

Impacto do armazenamento prolongado de amostras fixadas de sangue de cordão umbilical na quantificação de células-tronco hematopoiéticas por Citometria de Fluxo.

Tatiana Rabêlo Santos

Introdução

As células que compõem o sangue, ou células hematopoiéticas, exibem características diferentes das de outros órgãos vitais: o tempo de vida é relativamente curto, há multiplicidade de tipos celulares e grande dispersão no organismo. (1) Apesar da extrema diversidade funcional e estrutural observadas nas células que compõem o sangue periférico, existe forte evidência de que todas as células do sangue sejam uma progênie de um único tipo celular: a célula-tronco hematopoiética. (2)

As células-tronco hematopoiéticas são células raras, correspondendo a 0,05% e 0,5% do total de células da medula óssea e sangue de cordão umbilical. São definidas pela sua capacidade de auto-renovação e proliferação, diferenciando-se em todas as linhagens de células sanguíneas, sendo capazes de reconstituir todas as populações hematopoiéticas a partir de uma única célula. (1,3,4)

Devido à sua elevada capacidade de auto-renovação e diferenciação celular, o transplante de células-tronco hematopoiéticas é hoje uma modalidade de tratamento consistente para diversas doenças congênitas ou adquiridas, malignas ou benignas, como, por exemplo, imunodeficiências primárias e leucemias. (5) Como as células-tronco podem ser mobilizadas da medula óssea para o sangue periférico e possuem a capacidade de, mesmo circulantes, voltarem à medula óssea (*homing*), o transplante autólogo e alogênico de células progenitoras do sangue periférico tornou-se uma alternativa ao transplante de medula óssea (3, 6).

A citoaférese é hoje o método padrão para coleta de células-tronco hematopoiéticas no sangue periférico para realização de transplante autólogo. O material é coletado após a administração de quimioterapia, visando à eliminação dos sistemas hematológico e imune do paciente, seguida de

mobilização das células-tronco com a administração de fatores de crescimento (por exemplo, o G-CSF) (2, 6).

O sangue de cordão umbilical também é uma fonte rica em células progenitoras hematopoiéticas e tem sido utilizado com sucesso em transplantes (2; 6-10). Desde 1988, quando as células do sangue de cordão umbilical foram utilizadas pela primeira vez como alternativa em relação à medula óssea ou citoaférese, foram realizados mais de 20.000 transplantes de células-tronco de cordão umbilical em todo o mundo (12-15), sendo utilizado com sucesso no tratamento da anemia de Fanconi, erros inatos do metabolismo e imunodeficiências primárias.

Apesar de não serem encontradas em grande número, as células hematopoiéticas de cordão umbilical apresentam vantagens proliferativas sobre as fontes tradicionais (2) e encontram-se em um estágio mais precoce do que as células presentes na medula óssea de adultos, sendo mais tolerantes a diferenças de HLA e conseqüentemente reduzindo o risco de doença enxerto versus hospedeiro (16). Além disso, são de fácil obtenção, uma vez que a coleta não traz nenhum dano ao doador. (16)

A composição celular e o número de células-tronco existentes em uma unidade de cordão umbilical influenciam o sucesso da enxertia após o transplante, sendo sugerido um número mínimo de 2×10^5 por quilograma de peso. (15)

A caracterização e quantificação das células-tronco do cordão umbilical normalmente são realizadas por citometria de fluxo, um método que permite a análise simultânea de múltiplas características físicas e químicas de células individuais (tamanho complexidade interna e presença ou ausência de antígenos específicos), normalmente células. Através da citometria de fluxo, são quantificadas as células que expressam o antígeno de superfície CD34, presente em células-tronco hematopoiéticas com a capacidade de regenerar a medula óssea para todas as linhagens. (1, 6, 17, 19) Para tal, são utilizados anticorpos monoclonais anti-CD34 marcados com fluorocromos.

O procedimento de coleta e preservação das células-tronco de cordão umbilical tem se popularizado nos últimos anos. O sangue de cordão pode ser coletado a qualquer horário do dia ou da noite e enviado dos diversos hospitais e maternidades de origem para centros que processam e criopreservam o

material. A manutenção da viabilidade celular através do correto transporte e armazenamento da amostra são críticos para uma boa preservação. (18)

Após o processamento da amostra e marcação celular com o anticorpo monoclonal anti-CD34, a aquisição da amostra no citômetro de fluxo deve ser imediata, sob o risco de perda de populações celulares. A fixação da amostra com paraformaldeído 1% após a marcação com o anticorpo monoclonal é um procedimento utilizado para aumentar o tempo de estabilidade celular até o processamento no citômetro de fluxo.

Objetivo

O objetivo desse trabalho é analisar o impacto do armazenamento de amostras de sangue de cordão umbilical, fixadas em paraformaldeído, na quantificação de células CD34⁺, durante um período de 0, 24 e 48 horas após a marcação celular.

Casuística e Métodos

Foram testadas 30 amostras de sangue de cordão umbilical, provenientes de diversos hospitais e maternidades, enviadas para preservação ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical Cordcell de São Paulo, no período de 5 a 28 de março de 2012. Todas as amostras testadas foram marcadas no mesmo dia que foram coletadas. As amostras foram enviadas utilizando o anticoagulante CPDA-1 e analisadas antes de seu congelamento, tendo sido mantidas em temperatura ambiente até o final do procedimento de marcação celular.

Foi realizada marcação celular com os anticorpos monoclonais CD45 APC (clone HI30) e CD34 PE (clone 563) – Becton Dickinson™, de acordo com o protocolo do fabricante, por 15 minutos no escuro. Após, foi realizada lise das hemácias com o reagente FACSLysing BD™ por 15 minutos e lavagem com PBS. Após o procedimento, foi adicionado paraformaldeído a 1% para fixação das células.

Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FacsCalibur™ (Becton Dickinson).

Após a fixação com paraformaldeído, as amostras foram armazenadas em geladeira (temperatura entre 2-6 °C) e novamente submetidas à aquisição no citômetro após 24 e 48 horas.

A análise foi realizada através da aplicação de gates sequenciais, conforme proposto pela *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE) (23) e pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (20).

O cálculo do CD34 Absoluto foi realizado da seguinte maneira:

$$\text{N}^\circ \text{ de leucócitos da amostra} \times \text{Fenótipo CD34 (\%)} / 100 = \text{CD34 Absoluto } (\mu\text{L})$$

A contagem do número de leucócitos foi realizada no primeiro dia através de contagem automatizada (contador automático Mythic/Orphêe) absoluta de CD34 foi posteriormente calculada para as três quantificações de CD34% (0, 24 e 48 horas).

Para análise estatística, após teste de normalidade, foi utilizada a aplicação da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o software SPSS.

Resultados

Foram avaliadas 30 amostras de sangue de cordão umbilical durante o período de 0, 24 e 48 horas após a marcação celular e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Fenótipo CD34+ (% e absoluto) após 0, 24 e 48 horas após a marcação celular.

Amostra	T=0 h	T = 24 h	T = 48 h
%			
1	0,1	0,09	0,13
2	0,29	0,27	0,23
3	0,19	0,19	0,14
4	0,08	0,06	0,07
5	0,17	0,15	0,16
6	0,08	0,08	0,08
7	0,04	0,04	0,03
8	0,29	0,24	0,28
9	0,23	0,21	0,21
10	0,2	0,18	0,18

Amostra	T=0 h	T = 24 h	T = 48 h
Absoluto			
1	8,5	7,65	11,05
2	31,32	29,16	24,84
3	10,83	10,83	7,98
4	3,6	2,7	3,15
5	13,26	11,7	12,48
6	3,12	6,24	6,24
7	2,76	2,76	2,07
8	26,97	22,32	26,04
9	23,46	21,42	21,42
10	11,6	10,44	10,44

11	0,15	0,15	0,14
12	0,17	0,14	0,14
13	0,34	0,28	0,29
14	0,11	0,08	0,12
15	0,17	0,15	0,17
16	0,1	0,13	0,12
17	0,21	0,25	0,24
18	0,11	0,09	0,06
19	0,13	0,17	0,13
20	0,22	0,18	0,2
21	0,19	0,15	0,14
22	0,32	0,22	0,23
23	0,3	0,26	0,27
24	0,12	0,12	0,1
25	0,36	0,41	0,32
26	0,15	0,11	0,15
27	0,5	0,49	0,39
28	0,07	0,09	0,1
29	0,16	0,14	0,17
30	0,09	0,15	0,14

11	12	12	11,2
12	17,68	14,56	14,56
13	15,64	12,88	13,34
14	10,56	7,68	11,52
15	16,49	14,55	16,49
16	6,1	7,93	7,32
17	17,01	20,25	19,44
18	6,93	5,67	3,78
19	11,18	14,62	11,18
20	12,76	10,44	11,6
21	21,09	16,65	15,54
22	25,92	17,82	18,63
23	29,7	25,74	26,73
24	15	15	12,5
25	46,44	52,89	41,28
26	10,66	7,82	10,66
27	41,65	40,81	32,49
28	3,03	3,9	4,33
29	16,16	14,14	17,17
30	5,67	9,45	8,82

Legenda: T= Tempo decorrido da marcação celular, em horas.

A aplicação do teste de análise de variância (ANOVA) resultou em valor de F inferior ao F crítico, tanto para os resultados percentuais quanto absolutos de células CD34, demonstrando que não existe diferença significativa entre os grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Aplicação da estatística ANOVA. (A) Análise do fenótipo CD34(%) e (B) Análise do número absoluto de células CD34. F crítico = 3,1.

A	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,009	2	,004	,438	,647
Within Groups	,860	87	,010		
Total	,869	89			

B	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	30,481	2	15,240	,147	,863
Within Groups	8994,543	87	103,386		
Total	9025,024	89			

Discussão

A recuperação de células-tronco CD34+ a partir do sangue, medula óssea, amostras de aférese ou de cordão umbilical sofre influência de múltiplos fatores pré-analíticos e analíticos. Idealmente, as amostras devem ser processadas imediatamente após a coleta. O objetivo da preparação da amostra é processá-la em um espécime representativo para a introdução no citômetro de fluxo, para análise. É crítico que se evite perdas diferenciais nas subpopulações leucocitárias durante o processamento, já que elas podem levar à viés nos resultados de CD34+. (20)

O paraformaldeído vem sendo amplamente utilizado nos protocolos de imunofenotipagem de espécimes diagnósticos, por permitir maior estabilidade da amostra após o seu processamento, até a aquisição no citômetro de fluxo. (21)

A fixação com o paraformaldeído não altera significativamente a dispersão de luz no momento da aquisição. (22) Sua eficácia na preservação de populações linfocitárias está muito bem estabelecida na literatura. (21)

Neste estudo, pudemos demonstrar que, para o método aplicado, o tempo de armazenamento da amostra não levou a impacto significativo na quantificação de CD34 até pelo menos 48h após o procedimento de marcação celular, utilizando-se a fixação com paraformaldeído.

Para a garantia da qualidade das amostras fixadas, é fundamental que sejam respeitados outros aspectos da preparação da amostra, entre eles:

- a) A utilização do CD45+ (antígeno leucocitário comum) (19), que permite a exclusão de debris celulares, eritrócitos (24), plaquetas e agregados (23);
- b) A marcação do CD34 com o fluorocromo ficoeritrina (PE), que apresenta maior fluorescência, maior tamanho de molécula e menor afinidade com células mortas e receptores Fc (proteínas encontradas na superfície de células do sistema imune e fibroblastos) (17, 20, 26, 30);
- c) A utilização do epítipo classe III do CD34, que é resistente a clivagem enzimática com neuraminidase, quimopopáina e glicoprotease (26, 27, 28, 29, 30), além de ser mais bem preservada se comparada ao epítipo de classe I que é mais sensível à

degradação pela exposição das células ao conservante DMSO e aos procedimentos de congelamento/descongelamento. (31)

Conclusão

Os resultados obtidos demonstram não existir diferenças estatisticamente significativas para a quantificação de células CD34+ em amostras de cordão umbilical, após 24 e 48h da marcação celular, desde que seja utilizada a fixação com paraformaldeído.

Referências bibliográficas

1. Zago, M. A.; Covas, D. T. *Células-tronco – A nova fronteira da medicina*. Ed. Atheneu, 2006.
2. Greer, J. P.; Foerster, J.; Lukens, J. N. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 11^o Edição.
3. The National Institutes of Health resource for stem cell research.: <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter5.asp>
4. Oliveira, R. A. G.; Neto, A. P. *Anemias e Leucemias*. Ed. Roca, 2004.
5. Goldman J. *Bone marrow transplantation*. *Curr Opin Haematol* 1995; 2: 407-408.
6. Helena Z. W. Grotto, José F. A. Noronha. *Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado*. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* vol.25 no. 3. São José do Rio Preto 2003
7. Rubinstein P., Rosenfield R. E., Adamson J. W., May W. S. *Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution*. *Blood* 1993; 81: 1679-1690.
8. McGlave P. *An expanded role of cord blood transplantation*. *Blood Cells*, 1991; 17: 330-337.
9. Gluckman E., Broxmeyer H. E, Auerbach A. D. et al. *Hematopoietic reconstitution a patient with Fanconi anaemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling*. *New Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.

10. Nimgaonkar M. T., Roscoe R. A., Persichetti J. ET AL. *A unique population of CD34+ cells in cord blood*. Stem Cells 1995; 13: 158-166.
11. Nicol A. J., Hows J. M., Bradley B. A. *Cord blood transplantation: a practical option?* Br J Haematol 1994; 87: 1-5.
12. Gluckman E., Locatelli F. *Umbilical cord blood transplants*. Curr Opin Hematol 2000; 7:353-7.
13. Gluckman E. *Hematopoietic stem cell transplants using umbilical-cord blood*. N Engl J Med 2001; 344:1860-1.
14. Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A., et al. *Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplantations from unrelated donors*. N Eng J Med 1998; 339:1565-77.
15. Basford C., Forraz N., McGuckin, C. *Optimized multiparametric immunophenotyping of umbilical cord blood cells by flow cytometric*. Nature Protocols 5, 1337–1346 (1 July 2010) | doi:10.1038/nprot.2010.88
16. Zhong, X. Y., Zhang, B., Asadollahi, R. Z., Low, S. H.; Holzgreve W. *Umbilical cord blood stem cells: what to expect*. New York Academy of Sciences, 2010. 17-22.
17. Krause D. S., Frackler M. J., Civin C., May W. S. *CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility*. Blood 1996; 87:1-13.
18. Hubel, A., Carlquist, D., Clay, M. and McCullough, J. (2004). *Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood*. Transfusion, 44: 518–525. doi: 10.1111/j.1537-2995.2004.03238.
19. Bacal, N. S; Faulhaber, M. H. W. *Aplicação prática em Citometria de Fluxo*. Ed. Atheneu, 2003.
20. Gratama, J. W., Kraan, J. et al. *Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry*. Approved Guideline-Second Edition. Vol. 27. Clinical and Laboratory Standards Institute. 16: 34.
21. Lal RB, Edison LJ, Chused TM. Fixation and long-term storage of human lymphocytes for surface marker analysis by flow cytometry. Cytometry. 1988 May; 9(3):213-9
22. Lanier, L. L., Warner, N. L. *Paraformaldehyde Fixation of Hematopoietic cells for quantitative flow cytometry (Facs) Analysis*. Journal of Immunological Methods, 47 (1981) 25-30

23. Sutherland D. R., Anderson L. Nayar M. K. R. et al. *The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry*. J. Hemothr. 1996; 5: 213-26.
24. Bossuyt X., Marti G.E., Fleisher T. A. *Comparative Analysis of Whole Lysis Methods for Flow Cytometry*. Cytometry 1997; 30:124-133.
25. To L. B., Haylock D. N., Simmons P. J. et al. *The biology and clinical uses of blood Stem cells*. Blood 1997; 89: 2233-2258.
26. Serke S., Huhn D. *Expression of Class I, II and III Epitopes of the CD34 Antigen by normal and leukemic hemopoietic cells*. Cytometry 1996; 26: 154-160.
27. Egeland T., Tjonnfjord G., Steen R., Gaudernack G., Thorsby E. *Positive selection of bone marrow-derived CD34 positive cells for possible stem cell transplantation*. Transplant Proc. 1993; 25(1):1261-1263. (Biology)
28. Knapp W., Dorken B., Rieber E.P., et al, ed. *Leucocyte Typing IV*. New York: Oxford University Press; 1989:1-1208.
29. Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, et al, ed. *Leukocyte Typing V: White Cell Differentiation Antigens*. New York: Oxford University Press; 1995.
30. Bacal, Nydia S. et al. *Quantificação de células CD 34+ em sangue periférico, produto de aférese e cordão umbilical: estudo comparativo de três diferentes metodologias*. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. [online]. 2001, vol.23, n.2, pp. 69-78. ISSN 1516-8484.
31. Lanza, F. Moretti, S. et al. *Assessment of distribution of CD34 epitope classes in fresh and cryopreserved peripheral blood progenitor cells and acute myeloid leukemic blasts*. Haematologica 1999; 84:969-977.