740–749 (2012).
12. Wognum, A. W. & Szilvassy, S. J. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cell Technol. (not a Journal)* 1–10 (2015). doi:10.1007/0-306-46886-7_1
13. Gunsilius, E., Gastl, G. & Petzer, A. L. Hematopoietic stem cells. 186–194 (2001).
14. Szilvassy, S. J. The Biology of Hematopoietic Stem Cells. **34**, 446–460 (2004).
15. Reimann, V., Creutzig, U. & Kögler, G. Stem cells derived from cord blood in transplantation and regenerative medicine. *Dtsch. Arztebl. Int.* **106**, 831–6 (2009).
16. Slavin, S. *et al.* Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* **91**, 756–63 (1998).
17. Resnick, I. B., Shapira, M. Y. & Slavin, S. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy for malignant and non-malignant diseases. *Transpl. Immunol.* **14**, 207–219 (2005).
18. Barriga, F., Ramírez, P., Wietstruck, A. & Rojas, N. Hematopoietic stem cell transplantation: Clinical use and perspectives. *Biol. Res.* **45**, 307–316 (2012).

19. Khawaja, T. *et al.* Approaches for the prevention of graft-versus-host disease following hematopoietic cell transplantation. **22**, 325–333 (2015).
20. Knudtzon, S. In Vitro Growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* **43**, 357–361 (1974).
21. Ballen, K. K., Gluckman, E. & Broxmeyer, H. E. Umbilical cord blood transplantation : the fi rst 25 years and beyond. *Blood* **122**, 491–499 (2014).
22. Gluckman, E. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *Cell. Ther. Transplant.* **2**, 8–13 (1989).
23. Gluckman, E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **44**, 621–626 (2009).
24. Kurtzberg, J. *et al.* Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* **335**, 157–166 (1996).
25. Gluckman, E. *et al.* Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* **337**, 373–81 (1997).
26. Eapen, M. *et al.* Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia : a comparison study. 1947–1954 (1947).
27. Ying, W. *et al.* A Meta-Analysis of Unrelated Donor Umbilical Cord Blood Transplantation versus Unrelated Donor Bone Marrow Transplantation in Adult and Pediatric Patients. **453**, 444–453 (2007).
28. Tse, W. Umbilical Cord Blood Transplantation: A New Alternative Option. *Hematology* **2005**, 377–383 (2005).
29. Kakinuma, S. Human Umbilical Cord Blood as a Source of Transplantable Hepatic Progenitor Cells. 217–227 (2003).
30. Gluckman, E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.* **28**, 1197–1205 (2000).
31. Gluckman, E. Ten years of cord blood transplantation: From bench to bedside. *Br. J. Haematol.* **147**, 192–199 (2009).
32. O'Connor, M. a C., Samuel, G., Jordens, C. F. C. & Kerridge, I. H. Umbilical cord blood banking: beyond the public-private divide. *J. Law Med.* **19**, 512–6 (2012).
33. Petrini, C. Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *J. Blood Med.* **5**, 87–97 (2014).
34. Armson, A. B., Allan, D. S. & Casper, R. F. Umbilical Cord Blood: Counselling, Collection, and Banking. **2015**, 832–844 (2015).
35. Parmesar, K. & Raj, K. Haploidentical Stem Cell Transplantation in Adult Haematological Malignancies. *Adv. Hematol.* **2016**, 1–16 (2016).
36. Armitage, S. Cord Blood Banking Standards: Autologous Versus Altruistic. *Front. Med.* **2**, 1–5 (2016).
37. Rubinstein, P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **44**, 635–642 (2009).
38. Skoric, D., Balint, B., Petakov, M., Sindjic, M. & Rodic, P. Collection strategies and

- cryopreservation of umbilical cord blood. *Transfus. Med.* **17**, 107–113 (2007).
39. Solves, P. *et al.* Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 269–273 (2003).
 40. Keersmaekers, C. L., Mason, B. A., Keersmaekers, J., Ponzini, M. & Mlynarek, R. A. Factors affecting umbilical cord blood stem cell suitability for transplantation in an in utero collection program. *Transfusion* **54**, 545–549 (2014).
 41. Kletzel, M. *et al.* Red cell depletion of umbilical cord blood (UCB): comparison between unmanipulated and red cell-depleted UCB by Ficoll-Paque density gradient separation. **6**, 269–272 (1997).
 42. Rubinstein, P. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* **339**, 1565–1577 (1998).
 43. Young, W. Plasma-depleted versus red cell-reduced umbilical cord blood. *Cell Transplant.* **23**, 407–15 (2014).
 44. Shu, Z., Heimfeld, S. & Gao, D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* **49**, 469–76 (2014).
 45. Takahashi, T. *et al.* Multi-laboratory evaluation of procedures for reducing the volume of cord blood: influence on cell recoveries. (2008). doi:10.1080/14653240600735677
 46. Regidor, C. *et al.* Umbilical cord blood banking for unrelated transplantation. *Exp. Hematol.* **27**, 380–385 (1999).
 47. Almici, C. *et al.* Density separation of umbilical cord blood and recovery of hemopoietic progenitor cells: implications for cord blood banking. *Stem Cells* **13**, 533–540 (1995).
 48. Sumpelmann, R., Günther, A. & Zander, R. Haemoconcentration by gelatin-induced acceleration of erythrocyte sedimentation rate. *Anaesthesia* **55**, 217–220 (2000).
 49. Tsang, K. S. *et al.* Dextran sedimentation in a semi-closed system for the clinical banking of umbilical cord blood. **41**, 344–352 (2001).
 50. Rubinstein, P. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10119–22 (1995).
 51. Perutelli, P., Catellani, S., Scarso, L., Cornaglia-Ferraris, P. & Dini, G. Processing of human cord blood by three different procedures for red blood cell depletion and mononuclear cell recovery. *Vox Sang.* **76**, 237–40 (1999).
 52. Armitage, S. Cord Blood Processing: Volume Reduction. *Cell Preserv. Technol.* **4**, 9–16 (2006).
 53. Hurtado, C. *et al.* Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a Top & Bottom system (Optipress ©II). 390–395 (2000).
 54. Solves, P. *et al.* Red blood cell depletion with a semiautomated system or hydroxyethyl starch sedimentation for routine cord blood banking: A comparative study. *Transfusion* **45**, 867–873 (2005).
 55. Sato, N. *et al.* Cord blood processing by a novel filtration system. *Cell Prolif.* 671–

- 681 (2015). doi:10.1111/cpr.12217
56. Pegg, D. E. Principles of Cryopreservation. *Methods Mol. Biol.* **368**, 39–57 (2007).
 57. Mitchell, R. *et al.* Impact of Long-Term Cryopreservation on Single Umbilical Cord Blood Transplantation Outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **21**, 50–54 (2015).
 58. Broxmeyer, H. E. *et al.* Brief report Hematopoietic stem / progenitor cells , generation of induced pluripotent stem cells , and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23 . 5-year cryopreserved cord blood. *Blood* **117**, 4773–4777 (2011).
 59. Harris, D. T. Collection , Processing , and Banking of Umbilical Cord Blood Stem Cells for Clinical Use in Transplantation and Regenerative Medicine. **39**, 173–178 (2008).
 60. Hanna, J. & Hubel, A. Preservation of stem cells. *Organogenesis* **5**, 134–7 (2009).
 61. Han, D. W. *et al.* Beneficial effects of freezing rate determined by indirect thermophysical calculation on cell viability in cryopreserved tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil. Biotechnol* **34**, 205–221 (2006).
 62. Berz, D., McCormack, E. M., Winer, E. S., Colvin, G. A. & Quesenberry, P. J. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am. J. Hematol.* **82**, 463–472 (2007).
 63. Son, J. H., Heo, Y. J., Park, M. Y., Kim, H. H. & Lee, K. S. Optimization of cryopreservation condition for hematopoietic stem cells from umbilical cord blood. *Cryobiology* **60**, 287–292 (2010).
 64. Hunt, C. J., Armitage, S. E. & Pegg, D. E. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34+ cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* **46**, 76–87 (2003).
 65. Chen, G. *et al.* Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
 66. Yang, H. *et al.* Damage and protection of UC blood cells during cryopreservation. *Cytotherapy* **3**, 377–86 (2001).
 67. Wall, D. a & Chan, K. W. Selection of cord blood unit(s) for transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **42**, 1–7 (2008).
 68. Barker, J. N., Byam, C., Scaradavou, A. & Dc, W. How I treat : the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts How I treat How I treat : the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. **117**, 2332–2339 (2011).
 69. Wynter, E. A. *et al.* CD34+ AC133+ Cells Isolated from Cord Blood are Highly Enriched in Long-Term Culture-Initiating Cells , NOD / SCID-Repopulating Cells and Dendritic Cell Progenitors. **16**, 387–396 (1998).
 70. Maleki, L. A. *et al.* Generation and Characterization of Anti-CD34 Monoclonal Antibodies that React with Hematopoietic Stem Cells. **16**, 361–366 (2014).
 71. Brand, A. *et al.* Viability does not necessarily reflect the hematopoietic progenitor cell potency of a cord blood unit: Results of an interlaboratory exercise. *Transfusion* **48**, 546–549 (2008).
 72. Solves, P., Mirabet, V., Planelles, D., Carbonell-uberos, F. & Roig, R. Influence of

- volume reduction and cryopreservation methodologies on quality of thawed umbilical cord blood units for transplantation. **56**, 152–158 (2008).
73. Gannon, T., McConnell, K. & Riley, J. The Use of Hydroxy-Ethyl Starch Sedimentation for Autologous Buffy Coat Preparation. 311–314 (2005).
 74. Ademokun, J. A. *et al.* Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking. 1023–1028 (1997).
 75. Högman, C. F., Eriksson, L., Hedlund, K. & Wallvik, J. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang.* **55**, 211–217 (1988).
 76. Armitage, S. *et al.* Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant.* **23**, 505–9 (1999).
 77. Solves, P., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Soler, M. A. & Roig, R. Automated separation of cord blood units in top and bottom bags using the Compomat G4. 202–207 (2006). doi:10.1111/j.1365-2257.2006.00778.x
 78. Zingsem, J. *et al.* Cord blood processing with an automated and functionally closed system. *Transfusion* **43**, 806–813 (2003).
 79. Zinno, F. *et al.* Processing of hematopoietic stem cells from peripheral blood before cryopreservation: use of a closed automated system. *Transplant. Cell. Eng.* **51**, 2656–2663 (2011).
 80. Lapiere, V. *et al.* Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy* **9**, 165–169 (2007).
 81. Papassavas, A. C. *et al.* A strategy of splitting individual high volume cord blood units into two half subunits prior to processing increases the recovery of cells and facilitates ex vivo expansion of the infused haematopoietic progenitor cells in adults. *Int. J. Lab. Hematol.* **30**, 124–132 (2008).
 82. Rodriguez, L., Azqueta, C., Azzalin, S., Garcia, J. & Querol, S. Washing of cord blood grafts after thawing: High cell recovery using an automated and closed system. *Vox Sang.* **87**, 165–172 (2004).
 83. Naing, M. W. *et al.* Improving umbilical cord blood processing to increase total nucleated cell count yield and reduce cord input wastage by managing the consequences of input variation. *Cytotherapy* **17**, 58–67 (2015).
 84. Basford, C., Forraz, N., Habibollah, S., Hanger, K. & McGuckin, C. The cord blood separation league table: A comparison of the major clinical grade harvesting techniques for cord blood stem cells. *Int. J. Stem Cells* **3**, 32–45 (2010).
 85. Solves, P. *et al.* A new automatic device for routine cord blood banking : critical analysis of different volume reduction methodologies. *Cytotherapy* **11**, 1101–1107 (2009).
 86. Kim, C., Wilke-douglas, M. & Sivilotti, M. Meta-Analysis of the AXP® and Sepax® Automated Cord Blood Processing Systems. *CESCA Ther.* (2015).
 87. Paulson, K. *et al.* Routine filtration of hematopoietic stem cell products: The time has arrived. *Transfusion* **55**, 1980–1984 (2015).
 88. Bruil, A., Beugeling, T., Feijen, J. & van Aken, W. G. The mechanisms of leukocyte removal by filtration. *Transfus. Med. Rev.* **9**, 145–166 (1995).

89. Wortham, S. T., Ortolano, G. A. & Wenz, B. A brief history of blood filtration: Clot screens, microaggregate removal, and leukocyte reduction. *Transfus. Med. Rev.* **17**, 216–222 (2003).
90. Dzik, S. Leukodepletion blood filters: filter design and mechanisms of leukocyte removal. *Transfus. Med. Rev.* **7**, 65–77 (1993).
91. Pietersz, R. N. I., Van Der Meer, P. F. & Seghatchian, M. J. Update on leucocyte depletion of blood components by filtration. *Transfus. Sci.* **19**, 321–328 (1998).
92. Yasutake, M. *et al.* Stem cell collection filter system for human placental/umbilical cord blood processing. *Vox Sang.* **80**, 101–105 (2001).
93. Tokushima, Y., Sasayama, N. & Takahashi, T. A. Repopulating activities of human cord blood cells separated by a stem cell collection filter in NOD/SCID mice: a comparative study of filter method and HES method. *Transfusion* **41**, 1014–1019 (2001).
94. Eichler, H., Kern, S., Beck, C., Zieger, W. & Kluter, H. Engraftment Capacity of Umbilical Cord Blood Cells Processed by Either Whole Blood Preparation or Filtration. *Filtration* 208–216 (2003).
95. Aoki, M., Yasutake, M. & Murohara, T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* **22**, 994–1002 (2004).
96. Dal Cortivo, L. *et al.* Cord blood banking: volume reduction using ‘Procord’ Terumo filter. *J Hematother Stem Cell Res* **9**, 885–890 (2000).
97. Shima, T. *et al.* A novel filtration method for cord blood processing using a polyester fabric filter. *Int. J. Lab. Hematol.* **35**, 436–446 (2013).
98. Aroviita, P., Teramo, K. & Hiilesmaa, V. Cord blood hematopoietic progenitor cell concentration and infant sex. **45**, 613–621 (2005).
99. Yang, H., Loutfy, M. R., Mayerhofer, S. & Shuen, P. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation. **51**, 284–292 (2011).
100. Nakagawa, R. *et al.* Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. **44**, 262–267 (2004).
101. George, T. J., Sugrue, M. W., George, S. N., Wingard, J. R. & Al, G. E. T. Factors associated with parameters of engraftment potential of. **46**, 1803–1812 (2006).
102. Mcguckin, C. P., Basford, C., Hanger, K., Habibollah, S. & Forraz, N. Cord blood revelations — The importance of being a first born girl , big , on time and to a young mother! 733–741 (2007). doi:10.1016/j.earlhumdev.2007.09.001
103. Ballen, K. K. *et al.* Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 7–14 (2001).
104. Jones, J. *et al.* Obstetric predictors of placental/umbilical cord blood volume for transplantation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **188**, 503–509 (2003).
105. Wen, S. H., Zhao, W. L., Lin, P. Y. & Yang, K. L. Associations among birth weight, placental weight, gestational period and product quality indicators of umbilical cord blood units. *Transfus. Apher. Sci.* **46**, 39–45 (2012).
106. Mancinelli, F. *et al.* Optimizing Umbilical Cord Blood Collection: Impact of Obstetric Factors Versus Quality of Cord Blood Units. *Transplant. Proc.* **38**, 1174–

- 1176 (2006).
107. Omori, A. *et al.* Influence of obstetric factors on the yield of mononuclear cells, CD34 + cell count and volume of placental/umbilical cord blood. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **36**, 52–57 (2010).
 108. Mazzocchetti, D. *et al.* Total nucleated cells as a sole predictor of distinct targets of hematopoietic potential (CD34+ cells) in cord blood units: the results of a large series analysis in autologous cord blood units. **54**, 1256–1262 (2014).
 109. Jan, R. H., Wen, S. H., Shyr, M. H. & Chiang, B. L. Impact of maternal and neonatal factors on CD34+ cell count, total nucleated cells, and volume of cord blood. *Pediatr. Transplant.* **12**, 868–873 (2008).
 110. Dimitriou, H. *et al.* The impact of mode of delivery and gestational age on cord blood hematopoietic stem/progenitor cells. *Ann Hematol* **85**, 381–385 (2006).
 111. Santos, S. V. F. *et al.* Predictors of high-quality cord blood units. *Transfusion* **00**, 1–7 (2016).
 112. Wisgrill, L. *et al.* Hematopoietic stem cells in neonates: Any differences between very preterm and term neonates? *PLoS One* **9**, (2014).
 113. Sparrow RL, Cauchi, J., Ramadi, L., Waugh, C. & Kirkland, M. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. *Transfus. Cell. Eng.* **42**, 210–215 (2002).
 114. Bonab, M. A. M., Alimoghaddam, K. A., Goliaei, Z. A. & Ghavamzadeh, A. R. Which factors can affect cord blood variables? *Transfusion* **44**, 690–693 (2004).
 115. Al-Sweedan, S. A., Musalam, L. & Obeidat, B. Factors predicting the hematopoietic stem cells content of the umbilical cord blood. *Transfus. Apher. Sci.* **48**, 247–52 (2013).
 116. Surbek, D. V. *et al.* Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183**, 218–221 (2000).
 117. Selves, P. *et al.* Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 269–273 (2003).
 118. Allan, D. S. *et al.* Delayed clamping of the umbilical cord after delivery and implications for public cord blood banking. *Transfusion* **00**, n/a–n/a (2015).
 119. Surbek, D. V, Schönfeld, B., Tichelli, a, Gratwohl, a & Holzgreve, W. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant.* **22**, 311–312 (1998).
 120. Lim, F. T. H. *et al.* Association of stress during delivery with increased numbers of nucleated cells and hematopoietic progenitor cells in umbilical cord blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183**, 1144–1151 (2000).
 121. Clark, P., Trickett, A., Stark, D. & Vowels, M. Factors affecting microbial contamination rate of cord blood collected for transplantation. *Transfusion* **52**, 1770–1777 (2012).
 122. Meyer, T. P. H. *et al.* Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* **8**, 265–276 (2006).
 123. SH, C. *et al.* Microbial contamination of the Tzu-Chi Cord Blood Bank from 2005 to 2006. *Acta Paediatr Taiwan* **49**, 9–13 (2008).

124. Monteiro, F. Análise de Parâmetros Críticos para a Criopreservação de Amostras de Sangue e Tecido do Cordão Umbilical. *Crioestaminal* (2015).
125. Cabeleira, A. Avaliação de Parâmetros Críticos para a Criopreservação de Amostras de Sangue do Cordão Umbilical. *Crioestaminal* (2010).
126. Pereira-Cunha, F. G. *et al.* Umbilical cord blood CD34+ stem cells and other mononuclear cell subtypes processed up to 96 h from collection and stored at room temperature maintain a satisfactory functionality for cell therapy. *Vox Sang.* **108**, 72–81 (2015).
127. Moldenhauer, a *et al.* Optimum storage conditions for cord blood-derived hematopoietic progenitor cells prior to isolation. *Bone Marrow Transplant.* **40**, 837–842 (2007).
128. Pereira-Cunha, F. G. *et al.* Viability of umbilical cord blood mononuclear cell subsets until 96 hours after collection. *Transfusion* **53**, 2034–2042 (2013).
129. Barini, R., Ferraz, U. C. & Machado, I. N. Does the time between collecting and processing umbilical cord blood samples affect the quality of the sample ? **9**, 207–211 (2011).
130. Page, K. M. *et al.* Optimizing Donor Selection for Public Cord Blood Banking: Influence of Maternal, Infant and Collection Characteristics on Cord Blood Unit Quality. **19**, 161–169 (2015).
131. Solomon, M., Wofford, J., Johnson, C., Regan, D. & Creer, M. H. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. **50**, 820–830 (2010).
132. Rogers, I. *et al.* Human UC-blood banking: impact of blood volume, cell separation and cryopreservation on leukocyte and CD34(+) cell recovery. *Cytotherapy* **3**, 269–276 (2001).
133. Dulugiac, M. *et al.* Factors which can influence the quality related to cell viability of the umbilical cord blood units. *Transfus. Apher. Sci.* **51**, 90–8 (2014).
134. Mazzocchi, G. *et al.* Time related variations in stem cell harvesting of umbilical cord blood. *Sci. Rep.* **6**, 21404 (2016).
135. Servais, S. *et al.* Circadian and circannual variations in cord blood hematopoietic cell composition. *Haematologica* **100**, 32–34 (2015).
136. Mendez-Ferrer, S., Andrew, C., Merad, M. & Frenett, P. S. Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. **16**, 235–242 (2009).
137. Sugiyama, A. *et al.* Altered expression of circadian clock genes during peripheral blood stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Chronobiol Int* **32**, 934–941 (2015).
138. Brown Jr., F. A. Propensity for lunar periodicity in hamsters and its significance for biological clock theories. *Exp. Biol. Med.* **120**, 792–797 (1965).
139. Wong, a, Yuen, P. M., Li, K., Yu, a L. & Tsoi, W. C. Cord blood collection before and after placental delivery: levels of nucleated cells, haematopoietic progenitor cells, leukocyte subpopulations and macroscopic clots. *Bone Marrow Transplant.* **27**, 133–138 (2001).
140. Lee, Y., Han, J., Choi, A., Lee, H. & Al, L. E. E. E. T. The Alterations of the Activities of Coagulation Inhibitors and Fibrinolytic Factors in Stored Cord Blood Could Affect the Yield of Progenitor Cells During Processing. **657**, 653–657

- (1999).
141. Hussein, A. A., Bawadi, R. M., Tahtamouni, L. H., Frangoul, H. & ElKarmi, A. Z. Feasibility of collecting umbilical cord blood in Jordan and the effect of maternal and neonatal factors on hematopoietic stem cell content. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **6**, (2014).
 142. Solves, P., Planelles, D., Mirabet, V., Blanquer, A. & Carbonell-Uberos, F. Qualitative and quantitative cell recovery in umbilical cord blood processed by two automated devices in routine cord blood banking: a comparative study. *Blood Transfus.* **11**, 405–411 (2013).
 143. Pope, B., Mitsakos, K., Bilgin, A., Hokin, B. & Grant, R. Predicting overall viability of cord blood harvests. *Transfusion* **52**, 1079–1085 (2012).
 144. Manegold-Brauer, G. *et al.* A prenatal prediction model for total nucleated cell count increases the efficacy of umbilical cord blood banking. *Transfusion* **54**, 2946–2952 (2014).
 145. Jaime-Pérez, J. C. *et al.* Evaluation of volume and total nucleated cell count as cord blood selection parameters: A receiver operating characteristic curve modeling approach. *Am. J. Clin. Pathol.* **136**, 721–726 (2011).
 146. Dazey, B. *et al.* Cord Blood Processing by Using a Standard Manual Technique and Automated Closed System ' Sepax ' (Kit CS-530). *Stem Cells Dev.* **14**, 6 – 10 (2005).
 147. Takanashi, M. *et al.* Red blood cell depletion of cord blood using an automated system-Evaluation of the AXP system. *Japanese J. Transfus. Cell Ther.* **56**, 62–67 (2010).
 148. Li, J. *et al.* Validation study of mononuclear cell recovery using the AXP AutoXpress Platform. *Thermogenes. Co., Rancho Cordova CA.* **42**, 100
 149. Meyer-Monard, S. *et al.* Initial cord blood unit volume affects mononuclear cell and CD34+ cell-processing efficiency in a non-linear fashion. *Cytotherapy* **14**, 215–22 (2012).