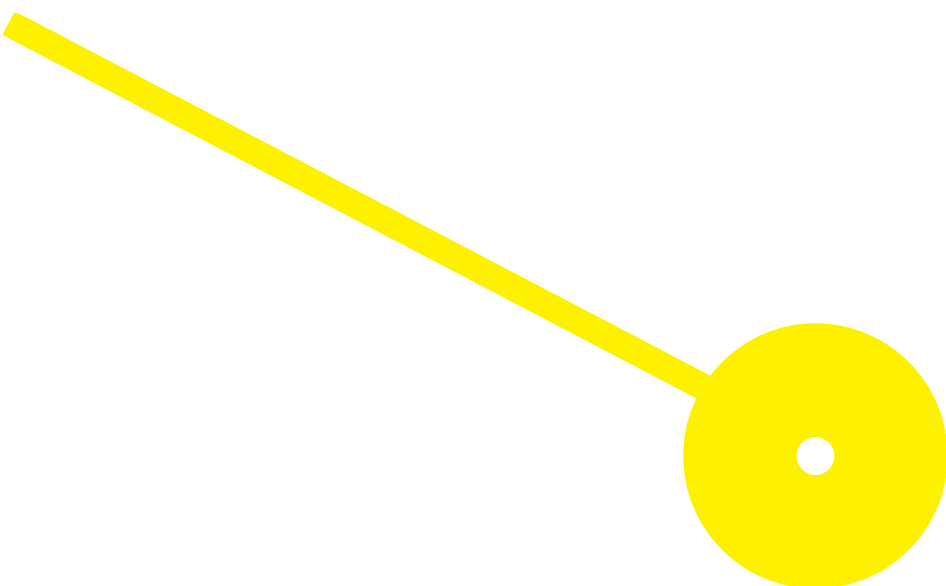




# A influência da criopreservação em células do sangue do cordão umbilical

Raquel Fernandes Vila Afonso

10/2023





**A influência da criopreservação em células do sangue do cordão umbilical**

**Autor**

Raquel Fernandes Vila Afonso

**Orientadores**

Professora Doutora Sandra Marlene Mota / Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dr. João Couto Sousa / Laboratório de Criopreservação BebéVida

Dra. Elsa Moreira / Stematters

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de Especialização em **Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Uma dissertação de mestrado é uma longa viagem, com um caminho permeado por inúmeros e diferentes desafios, incertezas e percalços. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio e dedicação de várias pessoas a quem agradeço e dedico este trabalho.

À minha orientadora, Professora Doutora Sandra Marlene Mota, um especial e sincero agradecimento, por se mostrar sempre disponível, por toda a paciência e apoio prestado.

Ao Doutor João Couto Sousa e à Doutora Elsa Moreira, por toda a disponibilidade e apoio prestado.

À minha família e amigos, por sempre acreditarem em mim, apoiarem os meus sonhos e por toda a força que me transmitiram.

Às minhas colegas de trabalho, pela paciência, força e apoio prestado.

E a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, me auxiliaram no meu percurso, o meu mais sincero obrigada.

## **Resumo**

As células provenientes do sangue do cordão umbilical podem ser criopreservadas durante anos. Para averiguar a viabilidade e potência celulares após este procedimento, é necessário a avaliação de vários parâmetros, tais como a contagem de células totais nucleadas, a contagem de células CD34+ e a viabilidade celular total.

Com o objetivo de avaliar e comparar a viabilidade e potência celular das células de sangue do cordão umbilical, antes e após o processo de criopreservação no Laboratório de Criopreservação BebéVida, realizou-se um estudo observacional, analítico, transversal. Este estudo teve por base os registos dos parâmetros analíticos efetuados às unidades de sangue do cordão umbilical (USCU) antes e após a criopreservação em unidades descongeladas no período entre janeiro de 2015 e dezembro de 2022.

Após criopreservação, as USCU analisadas demonstraram uma diminuição de 31,78% e 50,41% de células totais nucleadas e de células CD34+, respetivamente, e uma viabilidade celular total média de 90,53%. Quanto ao crescimento de unidades formadoras de colónias, 85,42% das USCU apresentaram crescimento. Foi ainda encontrada uma correlação negativa na comparação entre o tempo de criopreservação e a contagem total de células nucleadas, no entanto o valor da correlação foi baixo.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com o descrito na literatura e demonstram que as USCU incluídas neste estudo, até um período máximo de 10 anos de criopreservação, continuam a cumprir os critérios de qualidade. Com estes resultados, comprova-se a eficácia e confiança nas USCU criopreservadas como fonte de CEH.

**Palavras-chave:** Células estaminais; Transplantação; Sangue; Cordão umbilical; Criopreservação

## **Abstract**

Umbilical cord stem cells can be cryopreserved for years. To assess their viability and potency after this procedure, the evaluation of various parameters is required, such as the count of total nucleated cells, the count of CD34+ cells, and total cellular viability.

To evaluate and compare the cellular viability and potency of umbilical cord blood cells before and after cryopreservation process at the Laboratório de Criopreservação BebêVida, an observational, analytical, cross-sectional study was conducted. This study was based on the records of analytical parameters performed on umbilical cord blood units (USCU) before and after cryopreservation of units thawed between January 2015 and December 2022.

After cryopreservation, the analyzed USCU demonstrated a decrease of 31.78% and 50.41% in total nucleated cells and CD34+ cell, respectively, and an average total cellular viability of 90.53%. Regarding the growth of colony-forming units, 85.42% of the USCU exhibited growth. A negative correlation was also found when comparing the cryopreservation time and the total count of nucleated cells, however, the correlation value is low.

The results obtained are in accordance with what has been described in similar studies and demonstrate that the USCU included in this study, up to a maximum cryopreservation period of 10 years, continue to meet quality criteria. These results confirm the effectiveness and reliability of cryopreserved USCU as a source of hematopoietic stem cells.

**Keywords:** Stem cells; Transplantation; Blood; Umbilical Cord; Cryopreservation

## Índice

<b>1. Introdução</b> .....	10
<b>1.1. Sangue do cordão umbilical</b> .....	11
<b>1.1.1. Células Estaminais Hematopoiéticas</b> .....	12
<b>1.1.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas</b> .....	13
<b>1.2. Bancos de armazenamento e criopreservação de células estaminais</b> .....	14
<b>1.3. Transporte e Processamento</b> .....	15
<b>1.4. Criopreservação</b> .....	16
<b>2. Objetivos</b> .....	18
<b>3. Métodos</b> .....	18
<b>3.1. Procedimentos laboratoriais</b> .....	19
<b>3.2. Análise estatística</b> .....	21
<b>4. Resultados</b> .....	22
<b>4.1. Caracterização microbiológica da amostra</b> .....	23
<b>4.2. Caracterização celular das USCU</b> .....	23
<b>4.3. Relação entre o tempo de criopreservação e TNC e células CD34+</b> .....	19
<b>5. Discussão</b> .....	22
<b>6. Conclusão</b> .....	26
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	27

## **Índice de Quadros**

Quadro 1 Critérios de Exclusão e de Aceitação

20

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1 Distribuição do período de criopreservação, em dias, por ano em que foram descongeladas as unidades	23
Tabela 2 Distribuição das variáveis por ano	16
Tabela 3 Teste de normalidade Shapiro–Wilk e teste de amostras emparelhadas com valores de contagem celular de TNC e CD34+ antes e após a criopreservação	18
Tabela 4 Resultados do teste de normalidade	20
Tabela 5 Resultados do coeficiente de correlação de Ró de Spearman (Tempo de criopreservação (dias) e diferença TNC pré e pós criopreservação)	20
Tabela 6 Resultados do coeficiente de correlação Ró de Spearman (Tempo de criopreservação (Dias) e diferença CD34+ pré e pós criopreservação)	21

## **Índice de Gráficos**

Gráfico 1 Distribuição do número de unidades descongeladas por ano	22
Gráfico 2 Valores de TNC antes e após o processo de criopreservação	17
Gráfico 3 Valores das células CD34+ antes e após a criopreservação	19

## Índice de Abreviaturas

CEE	Células Estaminais Embrionárias
CEH	Células Estaminais Hematopóieticas
CEM	Células Estaminais Mesenquimais
CFCs	Células Formadoras de Colónias
CFUs	Unidades Formadoras de Colónias
CP	Células Progenitoras
CPDA	Citrato Fosfato Glicose Adenina
GVHD	Doença do Enxerto Contra Hospedeiro
HLA	Antigénios Leucocitários Humanos
MO	Medula Óssea
NK	<i>Natural Killer</i>
PE	Progenitores Endoteliais
PMT	Tubo Fotomultiplicador
SCU	Sangue do Cordão Umbilical
SP	Sangue Periférico
SPSS	Statistical Package for Social Science
TNC	Células Totais Nucleadas
Treg	Células T Reguladora
UC	Cordão Umbilical
USCU	Unidades de Sangue do Cordão Umbilical
USSC	Células Estaminais Somáticas Não Restritas

## Introdução

O parto é um momento crucial na vida de todas as espécies vivas e tem sido uma constante na história da humanidade. Atualmente existem diversos conhecimentos, equipamentos médicos e tecnologias que auxiliam os profissionais de saúde no acompanhamento e realização do parto, proporcionando segurança tanto para a mãe como para o bebê. Este avanço na medicina do parto, permitiu a descoberta e a valorização de produtos biológicos que antes eram descartados, tal como o cordão umbilical. (1)

O cordão umbilical é uma estrutura anatômica que conecta o feto ao útero materno durante a gestação e é designado cientificamente de "funiculus umbilicalis". O cordão é constituído por duas artérias e uma veia, envolvidos por uma gelatina mucoide chamada gelatina de Wharton, que tem como funções a proteção e permitir a flexibilidade da estrutura. (2,3)

As artérias do cordão umbilical têm a função de conduzir sangue com baixo teor de oxigénio e nutrientes residuais do feto para a placenta, onde são eliminados e o sangue é de novo oxigenado. Por seu lado, a veia umbilical é responsável pelo transporte de sangue rico em oxigénio e nutrientes da placenta para o feto. (3)

Esta ligação entre o feto e a placenta através do cordão umbilical é crucial para o desenvolvimento fetal, fornecendo ao bebê os nutrientes e oxigénio necessários para um crescimento adequado até ao momento do nascimento. (2,4)

Após o parto, o cordão umbilical é normalmente cortado e o que resta é a cicatriz umbilical, conhecida popularmente como "umbigo". (4)

A compreensão da importância do cordão umbilical remonta à idade média, uma vez que sempre se acreditou que esta estrutura era essencial para o desenvolvimento fetal. No entanto, uma compreensão mais precisa da função e anatomia do cordão umbilical surgiu apenas com o avançar da ciência e da medicina. (1) Na idade média e renascimento, acreditava-se que o cordão umbilical era um "tubo de vida" que ligava a mãe e o bebê, e que a sua interrupção resultaria na morte fetal. Com o avanço da anatomia e fisiologia, nos séculos XVI e XVII, os cientistas começaram a estudar a função do cordão umbilical. O século XIX foi marcado por avanços significativos na obstetrícia, surgindo a técnica de clampagem do cordão umbilical após o nascimento, sendo que no século XX esta técnica tornou-se prática comum nos partos hospitalares. (5)

Atualmente, a clampagem do cordão umbilical é prática comum realizada logo após o nascimento, e muitas vezes o cordão é cortado alguns minutos após o parto.(6)

### **1.1. Sangue do cordão umbilical**

O sangue do cordão umbilical apresenta-se hoje como uma fonte promissora de células estaminais hematopoiéticas (CEH), células estas que podem ser usadas no tratamento de patologias hematológicas em crianças e adultos. No entanto, existem muitas outras células que podem ser isoladas do sangue do cordão umbilical (SCU), nomeadamente células estaminais mesenquimais (CEM), progenitores endoteliais (PE), células estaminais somáticas não restritas (USSC), células T reguladoras (Treg), células *Natural Killer* (NK), células dendríticas e linfócitos T. (7)

As CEH são células estaminais multipotentes que mantêm a hematopoiese através da formação de todas as linhagens hematopoiéticas, durante o período fetal e toda a vida adulta. São caracterizadas pela expressão de antígenos CD34 e CD45. (8)

As CEM, também presentes no SCU, são caracterizadas como células indiferenciadas, com capacidade de autorenovação, com uma alta capacidade proliferativa e com o potencial de diferenciação em diferentes tipos celulares, incluindo osteócitos, condrócitos, adipócitos, cardiomiócitos e neurónios. (9) A medula óssea (MO) apresentava-se como a principal fonte destas células, no entanto, o procedimento de aspiração de MO é altamente invasivo e a frequência, o potencial de diferenciação e a expectativa de vida máxima das CEM derivadas da MO, diminui significativamente com o aumento da idade. (10)

O sangue do cordão umbilical é também um reservatório de progenitores endoteliais. Estes são capazes de gerar numerosa descendência de células maduras, tais como células endoteliais, células musculares lisas e células hematopoiéticas, e estão presentes no SCU numa concentração superior aquela encontrada no sangue periférico.(11) Existe também uma população de células estaminais embrionárias (CEE) com grande capacidade pluripotente. Estas células são provavelmente a população mais primitiva de células estaminais presentes no SCU. (7)

O SCU é uma fonte inicial atrativa de células T reguladoras (Tregs) devido à grande quantidade de Tregs que existem naturalmente em circulação e à carência de células T de memória no feto, em comparação com sangue periférico (SP) adulto. (12)

Os linfócitos T e as células dendríticas também estão presentes no SCU, os primeiros demonstrando a mesma capacidade e funcionalidade daqueles encontradas no SP adulto, e as segundas tendo um papel fundamental na resposta imune, uma vez que funcionam como interface entre os sistemas adaptativo e imune. (13)

As células *Natural Killer* (NK) são um subconjunto de linfócitos em circulação no SCU com importantes funções na imunidade e regulação da hematopoiese. (7)

Os diferentes tipos celulares encontrados no SCU são alvos de novos estudos na área da medicina regenerativa, permitindo a descoberta de novos tratamentos e opções para outras doenças (14), tais como lesões cerebrais (15–17), acidentes vasculares cerebrais (16,18–20), doença de Parkinson (20), doença de Alzheimer (20) e esclerose lateral amiotrófica (20). Alvos terapêuticos das células estaminais do sangue do cordão incluem aplicações ortopédicas para reparação de cartilagem, fusão da medula espinal e medicina regenerativa. (21–24)

### **1.1.1. Células Estaminais Hematopoiéticas**

O uso de SCU como fonte de CEH foi sugerido pela primeira vez em 1982 por Hal Broxmeyer e Edward A. Boyse e a Judith Bard. Desde essa data, surgiram diversos estudos sobre a importância destas células. (25)

Verificou-se que as CEH presentes no sangue do cordão apresentavam extensa capacidade de proliferação, ultrapassando as células progenitoras da MO, e o número destas células numa única colheita de sangue do cordão apresentava o mesmo alcance do número de células associado a um transplante de sucesso de MO. (26) Outra descoberta importante foi o facto de o sangue do cordão umbilical poder ser criopreservado durante mais de 20 anos, com uma recuperação eficiente de CEH. (27)

As células estaminais hematopoiéticas e progenitoras presentes no sangue do cordão umbilical podem ser caracterizadas de acordo com a frequência com que ocorrem, a sua imunofenotipagem e a capacidade de produzirem células formadoras de colónias (CFCs), sendo este um marcador de reconstituição hematopoiética. (28)

Um mililitro de sangue do cordão umbilical contém aproximadamente 8000 eritroblastos, entre 13000 e 24000 unidades formadoras de colónias (CFUs) de granulócitos/macrófagos (CFU-GM), e entre 1000 e 10000 de CFUs de granulócitos/eritrócitos/macrófagos/megacariócitos (CFU-GEMM). (29)

Quando comparado com a medula óssea, o sangue do cordão contém uma proporção mais elevada de células estaminais. (30)

O marcador imunofenotípico das CEH é a alta expressão CD34, um antigénio que regula a adesão celular hematopoiética às células estromais. (31)

Wagner *et al.* tem vindo a demonstrar que a transplantação de sangue do cordão umbilical com até dois antigénios sem compatibilidade HLA, causa menos doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) do que transplantes de medula óssea com compatibilidade total. (32) Esta diminuição de GVHD pode ser devida a fatores do sangue do cordão do dador, tais como baixo número de linfócitos no enxerto, pouca interação das células T do dador com as células apresentadoras de antigénios, diminuta função citotóxica das células T e diminuição da proliferação de células T imaturas do dador. (33,34)

As células estaminais do sangue do cordão têm demonstrado potencial para serem transformadas em diferentes tipos celulares quando tratadas em culturas celulares específicas e apresentam capacidade de produzir tecido de um órgão específico. (35)

### **1.1.2. Transplante de células estaminais hematopoiéticas**

O primeiro transplante hematopoiético em que foi usado SCU como fonte de células hematopoiéticas foi realizado no Hospital Saint-Louis, em Paris, França, em outubro de 1988. O doente foi um menino de 5 anos com anemia de *Fanconi*, um síndrome hereditário de falência da MO, que recebeu sangue do cordão HLA compatível da sua irmã gémea homozigótica. (36) O transplante foi um sucesso, e hoje o recetor está vivo e saudável, apresentando uma cura completa das manifestações hematológicas da doença. (36)

O sucesso abriu portas para um novo caminho nos transplantes alogénicos de sangue do cordão uma vez que: (a) uma única unidade de SCU contém CEH suficientes para reconstituir definitivamente o sistema linfo-hematopoiético do recetor; (b) uma unidade de SCU pode ser colhida durante o parto sem causar dano ao recém nascido ou à mãe; e (c) células estaminais hematopoiéticas do SCU podem ser criopreservadas e transplantadas para um recetor depois de descongeladas, sem perderem a sua capacidade de repopulação. As principais vantagens do uso de sangue do cordão são a ausência de risco para as mães e dadores, o risco reduzido da transmissão de infeções e a capacidade de armazenar sangue do cordão criopreservado, previamente testado e com a tipagem HLA, disponível para uso imediato. (37)

A Eurocord analisou os resultados dos transplantes de sangue do cordão em crianças com diferentes patologias. Em 147 doentes, a maioria com leucemia, a incidência cumulativa de recuperação de neutrófilos foi de 90%, e os incidentes de GVHD aguda e crónica foi de 12% e 10% até 2 anos, respetivamente. Em 5 anos, os incidentes cumulativos de mortalidade sem relapso e com relapso foram 9% e 47%, respetivamente, e a probabilidade de sobrevivência livre de doença foi 44%. A dose celular e o estado da doença constituíram importantes fatores para o sucesso do transplante. (38)

Grandes progressos têm sido realizados ao longo dos anos na seleção de doentes, modificações no acondicionamento das amostras, e melhores escolhas de sangue do cordão para transplante de acordo com a dosagem celular e tipagem HLA, fatores que contribuem para uma melhoria no que respeita ao transplante pediátrico de sangue do cordão umbilical e, consecutivamente, a um aumento da sua procura. (25)

No futuro, podem vir a ser realizados transplantes de sangue do cordão para combater também doenças não hematológicas, tais como doenças autoimunes e doenças degenerativas. (25)

## **1.2. Bancos de armazenamento e criopreservação de células estaminais**

Desde as primeiras investigações que se percebeu que as células do sangue do cordão umbilical podem ser armazenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  e depois descongeladas para serem utilizadas nas diferentes aplicações clínicas. (26,39)

Recorrendo a um processo de armazenamento eficiente, as unidades de sangue do cordão podem ser mantidas durante mais de 20 anos, sem existir comprometimento das suas propriedades biológicas. (27)

O primeiro banco de armazenamento de sangue do cordão foi criado em Nova Iorque em 1994. Hoje estima-se que cerca de 800000 unidades de sangue do cordão encontram-se armazenadas em bancos públicos de 45 países e mais de 4 milhões de unidades permanecem criopreservadas em bancos privados, em quase 100 países. (40)

A criação destes bancos resultou numa diminuição do tempo de procura de dadores compatíveis. Em alguns casos, o tempo necessário para encontrar um dador compatível pode ter um grande impacto na progressão da doença. (36)

O crescimento da procura de armazenamento de sangue do cordão umbilical impulsionou questões de estudo, inicialmente não existentes, tais como o melhor método de colheita,

processamento e armazenamento das unidades de sangue do cordão; expansão das células estaminais *ex vivo*; avaliação de doenças genéticas e infecciosas, o risco de GVHD aguda ou crónica, percentagem de recaídas com malignidade após transplante; a potencialidade para terapia genética com transplante autólogo e as questões éticas e sociais envolvidas na colheita e armazenamento de unidades de sangue do cordão umbilical. (41)

### **1.3. Transporte e Processamento**

O protocolo recomendado para a colheita de SCU, propõe clampar o cordão umbilical após o nascimento do bebé, mas antes da expulsão da placenta, limpar e desinfetar para prevenir contaminação com sangue materno ou agentes infecciosos. O cordão umbilical é depois perfurado em condições estéreis, permitindo a saída do fluxo sanguíneo livremente, com auxílio da gravidade, para um saco de colheita estéril que contém anticoagulante. (42)

O sangue do cordão pode ser colhido a qualquer hora e enviado desde o local de colheita até ao banco de armazenamento, onde é processado e criopreservado. A distância entre o local de colheita e o local de processamento pode variar significativamente. Consequentemente, determinar o máximo de tempo permitido entre a colheita e o início do processamento e criopreservação, sem comprometer a viabilidade e a potência das células, é crucial. (43)

As unidades de sangue do cordão devem idealmente ser processadas nas próximas 24h a seguir à colheita, podendo, no entanto, ir até às 72h. (42)

Outro parâmetro que influencia a percentagem de células não viáveis para transplante é a temperatura de armazenamento. Apesar de não existir um consenso na temperatura ótima a aplicar, o sangue do cordão apresenta um armazenamento ótimo a 4°C-8°C ou 22±4°C a temperatura ambiente. (44-46)

Devido às limitações intrínsecas do baixo volume e consequentemente baixa dosagem celular proveniente das especificações da colheita de SCU, torna-se crucial a minimização de perdas celulares e a maximização de recuperação celular durante todos os passos de processamento. (47)

O SCU é identificado e pesado e feita a medição do volume, sendo necessário realizar uma contagem celular total, número de células totais nucleadas, glóbulos vermelhos nucleados e contagem de células CD34+, antes do processamento, de modo a perceber o efeito na viabilidade e qualidade das células, depois da sua manipulação e armazenamento a longo prazo. (44,46,48)

As unidades processadas são posteriormente testadas para microrganismos aeróbios e anaeróbios, de modo a perceber a presença de contaminações cruzadas de bactérias ou fungos, com origem no canal de parto ou sepsis sistémica na mãe ou no bebé. Unidades contaminadas bacteriologicamente devem ser descartadas. (48)

Os dois grandes fatores na seleção de unidades de sangue do cordão para transplantação são a dosagem celular e a compatibilidade HLA. A dosagem celular está reportada como células totais nucleadas, e varia entre 0,8 e  $3 \times 10^9$  células por cada 120 ml de unidade colhida. A dose mínima exigida para garantir um exerto não se encontra definida, no entanto, a probabilidade de sucesso de enxerto e do transplante está relacionada com uma dose celular mais alta. (29,49)

A viabilidade a longo prazo das células congeladas demonstrou-se um importante parâmetro a ponderar quando se começou a realizar este processo de preservar as células. No entanto, é hoje sabido que os protocolos de criopreservação aplicados permitem em média uma recuperação de 80% de células totais nucleadas (TNC) e recuperação de 90% de células progenitoras. (42,48)

Atualmente, a contagem de TNC é um método protocolado e reprodutível que permite a avaliação da potência das unidades de sangue do cordão no momento da seleção para transplante. A contagem de CD34+ e CFUs está associada com o potencial do enxerto (32,50,51). A quantidade de CD34+ correlaciona-se com a probabilidade de sucesso do transplante, isto é, quanto maior a quantidade de CD34+, melhor a probabilidade de o transplante de sangue do cordão ser bem sucedido a longo prazo. (52)

#### **1.4. Criopreservação**

Apesar das investigações dedicadas a outras técnicas de armazenamento, como por exemplo a dessecação, a criopreservação mantém-se a técnica mais usada e a mais fiável para um armazenamento a longo prazo de células e tecidos. (53)

As etapas principais da criopreservação de SCU incluem a preparação cuidadosa das amostras, que envolve a remoção de impurezas, se necessário, seguida da adição de crioprotetores e o acondicionamento apropriado das amostras, sendo posteriormente submetidas a um processo de arrefecimento controlado, no qual a temperatura é diminuída de forma gradual, com o objetivo de evitar a formação de cristais de gelo. (53,54)

Após a congelação, as amostras são armazenadas em recipientes devidamente isolados, contendo azoto líquido, com temperaturas que atingem  $-196^{\circ}\text{C}$ , garantindo que a atividade metabólica e as reações químicas sejam interrompidas, com a finalidade de evitar a deterioração das amostras. (54,55)

Quando necessário, as amostras são descongeladas de forma controlada, recorrendo a um processo de aquecimento gradual, de modo a evitar danos celulares decorrentes de mudanças bruscas de temperatura. Após o descongelamento, a viabilidade e a potência das amostras são avaliadas, com o objetivo de assegurar a sua qualidade para uso em estudos científicos, terapias celulares e transplantes. (55)

O sangue do cordão umbilical pode ser eficazmente criopreservado recorrendo a criopreservantes, sendo o dimetilsulfoxido (DMSO) a 10% ou menos, o criopreservante mais usado atualmente, podendo ser criopreservado durante décadas sem degradação ou perda de potência significativas. (53,54,56)

No entanto, a criopreservação e a descongelação, são processos que aceleram as lesões celulares, aumentando a apoptose e a necrose. (57–59) Essencialmente, potência reduzida e baixa recuperação da função celular associadas a uma má execução do processo de criopreservação, estão correlacionadas com o risco de falência do enxerto de sangue do cordão. (50,60)

As amostras de SCU descongeladas, são analisadas e testadas com o objetivo de determinar a manutenção da sua qualidade, potência e viabilidade, sendo realizados a contagem de TNC, a contagem de células CD34+, a viabilidade celular, o *screening* microbiológico e a contagem de CFUs. (46,52)

A potência das unidades de sangue do cordão criopreservadas é um importante indicador da sua capacidade regenerativa após o processo de criopreservação. A potência é um indicador da atividade biológica das células estaminais do cordão umbilical, que permitem o desenvolvimento de progenitores hematopoiéticos. (46)

Os dados obtidos na análise dos critérios após a criopreservação, permitem realizar uma comparação com os dados obtidos antes da criopreservação e, assim, auferir sobre a influência deste processo na qualidade, na potência e na viabilidade celulares das células. (61)

## 2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a viabilidade e potência celular de células de sangue do cordão umbilical, antes e após o processo de criopreservação, de forma a determinar a eficácia e o sucesso deste processo no Laboratório de Criopreservação BebéVida.

## 3. Métodos

Foi realizado um estudo observacional, analítico, transversal, efetuado por consulta de registos no Laboratório de Criopreservação BebéVida.

A amostra em estudo compreendeu os registos de unidades de sangue do cordão umbilical que foram descongeladas no período entre janeiro de 2015 e dezembro de 2022. Para cada unidade foram recolhidas as seguintes variáveis:

- Identificação da amostra;
- Data de criopreservação;
- Data de descongelação;
- Quantidade de células totais nucleadas antes da criopreservação;
- Quantidade de células totais nucleadas após descongelação;
- Viabilidade celular CD34+ antes da criopreservação;
- Viabilidade celular após a criopreservação;
- Contagem de CD34+ antes da criopreservação;
- Contagem de CD34+ após a descongelação;
- *Screening* microbiológico antes da criopreservação;
- *Screening* microbiológico após descongelação;
- Crescimento de unidades formadoras de colónias.

Os dados foram obtidos a partir dos relatórios de avaliação regular da qualidade das unidades criopreservadas na BebéVida, que permite ao serviço registar os dados da data de criopreservação, data de descongelação e dos parâmetros que foram enumerados anteriormente. Os dias totais de criopreservação foram calculados recorrendo à data em que as unidades foram processadas e congeladas e à data em que foram descongeladas e avaliadas. Os restantes dados encontravam-se compilados nos relatórios de avaliação regular.

Os registos resultaram dos testes laboratoriais implementados no laboratório e realizados para determinação e avaliação dos diferentes parâmetros. Todas as técnicas foram executadas de acordo com as instruções do fabricante e dos procedimentos existentes no serviço. Durante o período em estudo não se realizaram alterações nas metodologias utilizadas.

### **3.1. Procedimentos laboratoriais**

Recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, realizada de forma automática no aparelho BD FACSCanto II, para realizar a contagem de células totais nucleadas, células CD34+ e CD45+, de acordo com as instruções do fabricante BD Biosciences®. (62)

A ótica do citómetro BD FACSCanto II consiste numa fonte de excitação com até três lasers: um azul (488 nm, estado sólido de 20 mW arrefecido a ar), um vermelho (633nm, 17 HeNe) e um violeta (405 nm, estado sólido de 30 mW). A ótica de excitação a laser ilumina as células na amostra, e a ótica de recolha direciona os sinais de dispersão de luz e fluorescência através de filtros espectrais para os detetores. (62)

Todos os resultados de citometria de fluxo são monitorizados e validados através da execução do controlo de qualidade interno diário, avaliando assim todos os processos e resultados analíticos com fiabilidade. Trimestralmente é executado o controlo de qualidade externo – UK NEQAS e semestralmente é realizada a manutenção do citómetro.

Para a realização do *screening* microbiológico, são colhidas amostras em dois frascos de meio de cultura BACT/ALERT®, um em anaerobiose e outro em aerobiose, e são enviados para análise num laboratório externo. Os resultados são depois enviados, analisados e aprovados. A colheita é realizada de acordo com as recomendações do fabricante. (63)

Os frascos de meio de cultura BACT/ALERT® da BIOMÉRIEUX proporcionam um ambiente ideal para a recuperação de uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e micobactérias. (64)

Para a seleção das unidades a ser criopreservadas, estas têm de corresponder aos critérios, sendo eles:

- Número de células totais antes de criopreservação:  $\geq 200\ 000$  células/unidade;
- Viabilidade celular total antes da criopreservação:  $\geq 70\%$ ;
- Período máximo entre a colheita da amostra e a criopreservação não exceder as 72 horas.

Assim, as unidades terão de cumprir os requisitos acima expressos para serem criopreservadas pela BebéVida. Para além desses, a BebéVida inclui ainda como critérios de exclusão e de inclusão os presentes no quadro 1. Se a unidade não cumprir os requisitos especificados, é considerada “não conforme”.

Critérios de Exclusão
<p>Resultados positivos para um ou mais dos marcadores virais: HCVM, HBC, HIV, CMV (IgM), no rastreio analítico do 3º trimestre;</p> <p>Infeção por SARS-CoV-2 até 7 dias antes do parto;</p> <p>Infeção, sepsis e/ou infeção grave por H1N1 até 7 dias antes do parto;</p> <p>Infeção ativa por Toxoplasma no parto (anti-Toxoplasma IgM+);</p> <p>Resultado positivo para um microorganismo resistente aos antibióticos/antimicóticos de uso comum (ex: amoxicilina/ácido clavulânico; Imipenem; Pip/tazobactam; Ciprofloxacina);</p> <p>Presença de uma doença hematológica ou metabólica hereditária diagnosticada no feto por amniocentese ou biópsia das vilosidades coriônicas (ex: drepanocitose, talassemia major, imunodeficiências congénitas, doenças metabólicas).</p>
Critérios de Aceitação
<p>Identificação da integridade celular;</p> <p>Resultados positivos na testagem da potência:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Células CD34 viáveis ≥ 70%</li> <li>• Células CD45 viáveis ≥ 45%</li> </ul> <p>Crescimento de unidades formadoras de colónias.</p>

Quadro 1 Critérios de Exclusão e de Aceitação

A bolsa de colheita utilizado pela BebéVida para a obtenção das amostras de SCU contém o anticoagulante citrato fosfato glicose adenina (CPDA).

O protocolo de criopreservação inicia-se com a refrigeração da câmara de criopreservação até 4°C e a colocação da bolsa de colheita selada *overwrap*, que contém a amostra, na respetiva cassette de alumínio. De seguida, a cassette de alumínio identificada e a criobolsa para CEM derivadas do SCU são colocadas a refrigerar no congelador de taxa controlada, sendo efetuada uma descida gradual da temperatura - 1°C/min até atingir os -60°C e 5°C/min até atingir os -

140°C. A curva de congelação deve ser interpretada no fim de cada processo de congelação. O tempo máximo entre a adição de crioprotetor e a criopreservação da amostra não deverá exceder os 30 minutos.

Depois de terminado o protocolo de criopreservação, as cassetes de alumínio e as criobolsas devem ser colocadas no contentor Biostor 5®, e este deve ser movido para perto do tanque de criopreservação previamente selecionado. As amostras são armazenadas na gaveta ou rack do tanque de criopreservação previamente definida. Durante o armazenamento, deve evitar-se a exposição das unidades de SCU à temperatura ambiente. (65)

O crescimento das CFUs é um parâmetro usado para avaliar a viabilidade e a qualidade das células estaminais hematopoiéticas presentes no sangue do cordão umbilical. É realizado recorrendo ao meio MethoCult™, cumprindo as instruções do fabricante.

O MethoCult™ usa meios de cultura semi-sólidos à base de metilcelulose, que são formulados para promover o crescimento e a diferenciação de células estaminais hematopoiéticas. (66)

### **3.2. Análise estatística**

Os dados assim obtidos foram sistematizados e analisados descritivamente nos programas Excel® e Statistical Package for Social Science® (SPSS) versão 28.0.0.0, sendo apresentados na forma de tabela e gráficos.

Para comparar os resultados obtidos antes e após o processo de criopreservação foi realizado inicialmente o teste da normalidade (Shapiro-Wilk) e subsequentemente o teste de Wilcoxon. Para estudar a possível relação entre o tempo de criopreservação e as diferenças encontradas nas contagens de TNC e CD34+ foi realizado o primeiro teste da normalidade e posteriormente o Coeficiente de Correlação de Ró de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

#### 4. Resultados

No período entre janeiro de 2015 e dezembro de 2022 foram descongeladas 48 unidades de sangue do cordão umbilical (USCU) criopreservadas na BebéVida.

Podemos observar no Gráfico 1 que o ano com mais USCU descongeladas foi 2015 com 10 USCU, seguindo-se o ano de 2018 com 9 e os anos de 2016, 2017, 2019 com 6 USCU cada. O ano com menor número foi 2021, com apenas 3 USCU descongeladas.

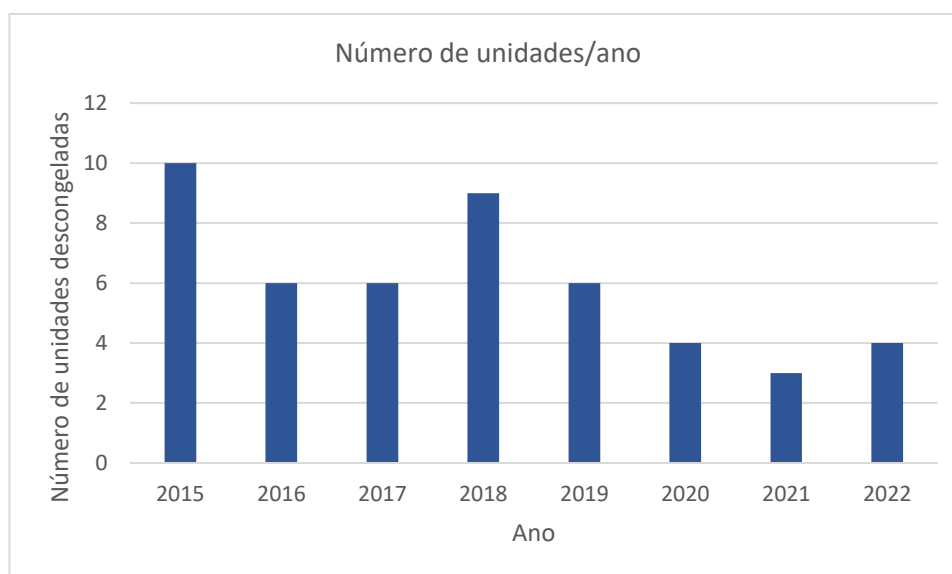


Gráfico 1 Distribuição do número de unidades descongeladas por ano

Na tabela 1 é possível verificar o tempo médio de criopreservação das USCU, por ano de descongelação. Observa-se que o período mais longo de criopreservação foi de 3967 dias (10,86 anos) e o período mais curto foi de 54 dias.

Ano	n	Média de dias de criopreservação	Período máximo de criopreservação (dias)	Período mínimo de criopreservação (dias)	Desvio padrão
2015	10	960	2597	54	92,36
2016	6	1712	3033	395	201,22
2017	6	1554	3967	63	254,12
2018	9	221	484	101	206,20
2019	6	570	786	392	108,98
2020	4	500	643	415	108,98
2021	3	870	945	757	150,16
2022	4	1073	1171	907	103,93
Total	48	906	3967	54	175,24

Tabela 1 Distribuição do período de criopreservação, em dias, por ano em que foram descongeladas as unidades

#### 4.1. Caracterização microbiológica da amostra

Foi realizado um *screening* microbiológico em todas as unidades antes e após o processo de criopreservação.

Antes do processo de criopreservação, 39 das 48 USCU (81,25%) demonstraram serem estéreis, 5 USCU (10,41%) não apresentaram resultado registrado e 4 (8,33%) testaram positivo para 3 diferentes microrganismos: *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*.

Após o processo de descongelação, 40 USCU (83,33%) demonstraram serem estéreis, 4 USCU (8,33%) não apresentaram resultado registrado e as 4 USCU (8,33%) que anteriormente testaram positivo, voltaram a positivar para o mesmo microrganismo.

#### 4.2. Caracterização celular das USCU

Na tabela 2 pode observar-se a caracterização celular na totalidade da amostra e por cada ano, incluindo a diferença, em termos percentuais, entre os valores obtidos antes e após o processo de criopreservação.

Antes do processo de criopreservação, o valor mínimo de células totais nucleadas foi de  $30,12 \times 10^6$  células e o valor máximo foi de  $1851,74 \times 10^6$  células. A média do total das USCU foi de  $553,37 \pm 432,02 \times 10^6$  células.

Após a criopreservação, o valor de TNC mais baixo foi de  $8,6 \times 10^6$  células e o valor mais elevado foi de  $1333,50 \times 10^6$  células. A média do total das USCU foi de  $377,53 \pm 343,70 \times 10^6$  células.

Ano	n	Criopreservação (dias) média ± desvio padrão	Contagem de TNC (x106) pré criopreservação média±desvio padrão	Contagem de TNC (x106) pós criopreservação média ± desvio padrão	Diferença entre contagem de TNC pré e pós criopreservação (%) média	Contagem de CD34+ (x106) pré criopreservação média±desvio padrão	Contagem de CD34+ (x106) pós criopreservação média±desvio padrão	Diferença entre contagem de CD34+ pré e pós criopreservação (%) média±desvio padrão	Viabilidade celular (%) pós criopreservação média±desvio padrão
2015	10	960 ± 1139	384,09 ± 271,02	295,01 ± 244,99	23,19	0,78 ± 1,41	0,57 ± 1,08	27,23	93,52 ± 5,56
2016	6	1712,33 ± 1424,93	343,00 ± 284,96	234,44 ± 291,46	31,65	1,64 ± 3,55	1,32 ± 2,92	19,77	94,58 ± 3,24
2017	6	1554 ± 1869,72	348,71 ± 361,95	283,80 ± 345,42	18,62	0,80 ± 1,26	0,23 ± 0,45	70,75	75,18 ± 29,90
2018	9	221 ± 165,60	669,05 ± 491,88	217,86 ± 105,61	67,44	2,02 ± 2,19	0,14 ± 0,11	92,84	93,78 ± 8,26
2019	6	570 ± 169,62	737,22 ± 621,28	604,12 ± 516,85	18,05	1,24 ± 0,57	0,68 ± 0,46	45,09	97,43 ± 1,84
2020	4	500 ± 106,64	783,49 ± 364,39	686,84 ± 380,46	12,34	2,19 ± 1,74	1,39 ± 0,65	36,49	93,68 ± 6,78
2021	3	869,67 ± 99,40	919,70 ± 476,42	717,55 ± 451,09	21,98	1,95 ± 1,11	1,79 ± 1,07	8,05	94,86 ± 5,67
2022	4	1072,5 ± 120,01	558,26 ± 292,23	394,12 ± 266,27	29,40	1,23 ± 0,98	0,55 ± 0,35	55,60	75,98 ± 29,83
Total	48	906 ± 175,24	553,37 ± 432,02	377,53 ± 343,70	31,78	1,41 ± 1,82	0,70 ± 1,23	50,41	90,53 ± 15,41

Tabela 2 Distribuição das variáveis por ano

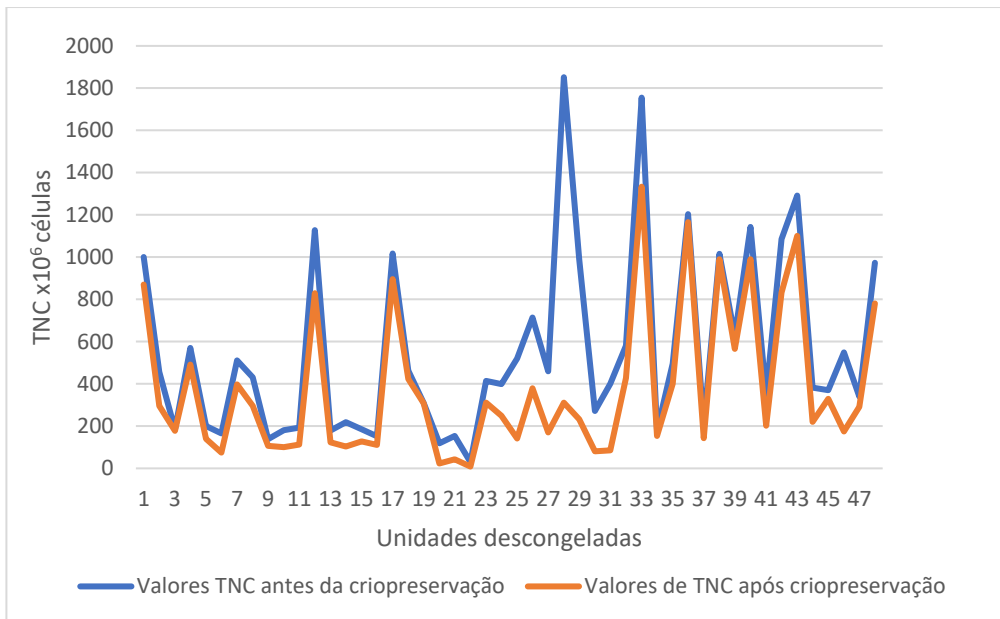


Gráfico 2 Valores de TNC antes e após o processo de criopreservação

É possível verificar que após o processo de criopreservação existiu uma diminuição, de forma global, de 31,78% na contagem de células totais nucleadas, apresentando uma média de 175,84 x 10<sup>6</sup> células e mediana de 112,53 x 10<sup>6</sup> células. (Tabela 2)

Esta diferença observada entre a contagem de TNC antes e após a criopreservação (gráfico 2) é estatisticamente significativa (tabela 3). Uma vez que estas variáveis não seguem a distribuição normal, foi aplicado o teste de Wilcoxon, como é possível observar na tabela 3.

Relativamente à contagem de células CD34+, antes do processo de criopreservação, o menor valor obtido foi de 0,03 x 10<sup>6</sup> células, e o maior valor registado foi de 8,86 x 10<sup>6</sup> células. A média do total das USCU foi de 1,41 ± 1,82 x 10<sup>6</sup> células.

Após a criopreservação, o menor valor foi de 0,01 x 10<sup>6</sup> células, e o maior valor foi de 7,26 x 10<sup>6</sup> células. A média do total das USCU foi de 0,70 ± 1,23 x 10<sup>6</sup> células.

Quanto à viabilidade celular das células CD34+, antes da criopreservação obteve-se uma média de 95,25 ± 10,02%, com o valor mínimo de 50% e máximo de 100%.

Teste da normalidade				Teste não paramétrico				
	Shapiro-Wilk			Teste de Wilcoxon				
	Estatística	n	Sig.	n	Estatística	Erro padrão	Estatística teste padronizado	Sig.
TNC antes	0,858	48	<,001	48	0,000	97,499	-6,031	<0,01
TNC após	0,830	48	<,001					
CD34+ antes	0,0725	48	<0,01	48	7,000	91,523	-5,829	<0,01
CD34+ após	0,567	48	<0,01					

*Tabela 3 Teste de normalidade Shapiro-Wilk e teste de Wilcoxon com valores de contagem celular de TNC e CD34+ antes e após a criopreservação*

É possível verificar que após o processo de criopreservação existiu também neste caso uma diminuição, de forma global, de 50,41% na contagem de células CD34+, com média de  $0,71 \times 10^6$  células e mediana de  $0,22 \times 10^6$  células. (Tabela 2). Esta diferença observada entre a contagem das células CD34+ antes e após a criopreservação (gráfico 3) é estatisticamente significativa, conforme se pode observar na tabela 3.

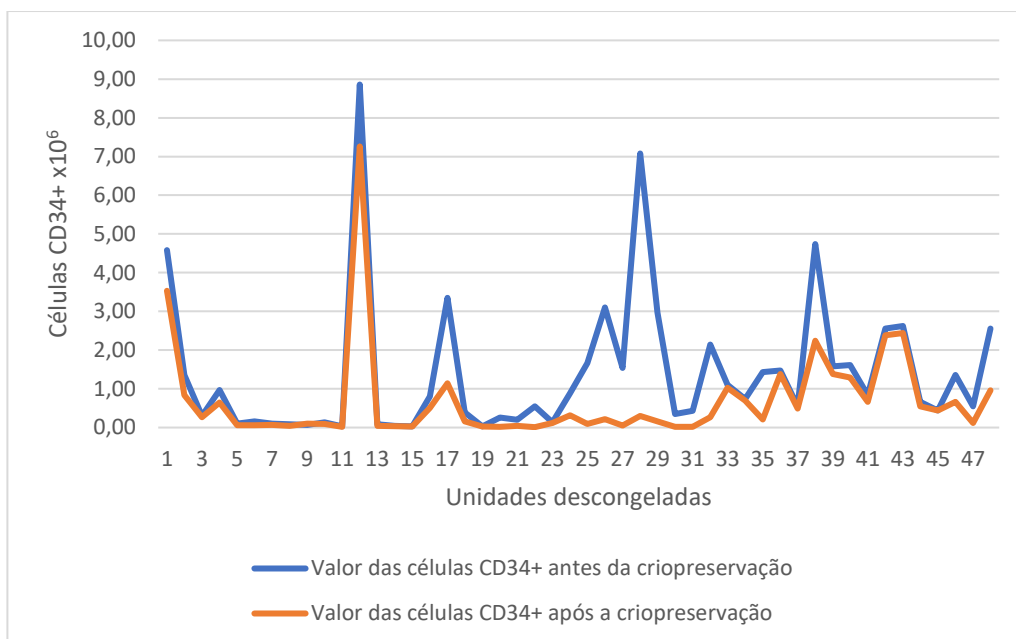


Gráfico 3 Valores das células CD34+ antes e após a criopreservação

Em relação à viabilidade celular total após a criopreservação obteve-se uma média total das USCU de  $90,53 \pm 15,41\%$ , com um valor mínimo de 27,78% e um valor máximo de 100%. (Tabela 2)

O último parâmetro avaliado foi o crescimento de unidades formadoras de colónias nas USCU após o processo de criopreservação e descongelação, sendo que 41 USCU (85,42%), apresentaram crescimento e 7 USCU (14,58%) não apresentaram resultado de crescimento de CFUs.

#### 4.3. Relação entre o tempo de criopreservação e TNC e células CD34+

De modo a comparar o tempo de criopreservação e as contagens celulares TNC e células CD34+ recuperadas, procedeu-se a uma análise estatística.

Inicialmente, foi realizado teste à normalidade da amostra. Como é possível observar na tabela 4, o valor de  $p < 0,01$ , indica que os dados não seguem uma distribuição normal.

<b>Teste de Normalidade</b>			
	<b>Shapiro-Wilk</b>		
	<b>Estatística</b>	<b>n</b>	<b>Sig.</b>
<b>Dias</b>	0,722	48	<,001
<b>Diferença TNC</b>	0,561	48	<,001
<b>Diferença CD34+</b>	0,615	48	<,001

*Tabela 4 Resultados do teste de normalidade*

Seguidamente, realizaram-se as correlações não paramétricas utilizando o coeficiente de correlação de Ró de Spearman entre o tempo de criopreservação e a diferença dos valores de TNC pré e pós criopreservação (tabela 5), e também do tempo de criopreservação e a diferença dos valores de CD34+ pré e pós criopreservação (tabela 6).

<b>Coefficiente de Correlação Ró de Spearman</b>			
		<b>Dias</b>	<b>TNC</b>
<b>Tempo de criopreservação (Dias)</b>	Coeficiente de Correlação	1,000	-0,313
	Sig. (2 extremidades)	.	0,030
	N	48	48
<b>Diferença TNC pré e pós criopreservação</b>	Coeficiente de Correlação	-0,313	1,000
	Sig. (2 extremidades)	0,030	.
	N	48	48

*Tabela 5 Resultados do coeficiente de correlação de Ró de Spearman (Tempo de criopreservação (dias) e diferença TNC pré e pós criopreservação)*

Coeficiente de Correlação Ró de Spearman			
		Dias	CD34+
<b>Tempo de criopreservação (Dias)</b>	Coeficiente de Correlação	1,000	-0,283
	Sig. (2 extremidades)	.	0,051
	N	48	48
<b>Diferença CD34+ pré e pós criopreservação</b>	Coeficiente de Correlação	-0,283	1,000
	Sig. (2 extremidades)	0,051	.
	N	48	48

*Tabela 6 Resultados do coeficiente de correlação Ró de Spearman (Tempo de criopreservação (Dias) e diferença CD34+ pré e pós criopreservação)*

Conforme se pode observar na Tabela 5, foi encontrada uma correlação negativa na comparação efetuada. A existência de correlação negativa indica que existe uma correlação inversa entre as duas variáveis, tempo de criopreservação e a contagem de TNC. No entanto, o valor da correlação é baixo.

Na Tabela 6 é possível observar que não existe correlação entre as variáveis analisadas, isto é, entre o tempo de criopreservação e a contagem de células CD34+.

## 5. Discussão

O sangue do cordão umbilical é uma fonte valiosa de células estaminais hematopoiéticas, células que podem ser usadas para transplante ou para diferentes fins no campo emergente da terapia celular. O SCU apresenta a grande vantagem de poder ser colhido e criopreservado durante anos, sem apresentar alterações significativas que comprometam a sua utilização. (67)

As unidades de sangue do cordão analisadas neste estudo foram armazenadas durante um período máximo de 3967 dias (10,85 anos), não se prevendo, de acordo com a literatura, alterações significativas na qualidade e potência das amostras após o processo de criopreservação. (54,55,68–71)

Embora a maioria dos estudos apontem neste sentido, existem estudo com resultados diferentes. (71,72) Broxmeyer *et al.* comparou a recuperação das TNC com o número de CFU-GEMM e CFU-GM, antes e após a criopreservação, e não encontrou diferenças significativas após a criopreservação de SCU até um máximo de 23,5 anos. (27,71,72) Yamamoto *et al.* reportou que a contagem de TNC, a contagem de CD34+ e o número de CFU-GM decresceram após criopreservação, no entanto, a recuperação da contagem de TNC, a contagem celular de CD34+ e o número de CFU-GM não alterou significativamente entre as unidades de SCU criopreservadas durante 1 mês e aquelas criopreservadas durante 10 anos. (54)

Para garantir que o processo de criopreservação ocorreu de forma linear, é necessária a análise de alguns parâmetros que permitem auferir sobre o sucesso do procedimento.

Neste estudo foram avaliados parâmetros antes do processo de criopreservação, como a contagem de TNC, contagem de células CD34+, viabilidade celular das CD34+ e a realização de *screening* microbiológico. Após o processo de criopreservação foram avaliados estes mesmos parâmetros, bem como a contagem de CFUs. Para este estudo, foram comparados e analisados estatisticamente os valores das contagens de células TNC, os valores da contagem das células CD34+ e foi analisado estatisticamente a correlação entre o tempo de criopreservação e a diferença desses valores.

No período analisado neste estudo, foram descongeladas no total 48 USCU. O número máximo de amostras descongeladas num ano foi de 10 USCU em 2015 e o número mínimo foi de 3 em 2021. Este número reduzido de amostras descongeladas em 2021 coincidiu com a mudança da direção clínica do Laboratório, no entanto esta diminuição deverá estar relacionada com as alterações que se fizeram sentir após a pandemia de SARS-CoV-2, tanto as alterações

socioeconómicas, como a diminuição da taxa de natalidade, o que conseqüentemente, levou a uma menor procura dos serviços oferecidos pelo laboratório. (73)

Um dos parâmetros a ter em consideração neste estudo foi o *screening* microbiológico, realizado antes e após a criopreservação. Este procedimento é considerado como um dos critérios indispensáveis para o armazenamento de sangue do cordão umbilical em bancos de armazenamento, de modo a evitar infecções microbiológicas para o futuro recetor. (36,74) De forma geral, as USCU que testarem positivo no *screening* microbiológico são rejeitadas não sendo armazenadas, no entanto, existem alguns estudos publicados em que foram transplantadas USCU contaminadas, uma vez que não se encontravam disponíveis outras opções compatíveis para esses recetores. (75–77) Estes recetores que receberam produtos de SCU contaminado não desenvolverem nem experienciaram nenhum sintoma clínico severo adverso após transplante. (75,76,78) Assim, neste caso as USCU contaminadas, presentes neste estudo, foram criopreservadas e analisadas. Os 3 microrganismos presentes nas 4 USCU (8,33%) – *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*, são microrganismos encontrados na flora comensal da pele humana (75,76,78,79), assim como na flora vaginal e do trato gastrointestinal (77,79), sendo que muito possivelmente estes microrganismos tiveram a sua origem da mãe, durante o parto.

As USCU podem ser criopreservadas durante anos em azoto líquido, até serem necessárias, e a sua qualidade deve permanecer minimamente inalterada. É, no entanto, esperado que se verifique uma diminuição dos valores em todos os parâmetros testados após o processo de criopreservação, uma vez que as células acabam por sofrer um leve dano celular inerente ao procedimento. (16, 17)

A contagem de TNC é considerada um parâmetro muito importante, uma vez que está associada com a rapidez, sucesso e sobrevivência do transplante de CEH. Assim sendo, a contagem destas células tem sido usada como um critério de seleção para as USCU. (80,81)

Neste estudo, a contagem de células totais nucleadas antes da criopreservação foi, em média,  $553,37 \pm 432,02 \times 10^6$  células, e após a criopreservação foi, em média,  $377,53 \pm 343,70 \times 10^6$  células, apresentando uma diminuição média de 31,78% após o processo de criopreservação. A diferença entre estes valores antes e após a criopreservação foi estatisticamente significativo. Estes valores cumprem com os critérios propostos pelo laboratório, sendo que antes da criopreservação se obteve sempre valores superiores a  $0,2 \times 10^6$  células totais nucleadas.

A contagem das células CD34+ também tem sido associado com a sobrevivência pós transplante e o desenvolvimento de GVHD, e juntamente com a contagem de TNC, apresenta-se como um importante critério na seleção de USCU. (32,82)

Os resultados obtidos neste estudo antes da criopreservação foram, em média,  $1,41 \pm 1,82 \times 10^6$  células e após a criopreservação foram, em média,  $0,70 \pm 1,23 \times 10^6$  células, exibindo uma diminuição média de 50,41%. A diferença é também estatisticamente significativa.

Uma mais alta qualidade das células criopreservadas está relacionada com uma percentagem mais alta de viabilidade celular total após a criopreservação, o que por sua vez, influencia o sucesso do resultado do transplante de células estaminais. (55)

Neste estudo, obteve-se uma viabilidade celular, em média, de  $90,53 \pm 15,41\%$ .

Os valores obtidos neste estudo para os parâmetros avaliados e descritos anteriormente apresentam-se entre o intervalo de valores encontrados em outros estudos realizados, com condições semelhantes a este. (68–70,83–85)

Kim *et al*, Anagnostakis *et al* e Yamamoto *et al* realizaram estudos nos quais comparam valores de TNC e células CD34+ antes e após a criopreservação e reportaram valores após a criopreservação para as células totais nucleadas entre  $330 \times 10^6$  e  $547 \times 10^6$  células e para as células CD34+ valores de  $0,66 \times 10^6$  células e  $1,02 \times 10^6$  células. (68,83,84)

Kudo *et al*, Kim G. *et al*, Rosenau *et al* e Yang *et al* também realizaram estudos semelhantes a este, no entanto obtiveram valores superiores, tanto de células TNC como de células CD34+. (69,70,85,86) No entanto, permitem validar e comparar a diminuição dos valores obtidos para os parâmetros avaliados neste estudo, sendo que estas distinções podem justificar-se pelas diferenças que existem nos protocolos, materiais e meios aplicados na criopreservação das USCU, assim como fatores como o tempo de criopreservação, condições de colheita, armazenamento e transporte. (44,61,86)

Relativamente à correlação entre o tempo de criopreservação e a diferença dos valores de células totais nucleadas e células CD34+ antes e após a criopreservação. Apenas se observou uma correlação inversa entre o tempo de criopreservação e a contagem de TNC, ou seja, quanto maior o tempo de criopreservação, menor a quantidade de células totais nucleadas presentes na amostra. Estes dados vão de encontro ao sustentado noutros estudos semelhantes. (68,69,83–85)

As contagens celulares de TNC, CD34+ e CFUs têm demonstrado ser relevantes medidores da potência associados com o sucesso de transplante de células estaminais hematopoiéticas

provenientes do SCU. Características que podem contribuir ou afetar a potência hematopoiética em intervalos de tempo definidos incluem 1) colheita e proficiência do método de processamento, volume e contagem celular; 2) método de criopreservação, proficiência, meios usados, volume, concentração e número e tipo de contentor; 3) condições e tempo de armazenamento e 4) método de descongelação, proficiência e meio usado. (70)

Para ser possível ter disponível mais sangue do cordão armazenado para transplantação, é prática comum dos bancos de criopreservação públicos descartarem USCU com baixas taxas de recuperação ou que não tenham conseguido atingir o número mínimo definido de células definidas pelo próprio banco. No entanto, isto não se aplica aos bancos de criopreservação privados, uma vez que o objetivo destes bancos é a criopreservação de SCU para potencial uso no futuro, especialmente em medicina regenerativa, independentemente da perda de células durante o processamento. (86)

Estudos sobre a qualidade das amostras de SCU e a sua correlação com o tempo de criopreservação devem ser continuados, assim como estudar a influência da duração da criopreservação na recuperação hematológica após transplante de células estaminais hematopoiéticas.

As variáveis não controladas neste estudo que podem ter condicionado estes resultados, incluem a falta de dados sobre a idade gestacional, o local de colheita, o tempo decorrido entre o parto e a colheita do sangue do cordão, temperatura e transporte das amostras, tempo decorrido entre a colheita e a entrega no laboratório. No entanto, foi confirmado que todos estes critérios foram cumpridos de acordo com o estipulado nos protocolos de qualidade e segurança, salvaguardando que existe sempre diferenças incontornáveis nos aspetos acima mencionados.

## **6. Conclusão**

A transfusão de componentes provenientes do sangue do cordão umbilical é um procedimento cada vez mais procurado e solicitado nas áreas da medicina regenerativa e terapia celular. A descoberta da capacidade regenerativa principalmente das células estaminais hematopoiéticas, foi um passo fundamental no desenvolvimento de técnicas de armazenamento e criopreservação de SCU. A preservação da qualidade e potência das células do SCU após a criopreservação é um importante e preocupante fator, e continua a ser alvo de interesse para diferentes estudos.

Este trabalho permitiu auferir sobre a qualidade das USCU selecionadas para criopreservação e posterior transplante de células estaminais hematopoiéticas na BebéVida. Os dados mostram que a qualidade das USCU, até um período máximo de 10 anos de criopreservação, foi mantida. Com estes resultados foi possível averiguar o impacto da criopreservação em células do sangue do cordão umbilical, assim como a efetividade do processo e dos protocolos utilizados, uma vez que os valores obtidos cumpriram os requisitos do laboratório e vão de encontro aos dados da literatura.

## Referências Bibliográficas

1. Carbone L, Cariati F, Sarno L, Conforti A, Bagnulo F, Strina I, et al. Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges. 2020; Available from: <https://doi.org/10.3390/genes12010015>
2. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. Vol. 2016, Stem Cells International. Hindawi Limited; 2016.
3. Spurway J, Logan P, Pak S. The development, structure and blood flow within the umbilical cord with particular reference to the venous system.
4. Lopez-Medina MD, López-Araque AB, Linares-Abad M, López-Medina IM. Umbilical cord separation time, predictors and healing complications in newborns with dry care. PLoS One. 2020 Jan 1;15(1).
5. Downey C I., Bewley S. Historical perspectives on umbilical cord clamping and neonatal transition. J R Soc Med. 2012;105(8):325–9.
6. Qian Y, Ying X, Wang P, Lu Z, Hua Y. Early versus delayed umbilical cord clamping on maternal and neonatal outcomes. Vol. 300, Archives of Gynecology and Obstetrics. Springer Verlag; 2019. p. 531–43.
7. Yu X, Gu Z, Wang Y, Wang H. New strategies in cord blood cells transplantation. Cell Biol Int. 2013 Sep 1;37(9):865–74.
8. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. 2008; Available from: [www.bloodjournal.org](http://www.bloodjournal.org)
9. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Vol. 95, Circulation Research. 2004. p. 9–20.
10. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities PII: S 0 0 4 7-6 3 7 4 ( 0 1 ) 0 0 2 2 4-X [Internet]. Vol. 122, Mechanisms of Ageing and Development. 2001. Available from: [www.elsevier.com/locate/mechagedev](http://www.elsevier.com/locate/mechagedev)
11. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood. 2004 Nov 1;104(9):2752–60.
12. Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T Cells and Their Role in Pregnancy. Vol. 63, American Journal of Reproductive Immunology. 2010. p. 445–59.

13. Micklethwaite KP, Savoldo B, Hanley PJ, Leen AM, Demmler-Harrison GJ, Cooper LJN, et al. Derivation of human T lymphocytes from cord blood and peripheral blood with antiviral and antileukemic specificity from a single culture as protection against infection and relapse after stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2695–703.
14. M C G Uckin\* CP, Orraz NF, Aradez MOB, Avran SN, Hao JZ, Rban RU, et al. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. 2005.
15. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. Vol. 69, *Journal of Neuroscience Research*. 2002. p. 880–93.
16. Newcomb JD, Willing AE, Sanberg PR. Umbilical cord blood cells. *Methods in Molecular Biology*. 2009;549:119–36.
17. Park DH, Borlongan C V., Willing AE, Eve DJ, Cruz LE, Sanberg CD, et al. Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia. In: *Cell Transplantation*. 2009. p. 985–98.
18. Human umbilical cord blood stem cells, myocardial infarction and stroke *Cardiovascular disease*.
19. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang ; Lei, Lu M, Willing AE, et al. Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Reduces Behavioral Deficits After Stroke in Rats [Internet]. 2001. Available from: <http://ahajournals.org>
20. Sanberg PR, Eve DJ, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Tan J, Sanberg CD, et al. The treatment of neurodegenerative disorders using umbilical cord blood and menstrual blood-derived stem cells. Vol. 20, *Cell Transplantation*. 2011. p. 85–94.
21. *Placental Blood Transplantation and Autologous Banking—Caveat Emptor*.
22. McKenna DH, Brunstein CG. Umbilical cord blood: Current status and future directions. Vol. 100, *Vox Sanguinis*. 2011. p. 150–62.
23. Arien-Zakay H, Lazarovici P, Nagler A. Tissue regeneration potential in human umbilical cord blood. Vol. 23, *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2010. p. 291–303.
24. Forraz N, Mcguckin CP. The umbilical cord: A rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif*. 2011 Apr;44(SUPPL. 1):60–9.
25. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. Vol. 122, *Blood*. American Society of Hematology; 2013. p. 491–8.
26. Broxmeyer HE, Douglas ¶ GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. Vol. 86, *Medical Sciences*. 1989.

27. Broxmeyer HE, Lee MR, Hangoc G, Cooper S, Prasain N, Kim YJ, et al. 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* [Internet]. 2011;117(18):4773–7. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/117/18/4773/1336206/zh801811004773.pdf>
28. Mayani H, Lansdorp PM. Biology of Human Umbilical Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells [Internet]. Vol. 16, Stem Cells. 1998. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/article/16/3/153/6391171>
29. Doan PL, Chao NJ. Umbilical cord blood: Biology and transplantation. Vol. 2, Expert Review of Hematology. 2009. p. 197–208.
30. Haematology E, Kendall K, Hows JM, Marsh JCW, Luft T, Coutinho L, et al. Growth of human umbilical-cord blood in longterm haemopoietic cultures ADDRESSES.
31. Healyqt L, May G, Gale K, Grosveldt F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. Vol. 92, Medical Sciences. 1995.
32. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Scott Baker K, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: Influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002 Sep 1;100(5):1611–8.
33. Li L, Godfrey WR, Porter SB, Ge Y, June CH, Blazar BR, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell lines from human cord blood have functional and molecular properties of T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(9):3068–73.
34. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, et al. Cord blood CD4 CD25-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. 2005;
35. McKenna DH, Brunstein CG. Umbilical cord blood: Current status and future directions. Vol. 100, *Vox Sanguinis*. 2011. p. 150–62.
36. Mayani H, Wagner JE, Broxmeyer HE. Cord blood research, banking, and transplantation: achievements, challenges, and perspectives. Vol. 55, *Bone Marrow Transplantation*. Springer Nature; 2020. p. 48–61.
37. Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, Vanherberghen B, Uhlin M. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. Vol. 17, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 691–9.

38. Herr AL, Kabbara N, Bonfim CMS, Teira P, Locatelli F, Tiedemann K, et al. Long-term follow-up and factors influencing outcomes after related HLA-identical cord blood transplantation for patients with malignancies: An analysis on behalf of Eurocord-EBMT. *Blood*. 2010 Sep 16;116(11):1849–56.
39. Wagner E, Broxmeyer HE, Byrd RL, Zehnbauer B, Schmeckpeper B, Shah N, et al. Transplantation of Umbilical Cord Blood After Myeloablative Therapy: Analysis of Engraftment.
40. Dessels C, Alessandrini M, Pepper MS. Factors Influencing the Umbilical Cord Blood Stem Cell Industry: An Evolving Treatment Landscape. Vol. 7, *Stem Cells Translational Medicine*. John Wiley and Sons Ltd.; 2018. p. 643–50.
41. Fasouliotis SJ, Schenker JG. Human umbilical cord blood banking and transplantation: a state of the art [Internet]. Vol. 90, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2000. Available from: [www.elsevier.com/locate/ejogrb](http://www.elsevier.com/locate/ejogrb)
42. The Era of Umbilical Cord Blood Transplantation and banking.
43. INTERNATIONAL STANDARDS FOR CORD BLOOD COLLECTION, BANKING, AND RELEASE FOR ADMINISTRATION Sixth Edition. 2016.
44. Hubel A, Carlquist D, Clay M, Mccullough J. Liquid storage, shipment, and cryopreservation of cord blood. Vol. 44, *Blackwell Science*. 2004.
45. Nikos Tsagias MD, Kokkona Kouzi-Koliakos MD P, Vassilios Karagiannis MD P, Daryoush Hamidi Alamdari MSc, George Koliakos MD P. Time and temperature before processing influence the recovery of umbilical cord blood hematopoietic progenitors. 2007.
46. Kurtz J, Seetharaman S, Greco N, Moroff G. Assessment of cord blood hematopoietic cell parameters before and after cryopreservation. *Transfusion (Paris)*. 2007 Sep;47(9):1578–87.
47. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, et al. Comparison of the effects of different cryoprotectants on stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Int*. 2016;2016.
48. Navarrete C, Contreras M. Cord blood banking: A historical perspective. Vol. 147, *British Journal of Haematology*. 2009. p. 236–45.
49. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: Guidelines for donor choice [Internet]. Vol. 32, *Experimental Hematology*. 2004. Available from: [www.netcord.org](http://www.netcord.org)

50. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: A single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2011 Sep;17(9):1362–74.
51. Rodrigues CA, Sanz G, Brunstein CG, Sanz J, Wagner JE, Renaud M, et al. Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: A study by the Eurocord-Netcord and Lymphoma Working Party of the European Group for blood and marrow transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Jan 10;27(2):256–63.
52. Schwandt S, Liedtke S, Kogler G. The influence of temperature treatment before cryopreservation on the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34+ and CD45+ cord blood cells. *Cytotherapy*. 2017 Aug 1;19(8):962–77.
53. Jahan S, Kaushal R, Pasha R, Pineault N. Current and Future Perspectives for the Cryopreservation of Cord Blood Stem Cells. Vol. 35, *Transfusion Medicine Reviews*. W.B. Saunders; 2021. p. 95–102.
54. Kim GH, Kwak J, Kim SH, Kim HJ, Hong HK, Jin HJ, et al. High integrity and fidelity of long-term cryopreserved umbilical cord blood for transplantation. *J Clin Med*. 2021 Jan 2;10(2):1–13.
55. Jaing TH, Chen SH, Wen YC, Chang TY, Yang YC, Tsay PK. Effects of Cryopreservation Duration on the Outcome of Single-Unit Cord Blood Transplantation. *Cell Transplant*. 2018 Mar 1;27(3):515–9.
56. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: A short review. Vol. 9, *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2018.
57. Querol S, Gomez SG, Pagliuca A, Torrabadella M, Madrigal JA. Quality rather than quantity: The cord blood bank dilemma. Vol. 45, *Bone Marrow Transplantation*. 2010. p. 970–8.
58. Shim JS, Cho B, Kim M, Park GS, Shin JC, Hwang HK, et al. Early apoptosis in CD34+ cells as a potential heterogeneity in quality of cryopreserved umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2006 Oct;135(2):210–3.
59. V-ur P/, Rall WF, Leibot ASP. Kinetics of Water Loss and the Likelihood of Intracellular Freezing in Mouse Ova Influence of the Method of Calculating the Temperature Dependence of Water Permeability.

60. Wagner E, Duval M, Dalle JH, Morin H, Bizier S, Champagne J, et al. Assessment of cord blood unit characteristics on the day of transplant: Comparison with data issued by cord blood banks. *Transfusion (Paris)*. 2006 Jul;46(7):1190–8.
61. Lee HR, Song EY, Shin S, Roh EY, Yoon JH, Kim BJ. Quality of cord blood cryopreserved for up to 5 years. *Blood Res*. 2014;49(1):54–60.
62. BD Biosciences. BD FACSCanto II A proven platform for maximum reliability and the highest quality results [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://www.bdbiosciences.com/en-pt>
63. Dhingra N, Safe Injection Global Network, World Health Organization. WHO guidelines on drawing blood : best practices in phlebotomy. 109 p.
64. Meios de cultura BACT/ALERT® [Internet]. [cited 2023 Sep 25]. Available from: <https://www.biomerieux.pt/produto/meios-de-cultura-bactalerr>
65. Biostor and OD Series [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://statebourne.info/>
66. MethoCult™ Methylcellulose–Based Media [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 23]. Available from: <https://www.stemcell.com/products/brands/methocult-hematopoietic-colony-assay.html>
67. Muñoz Alers SM, Page K, Simmons R, Waters–Pick B, Cheatham L, Troy JD, et al. Automated thawing increases recovery of colony–forming units from banked cord blood unit grafts. *Transfusion (Paris)*. 2018 Dec 1;58(12):2911–7.
68. Yamamoto S, Ikeda H, Toyama D, Hayashi M, Akiyama K, Suzuki M, et al. Quality of long–term cryopreserved umbilical cord blood units for hematopoietic cell transplantation. *Int J Hematol*. 2011 Jan;93(1):99–105.
69. Kim GH, Kwak J, Kim SH, Kim HJ, Hong HK, Jin HJ, et al. High integrity and fidelity of long–term cryopreserved umbilical cord blood for transplantation. *J Clin Med*. 2021 Jan 2;10(2):1–13.
70. Rosenau EH, Sugrue MW, Haller M, Fisk D, Kelly SS, Chang M, et al. Characteristics of thawed autologous umbilical cord blood. *Transfusion (Paris)*. 2012 Oct;52(10):2234–42.
71. Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High–efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years [Internet]. Vol. 100, PNAS. 2003. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0237086100](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0237086100)

72. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro R, RC, Gravest V, Yoder M, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. Vol. 89, Medical Sciences. 1992.
73. Pomar L, Favre G, de Labrusse C, Contier A, Boulvain M, Baud D. Impact of the first wave of the COVID-19 pandemic on birth rates in Europe: a time series analysis in 24 countries. *Human Reproduction*. 2022 Dec 1;37(12):2921–31.
74. Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: An update. *J Assist Reprod Genet*. 2011 Aug;28(8):669–76.
75. Patah PA, Parmar S, McMannis J, Sadeghi T, Karandish S, Rondon G, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell products: Clinical outcome. Vol. 40, *Bone Marrow Transplantation*. 2007. p. 365–8.
76. Kamble R, Pant S, Selby GB, Kharfan-Dabaja MA, Sethi S, Kratochvil K, et al. Microbial contamination of hematopoietic progenitor cell grafts - Incidence, clinical outcome, and cost-effectiveness: An analysis of 735 grafts. *Transfusion (Paris)*. 2005 Jun;45(6):874–8.
77. Schwella N, Rick O, Heuft HG, Miksits K, Zimmermann R, Zingsem J, et al. Bacterial contamination of Autologous bone marrow: reinfusion of culture-positive grafts does not result in clinical sequelae during the posttransplantation course.
78. Li M, Lim D, Tang KF, Lim S, Boey K. Microbial Contamination in Umbilical Cord Blood: A Comparison Before and After Cryopreservation. *Stem Cells Transl Med*. 2018 Sep 1;7(S1):S2–S2.
79. Clark P, Trickett A, Stark D, Vowels M. Factors affecting microbial contamination rate of cord blood collected for transplantation. *Transfusion (Paris)*. 2012 Aug;52(8):1770–7.
80. Ballen K, Broxmeyer HE, McCullough J, Piaciabello W, Rebullia P, Verfaillie CM, et al. Current Status of Cord Blood Banking and Transplantation in the United States and Europe. 2001.
81. Liane E, Luckman G, Ocha AR, Gnès B Oyer –C Hammard A, Ranco F, Ocatelli L, et al. Volume 337 Number 6 373 OUTCOME OF CORD-BLOOD TRANSPLANTATION FROM RELATED AND UNRELATED DONORS OUTCOME OF CORD-BLOOD TRANSPLANTATION FROM RELATED AND UNRELATED DONORS A BSTRACT Background Cord-blood banks have increased the. 1997.
82. Schmitz N, Barrett J. Optimizing engraftment - Source and dose of stem cells. *Semin Hematol*. 2002;39(1):3–14.

83. Kim KM, Huh JY, Hong SS, Kang MS. Assessment of cell viability, early apoptosis, and hematopoietic potential in umbilical cord blood units after storage. *Transfusion (Paris)*. 2015 Aug 1;55(8):2017–22.
84. Anagnostakis I, Papassavas AC, Michalopoulos E, Chatzistamatiou T, Andriopoulou S, Tsakris A, et al. Successful short-term cryopreservation of volume-reduced cord blood units in a cryogenic mechanical freezer: Effects on cell recovery, viability, and clonogenic potential. *Transfusion (Paris)*. 2014 Jan;54(1):211–23.
85. Kudo Y, Minegishi M, Seki O, Takahashi H, Suzuki A, Narita A, et al. Quality assessment of umbilical cord blood units at the time of transplantation. *Int J Hematol*. 2011;93(5):645–51.
86. Yang H, Loutfy MR, Mayerhofer S, Shuen P. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation. *Transfusion (Paris)*. 2011 Feb;51(2):284–92.