

Proposta de Metodologia de Controle de Qualidade para Bancos de Sangue de Cordão umbilical e Placentário Utilizando uma Combinação de Plataforma Accuri e Ensaio Clonogênico: Análise Preliminar

Lira, C.C.P.¹, Motta, J.P.R.¹, Bouzas, L.F.¹, Paraguassú-Braga, F.H.¹

(1) Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP), Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

A utilização de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) como fonte de células tronco hematopoéticas (CTH) para transplante tem aumentado consideravelmente desde o primeiro transplante de SCUP bem sucedido, realizado há 20 anos. Este fato pode ser atribuído a: uma melhora na gestão clínica, o que levou a uma evolução na seleção de pacientes; ao desenvolvimento de técnicas e protocolos clínicos e laboratoriais, e principalmente ao aumento do número de unidades de SCUP oferecidas, através da criopreservação e estocagem em bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP). Entretanto, a qualidade das CTH de unidade de SCUP tem se tornado uma questão de extrema relevância para os BSCUP, pois a potencialidade das células pode ser afetada, dependendo da temperatura e velocidade da adição do crioprotetor ou durante a estocagem da unidade de SCUP em nitrogênio líquido. A literatura relata que o sucesso do enxerto e sobrevivência do paciente após o transplante de SCUP depende do número de células nucleadas total (CNT) ou do número de células CD34+ por quilo de peso do paciente. Tem sido mostrado que até a presente data, a maneira mais segura de quantificar células CD34+ por citometria de fluxo é através do protocolo ISHAGE. É o número de células CD34+ viáveis está diretamente relacionado ao potencial clonogênico das CTHs. Através de determinadas metodologias como, ensaios clonogênicos e especialmente a citometria de fluxo é possível avaliar o potencial das CTHs de unidades de SCUP, pós o descongelamento, assegurando um controle de qualidade final da unidade antes do transplante.

OBJETIVO

Apresentar uma proposta de metodologia de controle de qualidade de SCUP criopreservado, associando duas técnicas: citometria de fluxo, através da plataforma Accuri, e ensaio clonogênico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas amostras de segmentos de 5 unidades de SCUP criopreservadas e armazenadas em nitrogênio líquido pelo sistema de bioarquivo. Os segmentos foram descongelados através de imersão em banho Maria a 37°C. Do volume total adquirido de cada segmento, aproximadamente 200µl, foram realizados ensaios por citometria de fluxo e ensaios clonogênicos. No ensaio por citometria de fluxo, foi aplicado o protocolo ISHAGE, modificado pela adição do 7-AAD, para a quantificação de CTHs viáveis, utilizado o equipamento Accuri C6, Accuri Cytometer, figura 1.

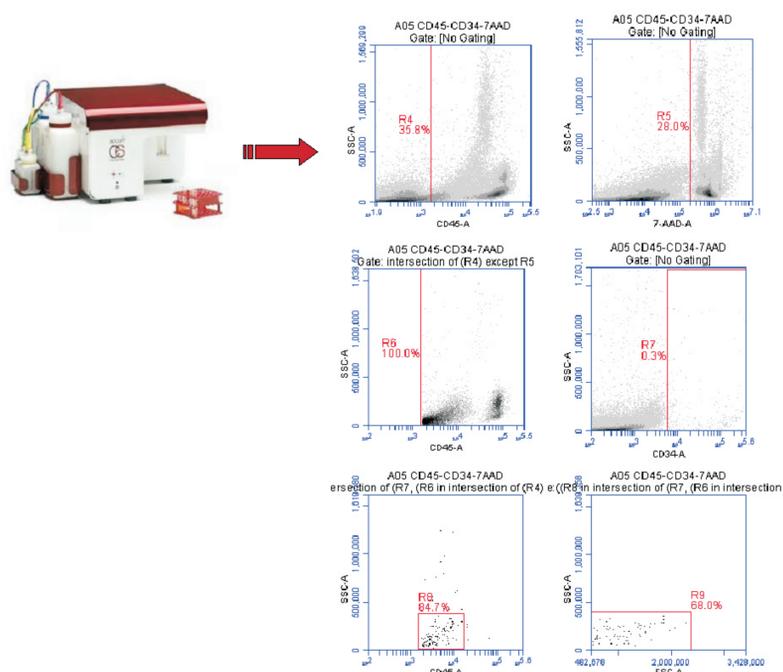


Figura 1. Aquisição e análise de células CTH, utilizando protocolo ISHAGE, modificado através da adição de 7-AAD, através plataforma Accuri. Plot A: seleção de células CD45+ (R4). Plot B: seleção de células CD45+7-AAD+ (R5). Plot C: células CD45+ (R4) excluindo as células CD45+7-AAD+ (R5). Plot D: seleção de células CD34+ (R7). Plot E: células CD34+7-AAD- selecionadas através da expressão do CD45 (R8). Plot F: células CD45+CD34+7-AAD- selecionadas através do tamanho e complexidade (R9).

Para o ensaio clonogênico foi utilizado o meio de cultura metilcelulose H4035 (Stem cell Technologies, Vancouver, BC, Canada), seguindo o protocolo da Stem cell Technologies, como ilustrado na figura 2. As colônias foram identificadas e contadas após 14 dias de cultura, como segue o protocolo

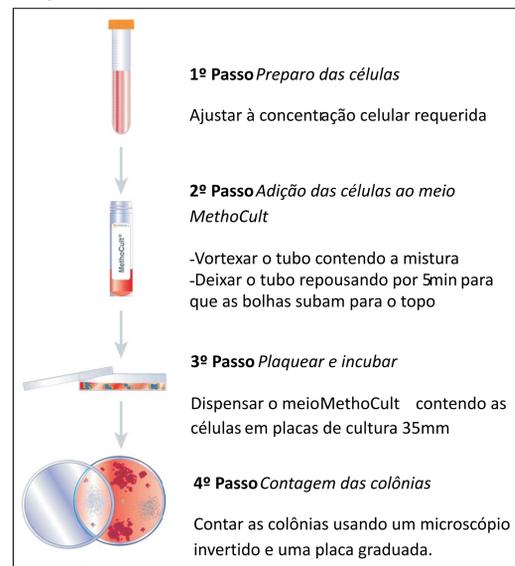


Figura 2. Protocolo para ensaio clonogênico, segundo Stem Cell Technologies

RESULTADOS

Das 5 amostras de SCUP estudadas, no pós-descongelamento, foi possível determinar por citometria de fluxo, utilizando plataforma Accuri, tanto o número de CNTs viáveis, como o percentual de viabilidade das células mononucleares (CMN), células CD34+ e células CD45+, mostrado através de uma análise estatística descritiva, representado por média e desvio padrão, mediana e variação dos valores entre mínimo e máximo, como observado na tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade das unidades de SCUP pós-descongelamento.

	Média ± DP	Mediana	Varição
CD34 ⁺ /CD45 ⁺ /7-AAD ⁻ (cels/mm ³)	8,8 ± 7,4	5,2	1,7 - 19,9
% Células CD45 ⁺ /CD34 ⁺ /7-AAD ⁻	0,8 ± 0,7	0,4	0,2 - 1,6
% Células mononucleadas	97,4 ± 1,8	97,7	94,3 - 99,1
% Células CD45 ⁺ /7-AAD ⁻	15,7 ± 5,1	13,2	11,2 - 23,6
% Viabilidade CD45 ⁺ total	22,9 ± 3,6	10,1	9,4 - 17,5
% Viabilidade CD34 ⁺ total	50,7 ± 26,4	49,9	19,3 - 83,7

Através do ensaio clonogênico, as colônias foram identificadas e quantificadas em cada uma das amostras, onde foi observada uma frequência maior de CFU-GM em relação à CFU-M, mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Análise estatística descritiva do número de colônias.

	Média ± DP	Mediana	Varição
CFU-GM	16,3 ± 18,7	15	0,5 - 46,5
CFU-M	7,9 ± 7,3	7	0,5 - 19,5

O potencial das CTH pôde ser avaliado através de análise da eficiência clonogênica (ECLONE), que se baseia na correlação entre os números de CFU e de células CD34+ total. Isto significa que para um determinado número de células CD34+, um número definido de CFUs é esperado. Neste estudo, foi considerado as medias dos valores de CFU-GM (x105) e células CD34+ total viável (x105) das amostras para análise da eficiência clonogênica. Portanto, considerando o pequeno número de amostras estudadas, o valor do ECLONE correspondeu a 3,7x10⁻³ CFU-GM/CD34.

CONCLUSÃO

A correlação entre os valores de CFU e células CD34+ tem sido descrito como um bom preditor na recuperação de plaquetas e granulócitos após transplante de CTH. Entretanto, para a aplicação prática destes parâmetros, ensaio clonogênico e técnicas de citometria de fluxo em amostras descongeladas precisam ser cuidadosamente padronizados. Através deste estudo preliminar foi possível observar que o equipamento Accuri C6, que é um aparelho compacto e de fácil manuseio, mostrou ser eficaz em sua utilização como plataforma única para quantificação de células CD34+ e análise de viabilidade celular. É associado ao ensaio clonogênico, seguindo o protocolo Stem cell Technologies, demonstrou podermos sugerir a sua utilização como uma metodologia eficiente para controle de qualidade de unidades de SCUPs criopreservadas.