

Míriam Cristina Rodrigues Barbosa

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS, CÉLULAS
NATURAL KILLER, CÉLULAS DENDRÍTICAS E MONÓCITOS EM
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

**São Paulo
2017**

Míriam Cristina Rodrigues Barbosa

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS, CÉLULAS
NATURAL KILLER, CÉLULAS DENDRÍTICAS E MONÓCITOS EM
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues

Coorientador:

Dr. Matheus Vescovi Gonçalves

**SÃO PAULO
2017**

Barbosa, Míriam Cristina Rodrigues

Estudo das subpopulações de linfócitos, células *natural killer*, células dendríticas e monócitos em sangue de cordão umbilical e placentário /

Míriam Cristina Rodrigues Barbosa. - São Paulo, 2017.

xv, 57f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia.

Título em inglês: Umbilical cord blood lymphocytes, NK cells, dendritic cells and monocytes subsets.

1. Sangue de cordão umbilical e placentário. 2. Células dendríticas. 3. Células *natural killer*. 4. Monócitos. 5. Transplante de células progenitoras hematopoéticas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ONCOLOGIA CLÍNICA E EXPERIMENTAL
DISCIPLINA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Otávio Baiocchi

Coordenadora do programa de Pós-graduação:

Profa. Dra. Maria Stella Figueiredo

Míriam Cristina Rodrigues Barbosa

**ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS, CÉLULAS
NATURAL KILLER, CÉLULAS DENDRÍTICAS E MONÓCITOS EM
SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO.**

Banca Examinadora

Membros

Dr. Alex Freire Sandes

Dr. Alfredo Mendrone Júnior

Profª Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

Membro Suplente:

Prof. Dr. Edgar Gil Rizzatti

À minha família e meu esposo Ezequiel pelo incentivo, apoio e principalmente por todo amor dedicado.

Esse trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro da FAPESP, processo número
2012/11730-7.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues, por me receber como aluna, pelo tempo dedicado, pela paciência e por todo ensinamento passado.

Ao Dr. Matheus Vescovi, pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos, dicas e pela amizade.

À Profa. Dra. Mihoko Yamamoto, pela grande colaboração, pelo acolhimento, e pelos ensinamentos passados através de seu exemplo de ética.

À Eliza Kimura e Fábio Guirao, pelo apoio técnico.

Ao Dr. Alfredo Mendrone Jr. e à Dra. Cyntia Arrais, do Banco de Sangue de Cordão do Hospital Sírio Libanês, pela parceria no projeto ao cederem amostras de seu serviço.

À equipe do Banco de Sangue de Cordão do Hospital Sírio Libanês, em especial à Carla, Karine, Regiane e Cida, pela enorme colaboração e por serem sempre tão gentis e prestativas.

À Maria Helena, secretária da pós-graduação, pela colaboração com as questões burocráticas.

Aos meus pais, Cida e Elvio, por todo amor e dedicação para a minha formação. Aos meus irmãos Natália e Felipe, meus sobrinhos João Victor e Guilherme, pelo imenso amor acolhedor em todas as horas.

Ao Ezequiel, esposo amado, pelo amor e companhia diária.

À Mariane, mais que amiga, que sempre me incentivou e com quem pude compartilhar todos os momentos dessa jornada.

Às amigas Carla e Flaviane, parceiras para toda vida, pelo incentivo e pela amizade que torna a vida mais leve.

“Sei o que devo ser e ainda não sou, mas rendo graças a Deus por estar trabalhando, embora lentamente, por dentro de mim próprio, para chegar, um dia, a ser o que devo ser.”
(Chico Xavier)

Sumário

Agradecimentos	vii
Lista de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo	xiv
Abstract	xv
1 – INTRODUÇÃO	2
1.1 Sangue de cordão umbilical e placentário	2
1.1.1 Vantagens do sangue de cordão umbilical e placentário sobre outras fontes de CPH	4
1.1.2 Desvantagens do Sangue de Cordão Umbilical e Placentário	5
1.2 Bancos de sangue de cordão umbilical e placentário	5
1.3 Células dendríticas	6
1.3.1 Células dendríticas no TCPH	9
1.4 Células natural killer	9
1.4.1 Células natural killer no TCPH	10
1.5 Monócitos	11
1.6 Distribuição de subpopulações de leucócitos no SCUP	12
2 – OBJETIVOS	15
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Amostras	17
3.2 Contagem de leucócitos	18
3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica	18
3.4 Identificação das populações celulares	20
3.5 Análise dos Resultados – Estatística	24
4 – RESULTADOS	26
4.1 Valores absolutos das subpopulações	26
4.1.1 Leucócitos totais e granulócitos	26
4.1.2 Monócitos	26
4.1.3 Linfócitos	26
4.1.4 Linfócitos T	27
4.1.5 Células CD3+/CD56+	27
4.1.6 Linfócitos B	27
4.1.7 Células NK	27
4.1.8 Células dendríticas	28
4.2 Distribuição das subpopulações	33
4.2.1 Subpopulações de linfócitos/células NK	33

4.2.2	Subpopulações de linfócitos T	33
4.2.3	Subpopulações de células NK	34
4.2.4	Subpopulações de monócitos	35
4.2.5	Subpopulações de células dendríticas	36
5	– DISCUSSÃO	40
6	– CONCLUSÕES	47
7	– REFERÊNCIAS	49

Anexos

Carta de aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo

Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital Sírio Libanês

Termo de consentimento livre e esclarecido

Solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido do Hospital Sírio Libanês

Bibliografia consultada

Lista de figuras

Figura 1 - Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação das células dendríticas.....	22
Figura 2 – Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação dos monócitos.....	23
Figura 3 – Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação das células <i>natural killer</i>	24
Figura 4 – Representação gráfica dos valores absolutos de subpopulações de leucócitos totais, granulócitos e monócitos encontrados no SPA e no SCUP.....	30
Figura 5 – Representação gráfica dos valores absolutos de subpopulações de linfócitos totais e linfócitos T encontrados no SPA e no SCUP.....	31
Figura 6 – Representação gráfica dos valores absolutos das subpopulações de linfócitos B, células NK, células CD3+/CD56+ e células dendríticas encontrados no SPA e no SCUP.....	32
Figura 7 – Representação gráfica da distribuição dos linfócitos T, B e células NK no SPA e no SCUP.....	33
Figura 8 – Representação gráfica da distribuição das subpopulações de linfócitos T no SPA e no SCUP.....	34
Figura 9 – Representação gráfica da distribuição das subpopulações de células NK no SPA e no SCUP.....	34
Figura 10 – Representação gráfica da distribuição das subpopulações de monócitos no SPA e no SCUP.....	35
Figura 11 – Representação gráfica da distribuição das subpopulações de células dendríticas no SPA e no SCUP.....	36
Figura 12 – Representação gráfica das razões entre subpopulações de leucócitos encontradas no SPA e SCUP.....	38

Lista de abreviaturas

AcMo	Anticorpos monoclonais
APC	Aloficocianina
APCs	Células apresentadoras de antígenos
APC-H7	Aloficocianina H7
BSCUP	Banco de sangue de cordão umbilical e placentário
CFU-GEMM	Unidades formadoras de colônias para granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos
CPH	Células progenitoras hematopoéticas
DCs	Células dendríticas
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GVHD	<i>Graft versus host disease</i> – doença do enxerto contra o hospedeiro
GVL	<i>Graft versus leukemia</i> – enxerto contra leucemia
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> - Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina γ
IgM	Imunoglobulina μ
IL	Interleucina
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
mDC	Células dendríticas mieloides
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> - complexo maior de

	histocompatibilidade
NK	<i>Natural killer</i>
OC-515	Orange Cytognos 515
PB	Pacific blue
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato salino
PC7	R-ficoeritrina cianina 7
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PE	Ficoeritrina
PerCPCy5.5	Peridina clorofila cianina 5.5
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
SCUP	Sangue de cordão umbilical e placentário
TCPH	Transplante de células progenitoras hematopoéticas
TCR	Receptor de células T
Th	T helper
TLR	Receptor do tipo Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T regulatória

Resumo

Introdução: O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) é fonte alternativa de células para transplante alogênico de células progenitoras hematopoéticas na indisponibilidade de doador compatível. O transplante de SCUP apresenta menor incidência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) crônica, mas apresenta enxertia mais tardia e reconstituição imune mais lenta. As células dendríticas (DCs) e as células NK têm papel central no desenvolvimento da DECH, no efeito enxerto contra leucemia e no combate às infecções pós-transplante. **Objetivos:** Caracterizar a distribuição dos linfócitos, células NK, DCs e monócitos de SCUP, e compará-la com a de sangue periférico (SP) de adultos normais (SPA). **Materiais e métodos:** Foram quantificados por citometria de fluxo multiparamétrica em material fresco de 54 SCUP de recém-nascidos saudáveis a termo e 25 SP de adultos saudáveis as seguintes populações: linfócitos B (CD19+); linfócitos T (CD3+; subpopulações: CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD4-CD8- e células CD3+/CD56+; células NK (CD56+CD3-; subpopulações NK CD56++CD16- e NK CD56+CD16+) e DCs [linhagem negativa, HLA-DR+; subpopulações: CD123+ CD11c- (DC plasmocitóide-pDC), CD123- CD11c+ (DC mielóide-mDC)]. Também foram analisados os compartimentos de monócitos (monócitos clássicos CD14+ CD16-; intermediários CD14+ CD16+ e não clássicos CD14-/fraco CD16++). **Resultados:** A população de linfócitos T e subpopulações CD4 e CD8 apresentaram-se em quantidades similares no SCUP e no SPA (mediana do SCUP vs. do SPA, em células/mm³; CD4: 1106 vs. 937; CD8: 449 vs. 451), enquanto as subpopulações CD4+CD8+ e CD4-CD8- estão diminuídas no SCUP (SCUP vs. SPA; CD4+CD8+: 1,1 vs. 5,7, $p=0,001$; CD4-CD8-: 39 vs. 54, $p=0,005$). São maiores no SCUP as populações de linfócitos B (SCUP vs. SPA: 434 vs. 228, $p<0,001$), de células NK CD56++CD16- (25 vs. 13, $p<0,001$) e NK CD56+CD16+ (446 vs. 259, $p=0,001$), e de pDC (SCUP vs. SPA: 8,3 vs. 6,2, $p=0,03$). Já a subpopulação mDC está em quantidades similares nos dois grupos (SCUP vs. SPA: 15 vs. 18). Enquanto os monócitos clássicos e intermediários estão em quantidades maiores no SCUP (SCUP vs. SPA, monócitos clássicos: 897 vs. 318, $p<0,001$; monócitos intermediários: 74 vs. 41, $p<0,001$), os monócitos não clássicos estão em quantidades menores (SCUP vs. SPA, 25 vs. 51, $p<0,001$), mostrando a menor diferenciação da população monocítica no SCUP. **Conclusões:** Há diferenças significativas na quantidade de diversas populações celulares entre SCUP e SP adulto. A menor quantidade de monócitos não clássicos (células pró-inflamatórias) e a maior quantidade de DCs plasmocitoides (células com função tolerogênica) podem explicar, em parte, a menor incidência/gravidade de DECH crônica nos transplantes de SCUP. Por outro lado, a maior quantidade de células NK pode possivelmente contribuir para o efeito enxerto contra leucemia.

Abstract

Background: Umbilical cord blood (UCB) is an alternative source of hematopoietic stem cells for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the absence of a compatible donor. UCB transplantation has a lower incidence of chronic graft versus host disease (GVHD), but is associated with slower engraftment and slower immune reconstitution. Dendritic cells (DCs) and NK cells play a central role in the development of GVHD, the graft versus leukemia (GVL) effect, and in the control of infectious complications. **Aims:** To characterize the immunophenotype and the distribution of lymphocytes, NK cells, DCs and monocytes from UCB, and to compare them with normal adult peripheral blood (APB). **Materials and Methods:** The following subsets were quantified by multiparametric flow cytometry in samples from 54 UCBs and 25 APB: B-lymphocytes (CD19+), T lymphocytes (CD3+, subsets: CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD4-CD8- and CD3+/CD56+ cells), NK cells (CD56+ CD3-, subsets: NK CD56++CD16- and NK CD56+CD16+) and DCs [negative lineage, HLA-DR+; subsets: CD123+ CD11c- (plasmacytoid DC - pDC), CD123- CD11c+ (myeloid DC - mDC)]. Monocyte compartments (classical monocytes CD14+ CD16-, intermediate CD14+ CD16+ and non-classical CD14-/low CD16+) were also analyzed. **Results:** The T-cells population and the CD4 and CD8 subsets were similar between UCB and APB (median UCB vs. APB, in cells/mm³, CD4: 1106 vs. 937, CD8: 449 vs. 451), while the CD4+CD8+ and CD4-CD8- subsets are smaller in UCB (UCB vs. APB; CD4+CD8+: 1.1 vs. 5.7, p=0.001; CD4-CD8-: 39 vs. 54, p=0.005). The UCB had higher counts of B-cells (SCUP vs. SP: 434 vs. 228, p<0.001), NK CD56++CD16- (25 vs. 13, p<0.001), NK CD56+CD16+ (446 vs. 259, p=0.001) and pDC (SCUP vs. SP: 8.3 vs. 6.2, p=0.03). The mDC subpopulation was similar in both groups (UCB vs. APB: 15 vs. 18, p: non-significant). While UCB had higher counts of classical and intermediate monocytes (UCB vs. APB, classical monocytes: 897 vs. 318, p<0.001, intermediate monocytes: 74 vs. 41, p<0.001), APB had higher counts of non-classical monocytes (UCB vs. APB, 25 vs. 51, p<0.001), suggesting less differentiation of the monocytic population in the UCB. **Conclusions:** There were significant differences in the number of different cell populations between SCUP and APB. Lower counts of non-classical monocytes (pro-inflammatory cells) and higher counts of plasmacytoid DCs (cells with tolerogenic function) may explain, in part, the lower incidence / severity of chronic GVHD in UCB transplants. On the other hand, higher counts of NK cells may possibly contribute to the GVL effect.

1. INTRODUÇÃO

1 – INTRODUÇÃO

O transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) é uma modalidade terapêutica já bem estabelecida utilizada no tratamento de inúmeras doenças hematológicas, imunológicas e oncológicas. Consiste na substituição de uma medula óssea doente, ou deficitária, por células normais de medula óssea, com o objetivo de reconstituição de uma nova medula. Para diversas doenças, representa a única terapêutica curativa (Copelan, 2006).

Em 1956, nos Estados Unidos, o Dr. E. Donnall Thomas e seu grupo começaram a realizar os primeiros TCPH alogênicos em pacientes com leucemia. Após altas doses de irradiação corporal total, os pacientes recebiam células da medula óssea de um irmão. Em 1990, o Dr. Thomas recebeu o prêmio Nobel de Medicina pelo seu trabalho pioneiro (Appelbaum, 2007).

As células progenitoras hematopoéticas (CPH) utilizadas para transplante podem ser obtidas diretamente da medula, através da punção das cristas ilíacas; do sangue periférico (SP), quando as CPH são mobilizadas da medula por meio de fator de crescimento hematopoético e coletadas com máquina de aférese; ou, mais recentemente, do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) (Rocha, 2016).

1.1 Sangue de cordão umbilical e placentário

O SCUP é o sangue que permanece na placenta e na veia umbilical após o parto.

A hematopoese humana inicia-se no período embrionário e passa por três fases. Inicialmente, ocorre no saco vitelínico. Posteriormente, as CPH migram para o fígado e baço fetais, e finalmente para a medula óssea. No recém-nascido, parte das CPH ainda não migraram para a medula óssea, podendo ser encontradas no sangue circulante (Lorenzi, 2006).

A descoberta de que o SCUP contém CPH se deu no início dos anos 80. Pesquisadores demonstraram em cultura celular o crescimento de colônias de células de SCUP que se auto renovavam e se mostraram mais primitivas que as CFU-GEMM (unidades formadoras de colônias para granulócitos, eritrócitos,

monócitos e megacariócitos) (Nakahata e Ogawa, 1982). Outro estudo, de 1984, mostrou que colônias celulares multilinhagem poderiam se originar de uma única célula mais primitiva no SCUP (Leary et al., 1984).

A partir destas descobertas, pensou-se na possibilidade de utilizar o SCUP como alternativa à medula óssea na realização do TCPH. Broxmeyer et al., em artigo publicado em 1989, demonstraram que o SCUP contém CPH em quantidades comparáveis com a medula óssea, suficientes para recuperar a função hematopoética em pacientes submetidos à mieloablação (Broxmeyer et al., 1989).

Pouco tempo depois surgiu o primeiro relato de uso de células de SCUP humano em transplante, em 1989, realizado pela doutora Eliane Gluckman, em Paris (Gluckman et al., 1989). A partir daí o SCUP vem sendo amplamente utilizado, principalmente nos transplantes alogênicos não aparentados, deixando de ser apenas um material para descarte após o parto do bebê (Gluckman, 2009).

Estudos demonstraram a viabilidade das CPH de SCUP após quinze anos de criopreservação à temperatura de -180° C. Broxmeyer et al. (2003) avaliaram a capacidade de recuperação de células progenitoras hematopoéticas de SCUP criopreservado, através da comparação do número de células obtidas em cultura celular antes do congelamento e após o descongelamento, quinze anos depois. Os pesquisadores testaram também a capacidade destas células de reconstituir a hematopoese em ratos radicalmente imunossuprimidos. Os resultados encontrados demonstraram que as células obtidas em cultura mantinham as capacidades proliferativas, de auto-renovação e de expansão *ex vivo* e eram capazes de promover enxertia em ratos imunossuprimidos, após quinze anos de armazenamento. Estes dados sugerem que o SCUP pode ser armazenado por pelo menos quinze anos, mantendo as capacidades proliferativas necessárias para um transplante de CPH bem-sucedido em humanos.

1.1.1 Vantagens do sangue de cordão umbilical e placentário sobre outras fontes de CPH

A utilização do SCUP para realização de TCPH apresenta muitas vantagens em relação à medula óssea ou ao SP.

A ocorrência de DECH (doença do enxerto contra o hospedeiro, do inglês GVHD – *graft-versus-host-disease*) em pacientes submetidos ao TCPH com sangue de cordão, em especial na sua forma crônica, é menor do que naqueles pacientes que recebem medula óssea ou SP mobilizado. E quando ocorre, a gravidade tem sido menor. Tal fato é atribuído à imaturidade das CPH e dos linfócitos do SCUP (Narimatsu et al., 2008; Gluckman e Rocha, 2009).

Uma vez que as células progenitoras de cordão umbilical desencadeiam menos DECH, há uma maior flexibilidade quanto à compatibilidade HLA (*human leukocyte antigen* - antígeno leucocitário humano) (Barker et al., 2010), o que amplia as chances de se encontrar doador compatível. Além disso, a incidência de citomegalovírus e outras infecções transmissíveis pelo sangue é menor (Rocha e Locatelli, 2008). Em relação ao doador, a obtenção dessas células é um procedimento simples que não oferece riscos à mãe ou ao bebê (Gluckman e Rocha, 2009).

A fonte de obtenção do SCUP é abundante e virtualmente ilimitada. A disponibilidade das células para transplante é imediata, uma vez que as bolsas de SCUP encontram-se prontas para o uso, armazenadas nos bancos de sangue de cordão umbilical e placentário (BSCUP). Não existe o risco de um doador identificado não estar disponível, como pode ocorrer com doadores de medula óssea. Estas características associadas à possibilidade de realização de transplante com menor compatibilidade HLA torna a procura por doador compatível mais rápida quando comparada a doadores de medula óssea. O tempo necessário para a localização de uma unidade de SCUP para um transplante não-aparentado é cerca de trinta dias menor do que o tempo necessário para localizar um doador de medula óssea (Rocha e Locatelli, 2008).

1.1.2 Desvantagens do Sangue de Cordão Umbilical e Placentário

Embora o SCUP seja rico em CPH, estas são obtidas em pequenos volumes, o que constitui a maior limitação para o uso do SCUP em transplantes. Por este motivo, o SCUP tem sido utilizado com maior frequência em crianças ou adultos pequenos. Mesmo em crianças, existe um aumento da mortalidade relacionada ao transplante quando se utiliza enxertos com baixa contagem celular (Eapen et al., 2007; Barker et al., 2010). A estratégia que tem sido utilizada em adultos é a utilização de duas unidades de SCUP – transplante duplo (Brunstein et al., 2010).

Outra limitação importante é a maior demora para enxertia do transplante realizado com SCUP, principalmente a recuperação da contagem de neutrófilos e plaquetas (Eapen et al., 2007; Yoo et al., 2007). Enquanto a enxertia neutrofílica ocorre por volta de 10 a 14 dias após o transplante de medula óssea ou SP mobilizado, essa enxertia geralmente demora mais de 20 dias no transplante de SCUP. Assim, os pacientes permanecem mais tempo em aplasia medular e, portanto, mais suscetíveis a infecções e sangramentos logo após o transplante. A demora para enxertia tem sido relacionada à menor contagem de células CD34+ infundidas e à imaturidade das células progenitoras do SCUP, além do grau de incompatibilidade HLA (Lemarie et al., 2007; Gluckman e Rocha, 2009).

Outras desvantagens quanto à utilização do SCUP são os altos custos para o armazenamento e a impossibilidade de reconvocação do doador para infusão de linfócitos ou coleta para um segundo transplante (Rocha e Locatelli, 2008).

1.2 Bancos de sangue de cordão umbilical e placentário

O sucesso do uso das células do SCUP em transplantes levou à necessidade de armazenamento destas células. Assim, Rubinstein et al., em 1993, estabeleceram o primeiro BSCUP, nos Estados Unidos (Rubinstein et al., 1993).

O BSCUP é uma organização que se destina a coletar, processar e armazenar células progenitoras hematopoéticas provenientes do SCUP. Nos BSCUP públicos o sangue criopreservado fica disponível para transplante alogênico ou pesquisa (ANVISA, 2010).

Hoje existem mais de 130 BSCUPs no mundo, que juntos, possuem um estoque aproximado de 630 mil unidades de SCUP; mais de 30 mil unidades já foram utilizadas para transplante (Rocha, 2016).

No Brasil, existem treze BSCUP públicos localizados em todas as regiões do país, somando juntos mais de 20 mil bolsas de SCUP armazenadas. A meta é que hajam 17 BSCUP no Brasil, com capacidade para armazenar 75 mil bolsas, número que, somado aos doadores voluntários de medula óssea, é considerado ideal para atender à demanda por transplantes no Brasil. Mais de 160 unidades de SCUP de bancos brasileiros já foram utilizadas para transplante (INCA, 2017).

Atualmente, é possível encontrar um doador de células progenitoras hematopoéticas não aparentado para virtualmente todos os pacientes em necessidade de transplante que não têm um doador aparentado (Rocha, 2016). No Brasil, a maior limitação para a realização dos transplantes não aparentados passou a ser a disponibilidade de leitos especializados e recursos adequados, e não a identificação de um doador (Seber, 2009).

1.3 Células dendríticas

Células dendríticas (DCs) são componentes do sistema imune inato, originadas na medula óssea e distribuídas por praticamente todos os órgãos linfoides e não linfoides. Possuem a função de capturar, processar e apresentar antígenos aos linfócitos T e B, iniciando assim a resposta imune adaptativa. São as células apresentadoras de antígenos (APC) mais potentes. Por serem as únicas células capazes de ativar linfócitos T naïve, ou seja, que nunca tiveram contato com antígeno, são conhecidas como APC “profissionais” (Abbas et al., 2015).

Outra função importante conhecida das DCs é a indução de tolerância imune. As DCs desempenham tal função através da eliminação de linfócitos T autorreativos no timo e ativando linfócitos T regulatórios (Treg) por mecanismos envolvendo atividade de perforina, sinais iniciados por citocinas como interleucina-10 (IL-10) e IL-27 e mecanismos mediados por vitamina A (Steinbrink et al., 1997; Bonasio et al., 2006; Sun et al., 2007; Mascanfroni et al., 2013; Zlotnikov-Klionsky et al., 2015). Estudos em ratos demonstraram que subpopulações de DCs são capazes de limitar

o desenvolvimento de autoimunidade experimental e desordens metabólicas (Zlotnikov-Klionsky et al., 2015).

As DCs correspondem a aproximadamente 1% dos leucócitos encontrados no sangue de um adulto saudável. Fenotipicamente, são reconhecidas por serem negativas para os marcadores de linhagem B (CD19), T (CD3) e monocítica (CD14), com expressão de HLA-DR forte. Em humanos, são encontrados dois principais tipos de DCs circulando no sangue: DCs mieloides (mDC), também chamadas de convencionais, e DCs plasmocitoides (pDC) (Collin et al., 2013). Inicialmente foi proposto que mDCs polarizariam a diferenciação das células T helper (Th) em Th1, enquanto as pDCs polarizariam para Th2 (Rissoan et al., 1999). Entretanto, hoje se sabe que as propriedades de cada subtipo de DC são flexíveis *in vivo* e variam de acordo com fatores como seu estado de ativação, a natureza do estímulo recebido e o microambiente inflamatório (Shortman e Liu, 2002; Iwasaki e Medzhitov, 2015).

As mDCs são caracterizadas pela expressão de CD11c, uma subunidade de integrina associada à função de fagocitose e adesão ao endotélio (Abbas et al., 2015). Seu fenótipo característico é CD123-/CD11c+ e podem ser ainda divididas de acordo com a expressão de BDCA-1 (CD1c) e BDCA-3 (CD141) (Dzionek et al., 2000; MacDonald et al., 2002; Ueno et al., 2011). Possuem uma forma peculiar, com inúmeras projeções citoplasmáticas chamadas de dendritos (Steinman, 2012). São as mais eficientes células apresentadoras de antígeno do sistema imune. Enquanto sentinelas localizadas nos principais sítios de entrada de agentes infecciosos, as mDCs ainda são células imaturas, estado caracterizado por alta capacidade de fagocitose e processamento de antígeno, baixa expressão de moléculas de MHC (complexo maior de histocompatibilidade) classe II e de moléculas coestimulatórias. Durante a infecção ou inflamação, são ativadas por sinalização de seus receptores de reconhecimento padrão (PRR), principalmente os do tipo Toll-like (TLR), que reconhecem moléculas produzidas por microrganismos e moléculas próprias liberadas de tecidos lesados (Takeuchi e Akira, 2010). As mDCs ativadas capturam e processam antígenos e então migram para os órgãos linfoides aonde vão apresentar antígenos às células T CD4 via moléculas de MHC classe II. Durante a migração, as DCs sofrem o processo de maturação, aumentando a expressão das moléculas coestimulatórias CD40, CD86 e CD80, que são cruciais para a ativação de células T, e de moléculas de MHC classe II, tornando-se assim potentes células

apresentadoras de antígenos (Steinbrink et al., 2009). As células T CD4 ativadas originam respostas T efectoras (Th1, Th2 ou Th17) ou T regulatórias, de acordo com as citocinas e quimiocinas liberadas pelas DCs. (Iwasaki e Medzhitov, 2015).

As pDCs são células pequenas com forma esférica, lembrando um plasmócito. Estão presentes principalmente no sangue e tecidos linfoides (Takenaka e Quintana, 2016). Se originam na medula óssea a partir de progenitores comuns de células dendríticas, embora uma parte possa ser originada de progenitores comuns linfoides (Reizis et al., 2012). São identificadas pela forte expressão de CD123 (cadeia α do receptor de IL-3) com CD11c negativo. São positivas também para os anticorpos BDCA-2 (CD303) e BDCA-4 (CD304) (Dzionek et al., 2000). Uma subpopulação de pDC expressa a molécula de adesão CD2. Esta subpopulação demonstrou ter características diferentes das CD2 negativas, como expressão de lisozima e maior expressão da molécula coestimulatória CD80 (Matsui et al., 2009).

A principal característica das pDCs é a produção de grandes quantidades de interferon (IFN) do tipo I (IFN α e β) em resposta a vírus. Receptores Toll-like TLR7 e TLR9 reconhecem ácido nucleico viral e após ativados disparam a produção de IFN do tipo I e outras citocinas e quimiocinas pró inflamatórias (Gilliet et al., 2008). IFN do tipo I possuem efeitos múltiplos, como ativação das células NK (*natural killer*) e aumento da sua atividade citotóxica e produção de IFN γ ; aumenta a função das próprias DCs, além de células T e B, resultando em remoção dos vírus e gerando resposta de memória (Auletta et al., 2015).

Embora não de forma tão eficiente quanto as DCs mieloides, as pDCs podem apresentar antígenos às células T CD4+, pois possuem moléculas de MHC classe II e moléculas coestimulatórias (Villadangos et al., 2007). pDCs também são eficientes em apresentar antígenos a linfócitos T CD8+ através de moléculas de MHC classe I, contribuindo para a resposta adaptativa durante infecções virais (Di Pucchio et al., 2008).

1.3.1 Células dendríticas no TCPH

No TCPH, como as mais potentes APC's, as DCs desempenham papel fundamental no desenvolvimento de DECH crônica e aguda, no efeito enxerto-contraleucemia (GVL, do inglês *graft-versus-leukemia*) e no combate às infecções pós-transplante (Plantinga et al., 2014). Uma baixa contagem de DCs no período de enxertia foi associada a maior risco de mortalidade, recaída da doença e de desenvolvimento de DECH aguda (Reddy et al., 2004; Gonçalves et al., 2015).

Em transplantes alogênicos, as DCs de origem do receptor demonstraram ter papel mais importante na iniciação da DECH aguda do que as DCs do doador (Duffner et al., 2004). Quanto à DECH crônica, tanto DCs do doador como do receptor têm sido relacionadas a esta complicação, entretanto, existe uma relação órgão-alvo específica. DECH crônica cutânea está associada à atividade de DCs do doador e do receptor, enquanto a DECH crônica intestinal é iniciada predominantemente por DCs do doador (Anderson et al., 2005).

Por outro lado, ao induzir a diferenciação Treg, DCs podem prevenir e atenuar a ocorrência de DECH (Sela et al., 2011). Diversos estudos demonstram o efeito protetor das pDCs de origem do doador. Transplantes realizados com medula óssea com maiores contagens de pDC foram associados a menor mortalidade por DECH (Waller et al., 2014). Os autores não encontraram a mesma correlação quando analisaram resultados de transplante realizado com SP mobilizado.

As DCs possuem um papel fundamental também no efeito GVL. Foi demonstrado neste caso haver predominância de atividade de DCs do receptor, embora DCs do enxerto também possam contribuir para o efeito GVL quando a carga tumoral é baixa (Reddy et al., 2005).

1.4 Células *natural killer*

As células *natural killer* (NK) são componentes do sistema imune inato. Possuem ação de toxicidade direta, destruindo células infectadas e tumorais, além de ativarem macrófagos (Abbas et al., 2015).

Promovem lise de alvos celulares na ausência de expressão de moléculas próprias de HLA de classe I. Quando diante de um alvo celular próprio, os receptores inibitórios presentes na superfície de células NK ligam-se às moléculas próprias de HLA classe I do alvo, gerando um sinal de inibição à célula NK. Quando o alvo é uma célula não própria, que, portanto, não expressa moléculas próprias de HLA classe I, ou quando o alvo é uma célula infectada ou tumoral cuja expressão de HLA esteja alterada, os receptores inibitórios não terão ligantes e não haverá sinal inibitório. Com predominância dos sinais de ativação, as células NK iniciam a ação de toxicidade celular. Existem dois tipos de receptores inibitórios conhecidos. Os do tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptor family*), identificados como CD158a, CD158b e CD158e; e o NKG2A (lectin-like receptor), que forma um complexo com CD94 (CD94:NKG2A) (Abbas et al., 2015).

As células NK são caracterizadas como linhagem negativa (não-B, não-T) e podem ser classificadas em duas subpopulações de acordo com a expressão de CD56, uma isoforma da molécula de adesão neural (N-CAM), e de CD16, ou FcγRIII, que é um receptor para a região Fc de IgG (imunoglobulina γ). As células CD56 fraco CD16 positivo constituem mais de 90% das células NK do SP e têm predomínio de efeito citotóxico. Destroem alvos celulares através da liberação de grânulos de granzima B e perforina, através da ativação de vias de morte celular ou através de citotoxicidade dependente de anticorpo. A população CD56 forte CD16 negativo é encontrada em maiores quantidades nos linfonodos e sua atividade é voltada principalmente para a produção de citocinas, como IFN-γ e fator de necrose tumoral α (TNF-α) (Sarvaria et al., 2017). Evidências recentes sugerem que as duas subpopulações seriam diferentes fases da maturação das células NK, sendo a CD56 forte CD16 negativo a mais imatura (Yu et al., 2010).

1.4.1 Células *natural killer* no TCPH

Resultados pós TCPH sofrem influência importante da atividade das células NK, que são os primeiros linfócitos a se recuperarem após o transplante, precedendo em meses a recuperação dos linfócitos T e B (Nguyen et al., 2005). Células NK do receptor resistentes ao condicionamento podem contribuir para a

rejeição do enxerto (Murphy et al., 1987), enquanto células NK do doador, ao contrário, contribuiriam para a enxertia (Murphy et al., 1992).

Foi demonstrado que as células NK, através de sua atividade citotóxica contra células tumorais, participam do efeito GVL, destruindo células leucêmicas e interferindo assim no risco de recaída da doença (Ruggeri et al., 1999).

A alorreatividade das células NK do enxerto, decorrente de incompatibilidade KIR/ligante, onde as células NK do enxerto não reconhecem ligante KIR no receptor, está relacionada à atividade GVL clinicamente significativa, levando a melhores resultados em transplantes de SCUP (Willemze et al., 2009), haploidênticos (Ruggeri et al., 2007) e alogênicos aparentados (Hsu et al., 2005) e não aparentados (Giebel et al., 2003).

O papel das células NK no DECH ainda não está bem estabelecido. Diferentes estudos encontraram resultados contraditórios, em que células NK poderiam ter efeitos regulatórios ou indutores de DECH, como revisado por Simonetta et al. (2017).

Em trabalho anterior do nosso grupo, foi observado que baixas contagens de células NK CD56++CD16- nas primeiras semanas após o transplante alogênico estão associadas a maior risco de mortalidade, mas não têm impacto no risco de desenvolvimento de DECH (Gonçalves et al., 2013).

1.5 Monócitos

Monócitos são células do sistema imune inato originadas na medula óssea. Suas principais funções são fagocitose, produção de citocinas e apresentação de antígenos. Quando sob estímulo inflamatório, os monócitos migram para os tecidos aonde está ocorrendo o processo inflamatório para desempenhar suas funções. Quando nos tecidos, são denominados macrófagos (Abbas et al., 2015).

O anticorpo mais utilizado para identificar os monócitos em humanos é o CD14. Baseados na expressão de CD14 (receptor de LPS – lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias gram-negativas) e CD16, podemos ainda separar os monócitos em três subpopulações: monócitos clássicos CD14+CD16-; intermediários CD14+CD16+; e não clássicos CD14fraco/negativo CD16+ (Ziegler-

Heitbrock et al., 2010). Acredita-se que os monócitos clássicos se diferenciam em intermediários e posteriormente em não clássicos, em uma via de maturação dependente de fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (Saleh et al., 1995; Korkosz et al., 2012).

Monócitos não clássicos são células com características pró inflamatórias e maior capacidade de apresentação de antígenos, enquanto os monócitos clássicos estão mais associados à atividade de fagocitose. Os monócitos intermediários seriam células de transição, com um perfil intermediário entre monócitos clássicos e não clássicos (Mukherjee et al., 2015).

O aumento de monócitos intermediários e não clássicos está associado a condições inflamatórias diversas, como sepse (Fingerle et al., 1993), doenças cardiovasculares (Rogacev et al., 2012), tumores sólidos (Saleh et al., 1995), artrite reumatoide (Hepburn et al., 2004) e lúpus (Mukherjee et al., 2015).

1.6 Distribuição de subpopulações de leucócitos no SCUP

Existem poucos dados sobre a distribuição das subpopulações de linfócitos e demais células do sistema imune inato em SCUP, quando comparado a sangue de adulto.

Estudos realizados na década de 1990 (Beck e Lam-Po-Tang, 1994; D'Arena et al., 1998) avaliaram a distribuição de linfócitos no SCUP e compararam com SP de adulto utilizando citometria de fluxo de duas ou três cores. Nestes trabalhos não foram avaliadas todas as subpopulações de linfócitos T, tampouco as subpopulações de células NK.

Em trabalhos posteriores de Theilgaard-Mönch et al. (2001) e López et al. (2009), também foram estudadas as distribuições de linfócitos, mas as subpopulações de células NK as subpopulações de linfócitos T duplo-positivos e duplo-negativos, respectivamente, não foram analisadas. Em outro estudo, Cairo et al. (2005) analisaram a distribuição de linfócitos em oito mil unidades de SCUP, mas, novamente, não estudaram as subpopulações de células NK. Os autores não compararam SCUP com SP de adulto.

Diversos grupos estudaram a distribuição das DCs no SCUP comparando (Szabolcs et al., 2003; Ueda et al., 2003; Crespo et al., 2004; Aldebert et al., 2007) ou não (Borras et al., 2001; Hagendorens et al., 2003) com SP de adulto, através de técnica mais antiga de citometria de quatro cores.

Em trabalho anterior de nosso grupo foram estudadas as subpopulações de linfócitos e DCs no SCUP, porém foram analisadas amostras pós processamento e descongelamento (Gonçalves et al., 2015), diferentemente do trabalho atual em que foram estudadas amostras frescas.

Um estudo recente e amplo de Prabhu et al. (2016) analisou subpopulações de linfócitos, monócitos e DCs, além de outros subtipos leucócitos, em SCUP fresco e SP de adulto utilizando citometria de oito cores. Contudo, as subpopulações de linfócitos T duplo-positivos e duplo-negativos, assim como as subpopulações de células NK, não foram estudadas.

No atual estudo, utilizando citometria de oito cores e amplo painel de anticorpos monoclonais, pudemos analisar concomitantemente diversas subpopulações de leucócitos no SCUP fresco e no SP de adulto e comparar os resultados dos dois tipos de amostra. Foram analisados os linfócitos T e subpopulações, incluindo duplo positiva e duplo negativa; linfócitos B; células NK e subpopulações; células dendríticas e subpopulações; monócitos e subpopulações, além de neutrófilos e eosinófilos.

2. OBJETIVOS

2 – OBJETIVOS

1. Caracterizar a distribuição dos linfócitos, células NK, células dendríticas e monócitos em unidades de sangue de cordão umbilical e placentário;
2. Comparar a distribuição dos linfócitos, células NK, células dendríticas e monócitos de sangue de cordão umbilical e placentário com a de SP de adultos saudáveis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Entre setembro de 2015 e julho de 2016 foram coletadas amostras de SCUP fresco e de SP de adultos saudáveis.

Sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) – Foram incluídas amostras de 54 (cinquenta e quatro) unidades de SCUP coletadas pela equipe do Banco de Sangue de Cordão Umbilical do Hospital Sírio Libanês na maternidade Amparo Maternal.

As gestantes que concordaram em doar o SCUP de seu recém-nascido assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e, de acordo com a RDC 56 de 16/12/2010, tinham idade mínima de 18 anos; se submeteram a pelo menos duas consultas de pré-natal documentadas; não tinham risco aumentado para doenças transmissíveis pelo sangue; no momento do parto a idade gestacional era igual ou superior a 35 semanas; bolsa rota há menos de 18 horas; trabalho de parto ocorreu sem anormalidade e durante a gestação não houve processo infeccioso ou doença que pudessem interferir na vitalidade placentária.

Os bebês cujas unidades de SCUP foram analisadas nasceram com mediana de 40 semanas de gestação (variação de 36 a 43 semanas) e 29 eram do sexo masculino. A mediana de peso ao nascer foi 3,263 quilos (variação de 2,530 a 4,005 quilos). Em 40 casos o tipo de parto foi vaginal.

Alíquotas de 3mL foram coletadas em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) daquelas unidades que não foram encaminhadas para congelamento por baixo volume (<50mL).

Sangue periférico de adulto (SPA) – Foram coletadas 25 amostras de 3mL em EDTA de indivíduos adultos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro do Hospital São Paulo/UNIFESP, todos maiores de 18 anos, com mediana de idade de 33 anos (variação 18 a 66 anos), sendo 15 do sexo masculino.

3.2 Contagem de leucócitos

A contagem de células nucleadas totais nas amostras de SCUP foi realizada no contador automático de células Coulter AcT Diff 2® (Beckman Coulter, Brea, EUA) e a correção da leucometria realizada por contagem diferencial dos eritroblastos em lâmina. As células das amostras de SP de adulto foram contadas utilizando o aparelho Cell Dyn Ruby® (Abbott, Illinois, EUA).

A quantificação absoluta das subpopulações de leucócitos foi realizada por plataforma dupla, ou seja, utilizando o valor de porcentagem obtido por citometria e o valor total de leucometria da amostra analisada, obtido no contador automático de células – hemograma.

3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica

As amostras foram processadas para imunofenotipagem em até 24 horas da coleta no Laboratório de Biologia Celular e Citometria de Fluxo da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, Departamento de Oncologia Clínica e Experimental da UNIFESP.

Foram utilizados anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com os fluorocromos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCPCy5.5 (peridina clorofila cianina 5.5), PC7 (R-ficoeritrina cianina 7), APC (aloficocianina), APC-H7 (aloficocianina H7), PB (pacific blue) e OC-515 (orange Cytognos 515). As especificações dos AcMo utilizados encontram-se no quadro 1.

Utilizando-se técnica de marcação direta (*Stain-lyse-wash*) descrita anteriormente (Landay e Muirhead, 1989), amostras de sangue total contendo de 0,5 a 1×10^6 células em um volume de até 100 μ L foram colocadas em tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon®) e acrescidas dos AcMo em quantidade previamente titulada, de acordo com o painel de AcMo em 8 cores que se encontra apresentado no quadro 1. Para cada teste foi utilizado também um tubo não marcado, ou seja, contendo somente amostra, para análise de possível autofluorescência.

As células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente sob proteção da luz. Decorrido esse tempo foi adicionado 1 mL de solução de lise

comercial (FACSLysing solution®, BDB), na diluição 1:10, com objetivo de lisar as hemácias; após 15 minutos de incubação os tubos foram centrifugados e as células lavadas duas vezes com 3 mL de solução tampão (PBS – *Phosphate buffered saline*). As células foram então ressuspensas em 400µl de solução tampão para aquisição.

Foram adquiridos 500 mil eventos utilizando o citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, EUA). A análise dos dados foi realizada através do programa Infinicyt® (Cytognos, Salamanca, Espanha).

Quadro 1. Painel de anticorpos para determinação das subpopulações leucocitárias

Anticorpo monoclonal	Fabricante	Clone	Cidade/país de origem
FITC CD16	Cytognos	3G8	Salamanca, Espanha
PE CD56 CD4	Cytognos Cytognos	C5.9 Edu-2	Salamanca, Espanha Salamanca, Espanha
PerCP Cy5.5 CD11c	BD Biosciences	B-ly6	San Jose, EUA
PC7 CD8 CD19	Immunotech Immunotech	SFCI21Thy2D3 J3-119	Brea, USA Marseille, França
APC CD123	Biolegend	6H6	San Diego, EUA
APC-H7 CD3 CD14	BD Biosciences BD Biosciences	SK7 MφP9	San Jose, EUA San Jose, EUA
PB HLA-DR	Biolegend	L243	San Diego, EUA
OC-515 CD45	Cytognos	GA90	Salamanca, Espanha

FITC: isotiocianato de fluoresceína; PE: ficoeritrina; PerCPCy5.5: peridina clorofila cianina 5.5; PC7: R-ficoeritrina cianina 7; APC: alofococianina; APC-H7: alofococianina H7; PB: pacific blue e OC-515: orange Cytognos 515.

3.4 Identificação das populações celulares

Os leucócitos totais da amostra foram analisados por citometria e identificados pela expressão de CD45+. Possíveis eritroblastos (CD45-) foram excluídos da análise.

Os neutrófilos foram identificados pelo seu tamanho e complexidade, expressão de CD45 e de CD16. Os neutrófilos maduros foram considerados aqueles com CD16+, e os imaturos, CD16-.

Os eosinófilos foram identificados pelo seu tamanho e complexidade, ausência de expressão de CD16 e por sua característica autofluorescência.

Para identificar e classificar os monócitos, além do tamanho, complexidade e expressão positiva de CD45, CD11c e HLA-DR, foram analisadas as expressões de CD14 e CD16, sendo então divididos em três populações: monócitos clássicos - CD14+ CD16-; monócitos intermediários - CD14+ CD16+ e monócitos não clássicos CD14fraco/- CD16++.

Os linfócitos e as células NK foram identificados pelo seu pequeno tamanho e complexidade e expressão forte de CD45 e, de acordo com expressões de antígenos características, foram classificados em linfócitos T, B e células NK. Os linfócitos T foram identificados pela expressão de CD3+ e as subpopulações de acordo com a expressão de CD4 e CD8, formando 4 grupos: CD4+/CD8-, CD4-/CD8+, CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, além das células CD3+ com CD56 e/ou CD16 positivos.

Os linfócitos B foram identificados pela expressão de CD19+ e ausência de marcadores de linhagens T e monocítica. As células NK foram identificadas pelo seu fenótipo CD56+ na ausência de marcadores de linhagens B, T e monocítica, sendo divididas nas subpopulações CD56++/CD16- e CD56+/CD16+.

As DCs foram caracterizadas pela expressão de HLA-DR em forte intensidade, ausência de marcadores de linhagens T (CD3) e B (CD19) e monocítica (CD14), além de CD16-. Dois subtipos de DCs foram identificados: CD123++/CD11c- (pDC) e CD123-/CD11c++ (mDC).

As estratégias de isolamento e identificação das DCs, células NK e monócitos estão mostradas nas figuras 1 a 3.

Quadro 2. Caracterização imunofenotípica das células NK, células dendríticas e monócitos de acordo com a expressão dos principais antígenos de superfície.

Fenótipo associado			
Células NK			
	CD56++	CD16-	
	CD56+	CD16+	
Células dendríticas			
pDC	DR++	CD123++	CD11c-
mDC	DR++	CD123-	CD11c++
Monócitos			
Clássicos	CD14+	CD16-	
Intermediários	CD14+	CD16+	
Não clássicos	CD14fraco/-	CD16++	

++ (fortemente positivo), + (positivo), - (negativo).

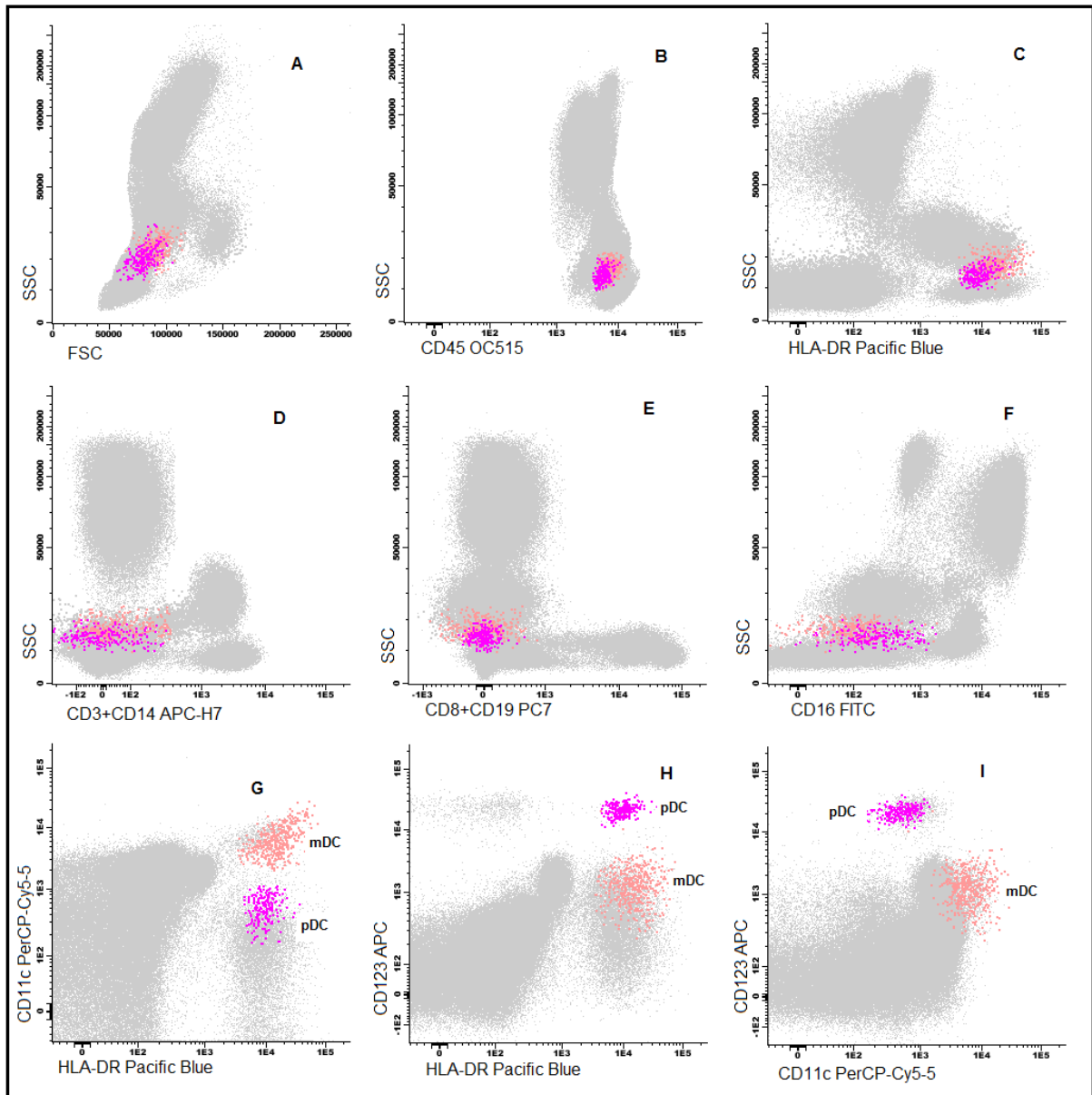


Figura 1. Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação das células dendríticas.

As DCs foram identificadas por seu tamanho e complexidade, expressão de CD45, forte expressão de HLA-DR, ausência de expressão dos marcadores de linhagem CD3, CD14, CD8, CD19 e CD16 (A a F). Após a identificação inicial, a classificação dos subtipos de DCs foi realizada analisando-se a expressão de CD123 e CD11c. As pDC são CD11c-/CD123++ e as mDC, CD11c+/CD123- (G a I).

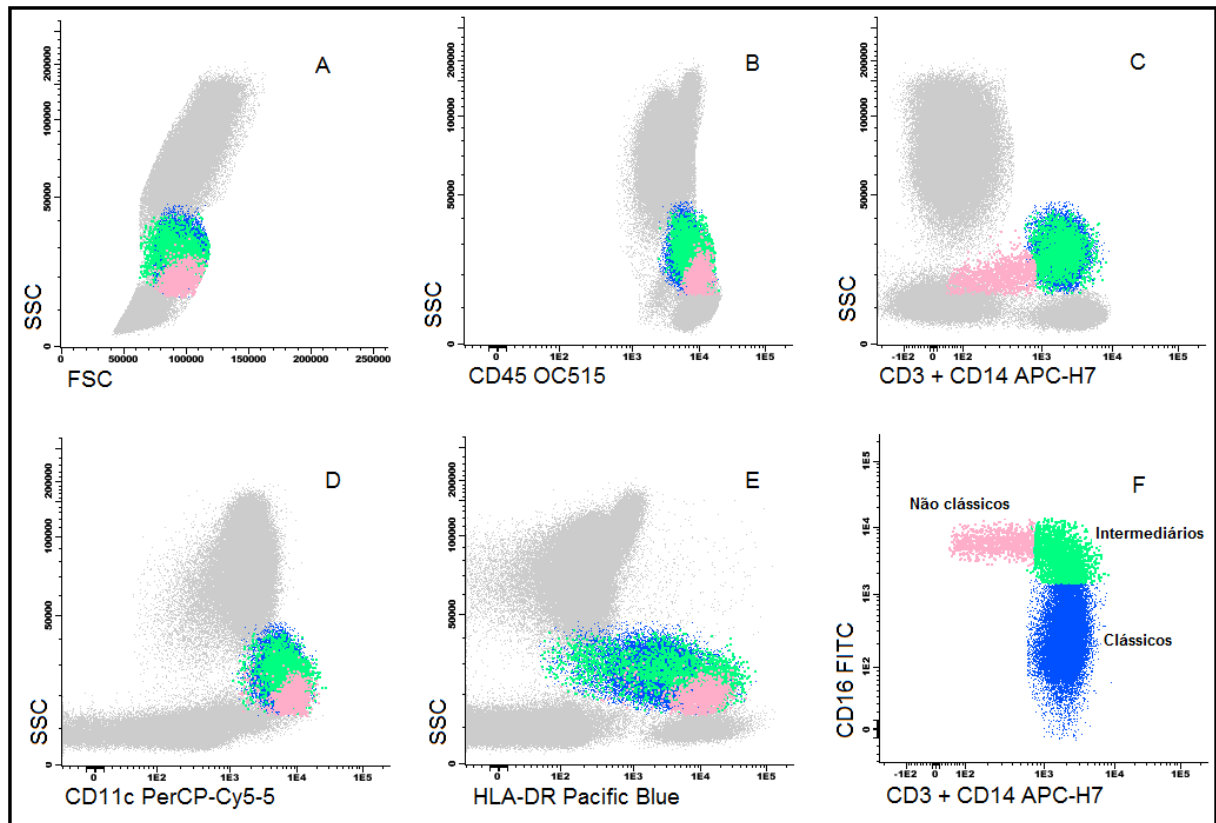


Figura 2. Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação dos monócitos.

De A a E, estratégia de seleção dos monócitos. Em F, curva de maturação dos monócitos. Sob estímulo inflamatório, monócitos clássicos CD14+CD16- se diferenciam em monócitos intermediários CD14+CD16+. Na próxima etapa de diferenciação, os monócitos perdem CD14, originando os monócitos não clássicos CD14fraco/- CD16++.

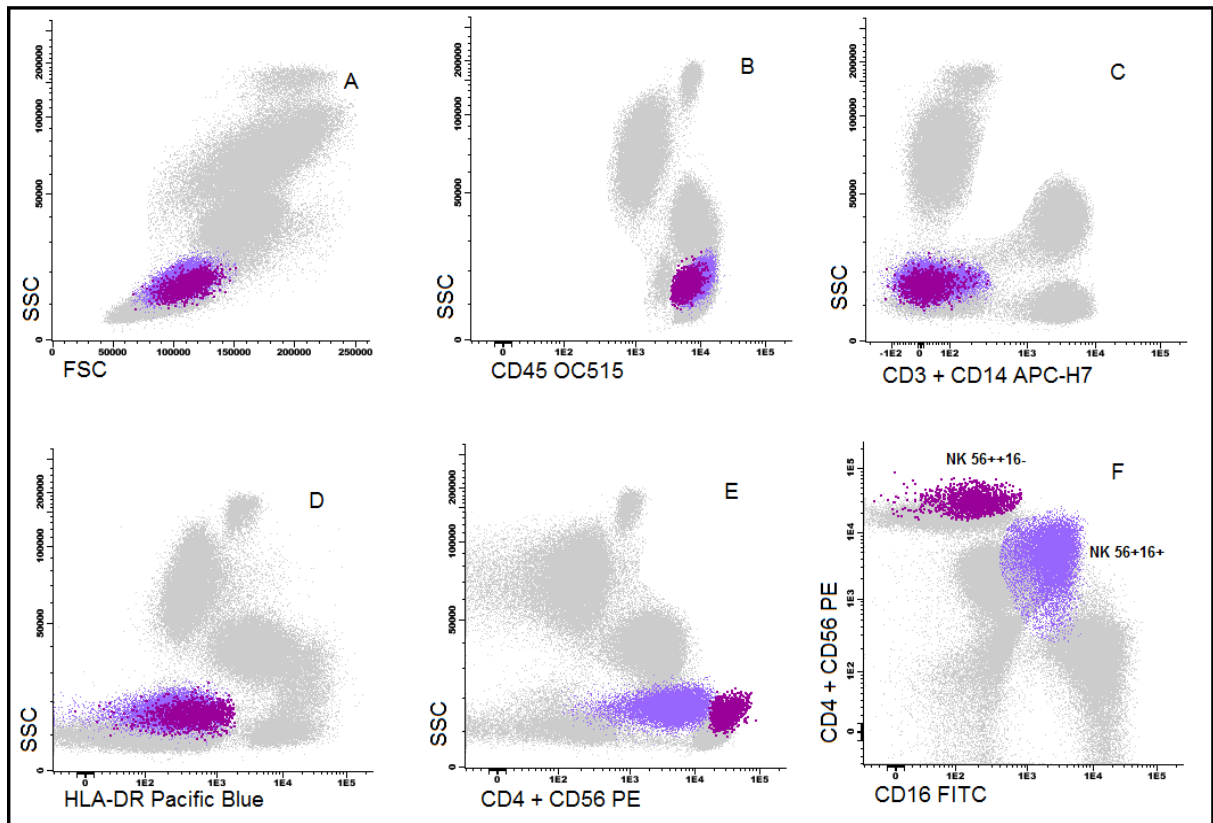


Figura 3. Representação gráfica, em dot plots, da análise de citometria de fluxo de um dos casos estudados, mostrando a estratégia de seleção e identificação das células *natural killer*.

As células NK foram identificadas por seu baixo tamanho e complexidade, CD45+, CD3- e CD56+, sendo então divididas nas subpopulações NK CD56++ CD16- e NK CD56+ CD16+.

3.5 Análise dos Resultados – Estatística

Mediana e variação foram usadas para análise descritiva de variáveis contínuas. As diferenças entre SCUP e SP de adultos foram analisadas quanto à significância pelo teste de Mann-Whitney utilizando o programa SPSS (IBM, Chicago, EUA). Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4 – RESULTADOS

Os valores absolutos e a distribuição de cada população estudada encontram-se nas tabelas 1 a 3 e nas figuras 4 a 12.

4.1 Valores absolutos das subpopulações

4.1.1 Leucócitos totais e granulócitos

O SCUP apresentou maior quantidade de leucócitos totais em relação ao SPA (SCUP vs. SPA: 10.782 vs. 6.980/mm³, $p<0,001$). No SCUP também foram maiores as contagens de eosinófilos (SCUP vs. SPA: 338 vs. 153/mm³, $p<0,001$), neutrófilos totais (SCUP vs. SPA: 6.457 vs. 4.380/mm³, $p<0,001$) e neutrófilos imaturos (SCUP vs. SPA: 291 vs. 7,5/mm³, $p<0,001$).

4.1.2 Monócitos

Os monócitos totais e as subpopulações clássico e intermediário foram encontrados em maiores quantidades no SCUP que no SPA: monócitos totais, SCUP vs. SPA: 1033 vs. 436/mm³, $p<0,001$; monócitos clássicos: 897 vs. 318/mm³, $p<0,001$; e monócitos intermediários: 74 vs. 41/mm³, $p<0,001$. Por outro lado, monócitos não clássicos foram encontrados em quantidades mais baixas no SCUP (SCUP vs. SPA: 24,8 vs. 51,4/mm³, $p<0,001$).

4.1.3 Linfócitos

Os linfócitos totais se apresentaram em valores absolutos maiores no SCUP que no SPA (SCUP vs. SPA: 2.753 vs. 1.906/mm³, $p<0,001$).

4.1.4 Linfócitos T

A contagem absoluta de linfócitos T totais e das subpopulações CD4+ e CD8+ não apresentou diferença significativa entre o SCUP e o SPA. Entretanto, as subpopulações CD4+CD8+ (duplo positiva) e CD4-CD8- (duplo negativa) estão presentes em menores quantidades no SCUP (SCUP vs. SPA: 1,1 vs. 5,7/mm³ $p=0,001$ – duplo-positivos e 39 vs. 54/mm³, $p=0,005$ – duplo-negativos).

4.1.5 Células CD3+/CD56+

Células CD3+/CD56+ foram encontradas em valores menores no SCUP que no SPA, ainda que a diferença não tenha sido significativa (SCUP vs. SPA: 27,6 vs. 32,4 /mm³, $p=0,07$).

4.1.6 Linfócitos B

Linfócitos B apareceram em maiores valores no SCUP quando comparado ao SPA (SCUP vs. SPA: 434 vs. 228/mm³, $p<0,001$).

4.1.7 Células NK

A população total de células NK é maior no SCUP que no SPA em valores absolutos (SCUP vs. SPA: 477 vs. 274/mm³, $p<0,001$), assim como suas subpopulações NK CD56+CD16+ (SCUP vs. SPA: 446 vs. 259/mm³, $p=0,001$) e NK CD56++CD16- (SCUP vs. SPA: 24,5 vs. 12,5/mm³, $p<0,001$).

4.1.8 Células dendríticas

O sangue cordão e o SPA apresentaram quantidades similares de DCs totais (SCUP vs. SPA: 24 vs. 24/mm³, p = não significativa - NS) e quantidades similares do subtipo mDC (SCUP vs. SPA: 15 vs. 18/mm³, p =NS), em valores absolutos. Por outro lado, as pDC foram encontradas em maior quantidade no SCUP que no SPA em valores absolutos (SCUP vs. SPA: 8,3 vs. 6,2/mm³, p =0,03).

Tabela 1. Mediana e variação dos valores absolutos de leucócitos e subpopulações encontrados no SPA e SCUP

POPULAÇÃO CELULAR (células/mm ³)	SPA, mediana (variação)	SCUP, mediana (variação)	p
Leucócitos totais	6.980 (4.440 a 13.900)	10.782 (3.740 a 17.380)	<0,001
Neutrófilos	4.380 (1.637 a 9.535)	6.457 (1.511 a 12.060)	<0,001
Neutrófilos imaturos (CD16-)	7,5 (0 a 43)	291 (0 a 1.522)	<0,001
Eosinófilos	153 (14 a 428)	338 (85 a 726)	<0,001
Monócitos totais	436 (232 a 671)	1033 (186 a 2.583)	<0,001
Clássicos (CD14++ CD16-)	318 (168 a 566)	897 (139 a 2.381)	<0,001
Intermediários (CD14++ CD16+)	41 (17 a 135)	74 (22 a 219)	<0,001
Não clássicos (CD14fraco/- CD16+)	51 (24 a 107)	24,8 (7 a 145)	<0,001
Linfócitos totais	1.906 (1.497 a 3.884)	2.753 (890 a 4.977)	<0,001
Linfócitos T totais	1.573 (829 s 3.097)	1.639 (553 a 3.164)	0,52
CD4+	937 (498 a 1.881)	1.106 (323 a 2.462)	0,10
CD8+	451 (223 a 1.043)	449 (139 a 786)	0,61
CD4+ CD8+	5,7 (0 a 14)	1,1 (0 a 29)	0,001
CD4- CD8-	54 (20 a 137)	39 (13 a 102)	0,005
Células CD3+/CD56+	32 (10,1 a 234,1)	27,6 (5,8 a 66,4)	0,07
Linfócitos B	228 (105 a 505)	434 (65 a 1.528)	<0,001
Células NK totais	274 (61 a 709)	477 (135 a 1.382)	<0,001
CD56+ CD16+	259 (46 a 692)	446 (97 a 1.347)	0,001
CD56++ CD16-	12,5 (6 a 28)	24,5 (12 a 198)	<0,001
Células dendríticas totais	24 (14 a 64)	24 (6 a 81)	1
pDC	6,2 (3 a 19)	8,3 (1 a 34)	0,03
mDC	18 (10 a 45)	15 (3 a 55)	0,18

SPA: sangue periférico de adultos saudáveis; SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

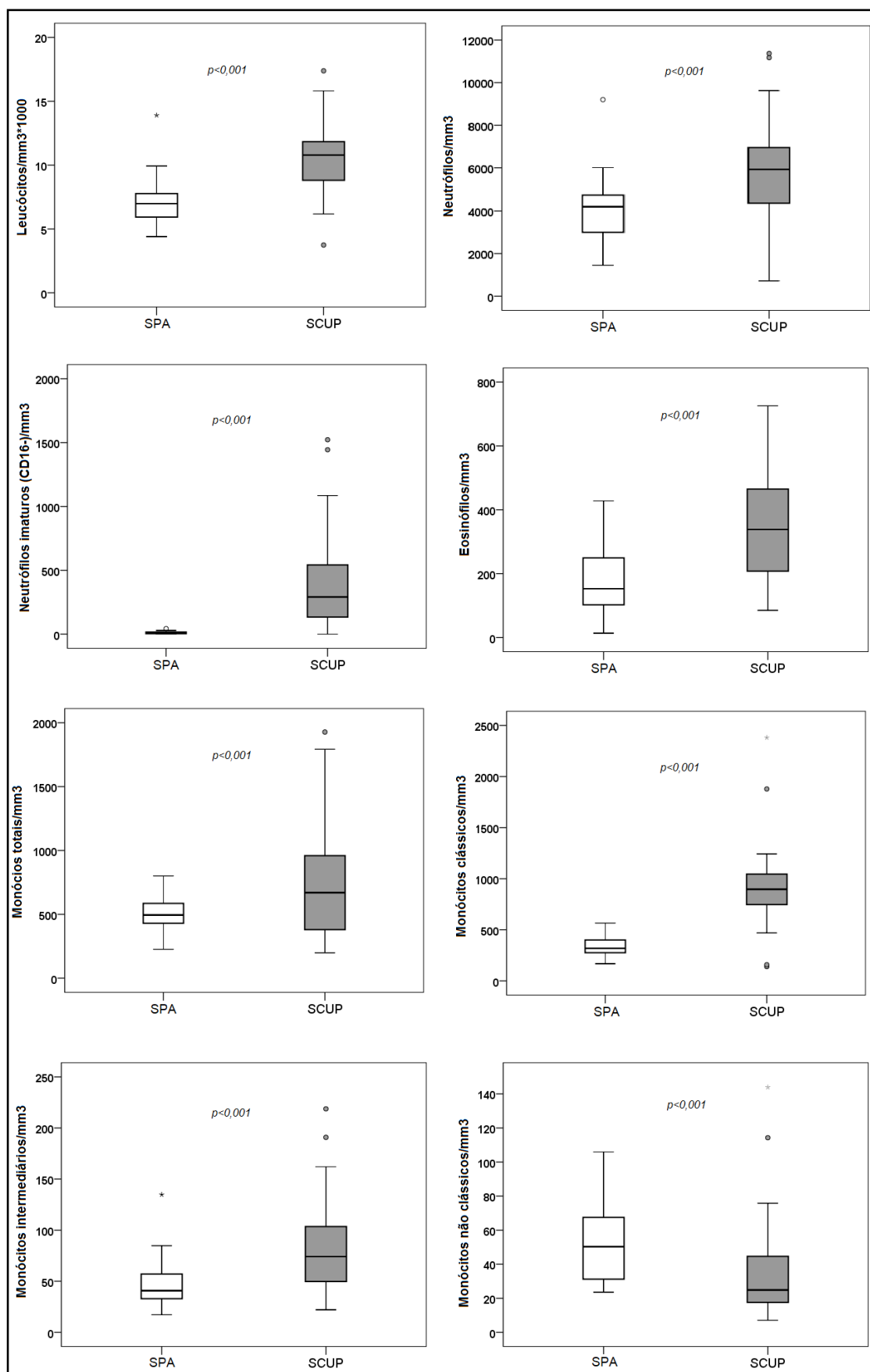


Figura 4. Representação gráfica dos valores absolutos de subpopulações de leucócitos totais, granulócitos e monócitos encontrados no SPA e no SCUP.

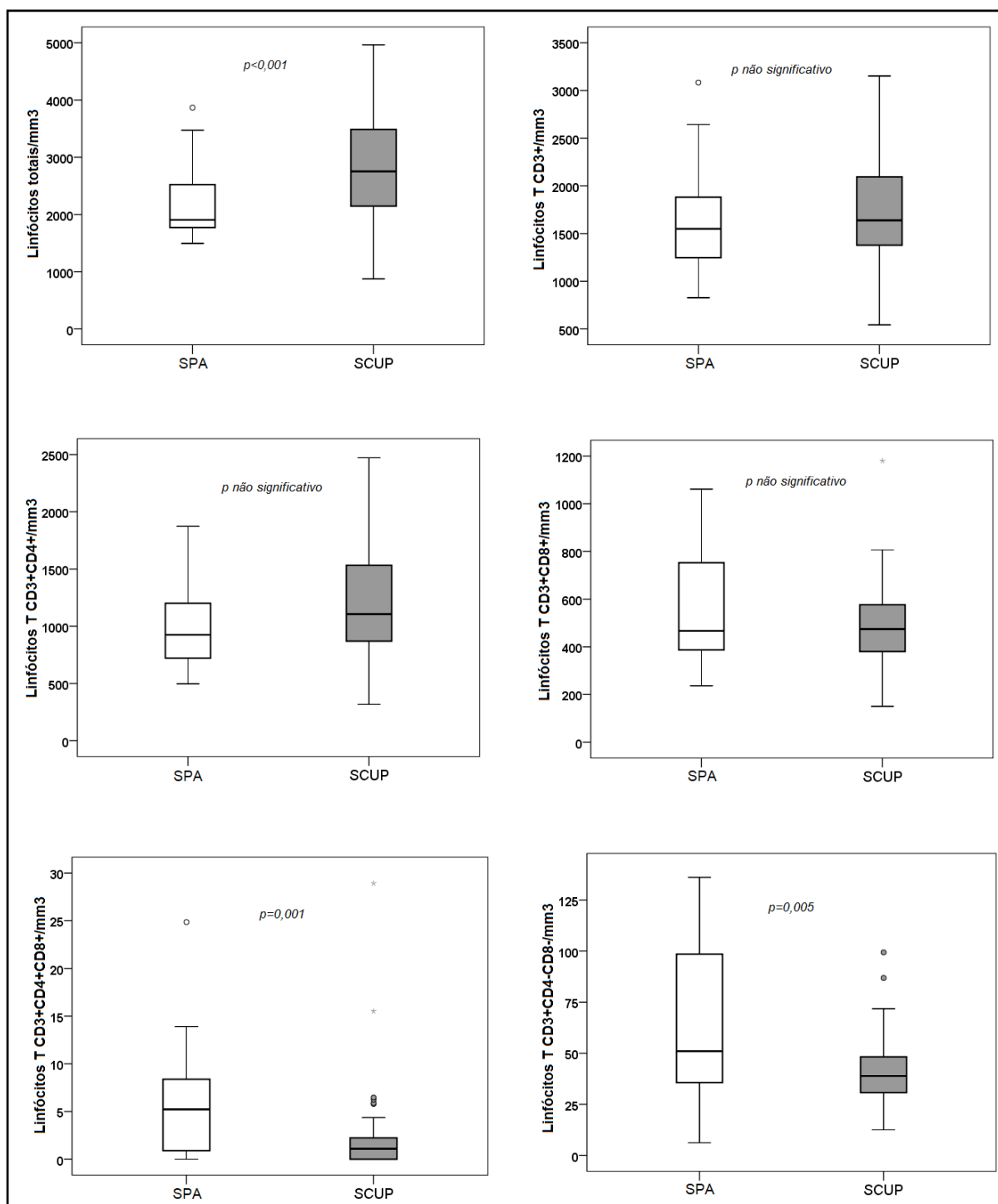


Figura 5. Representação gráfica dos valores absolutos de subpopulações de linfócitos totais e linfócitos T encontrados no SPA e no SCUP.

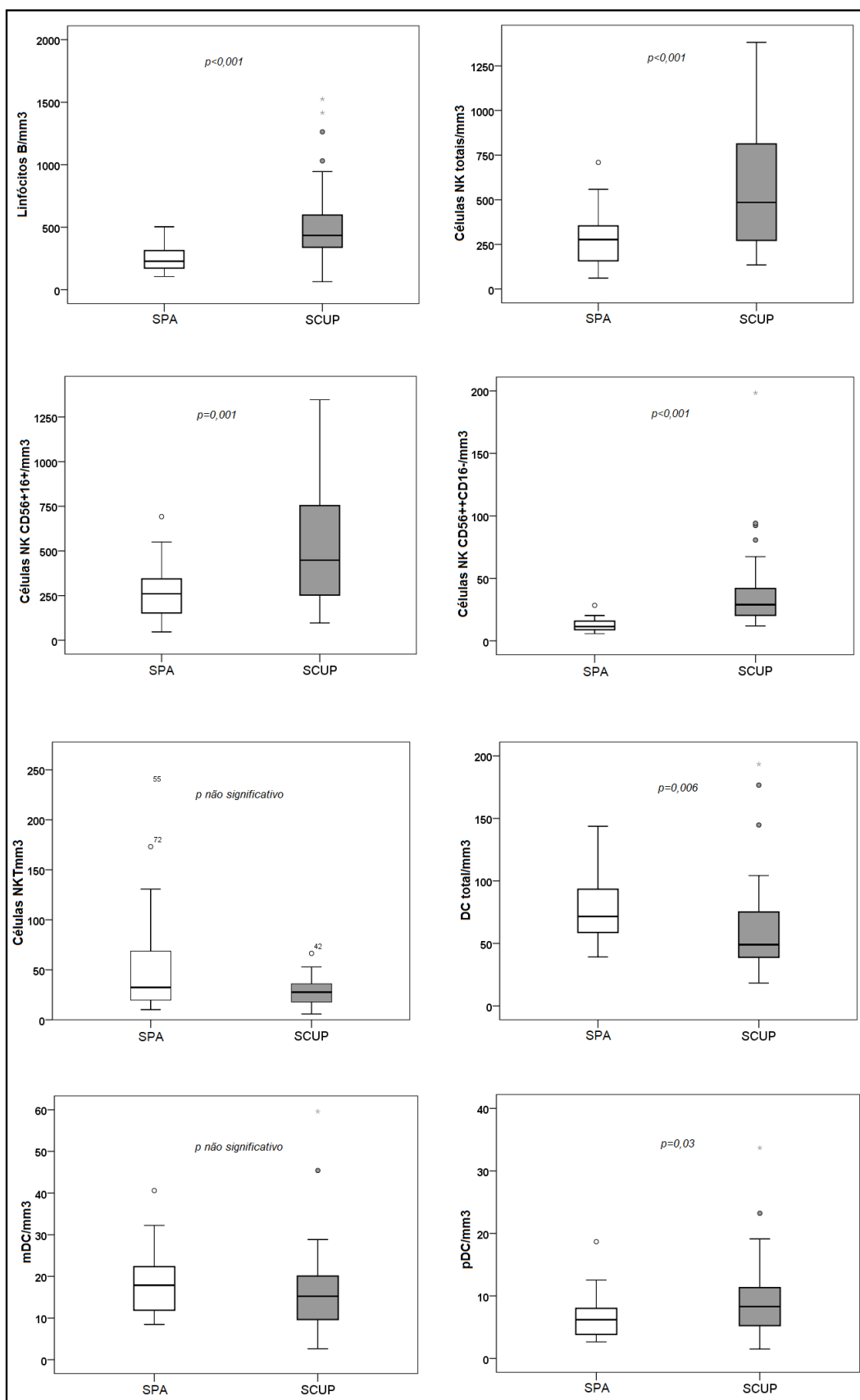


Figura 6. Representação gráfica dos valores absolutos das subpopulações de linfócitos B, células NK, células CD3+/CD56+ e células dendríticas encontrados no SPA e no SCUP.

4.2 Distribuição das subpopulações

4.2.1 Subpopulações de linfócitos/células NK

A distribuição dos linfócitos T, B e células NK foi diferente entre SCUP e SPA, como ilustrado na figura 7 a seguir. O SCUP tem proporcionalmente menos linfócitos T entre seus linfócitos totais, e consequentemente mais linfócitos B e células NK, comparado ao SPA.

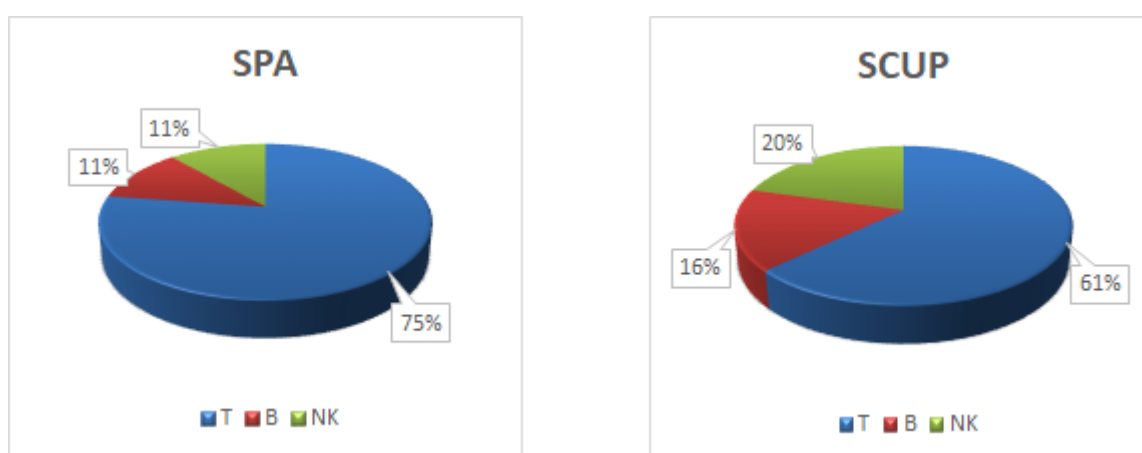


Figura 7. Representação gráfica da distribuição dos linfócitos T, B e células NK no SPA e no SCUP

4.2.2 Subpopulações de linfócitos T

Entre os linfócitos T também houve diferença na distribuição de suas subpopulações entre as amostras estudadas. O SCUP tem proporcionalmente mais linfócitos T CD4+ e menor proporção das outras subpopulações – CD8+, duplo positiva e duplo negativa, o que leva a uma razão CD4/CD8 maior no SCUP (SCUP vs. SPA: 2,3 vs. 1,8 $p=0,01$).

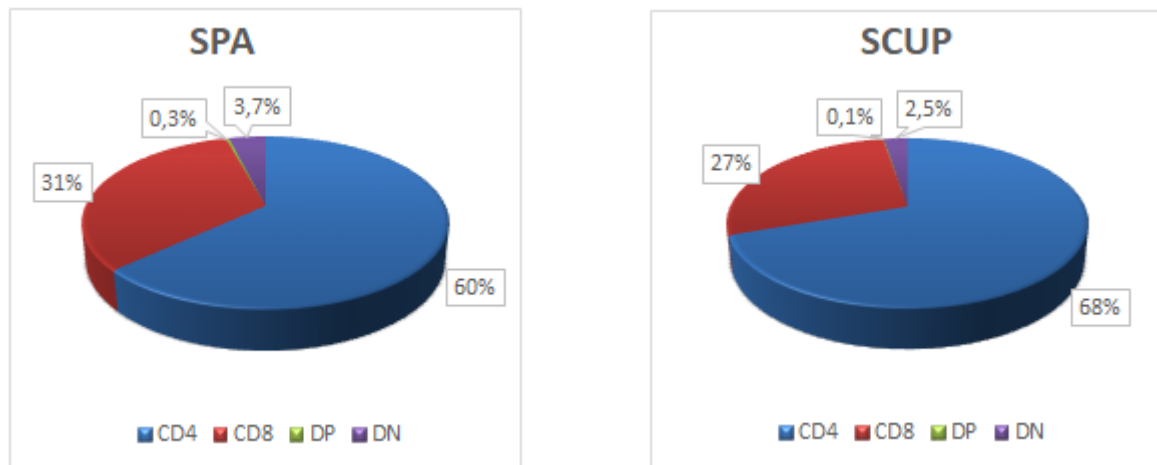


Figura 8. Representação gráfica da distribuição das subpopulações de linfócitos T no SPA e no SCUP

DP: duplo positivo; DN: duplo negativo

4.2.3 Subpopulações de células NK

Comparado ao SPA, o SCUP tem maior frequência de células NK CD56++CD16- e menor frequência das células CD56+CD16+, como demonstrado na figura abaixo. Portanto, a razão NK CD56+CD16+/CD56++CD16- é menor no SCUP (SCUP vs. SPA: 13,7 vs. 24, $p=0,03$).

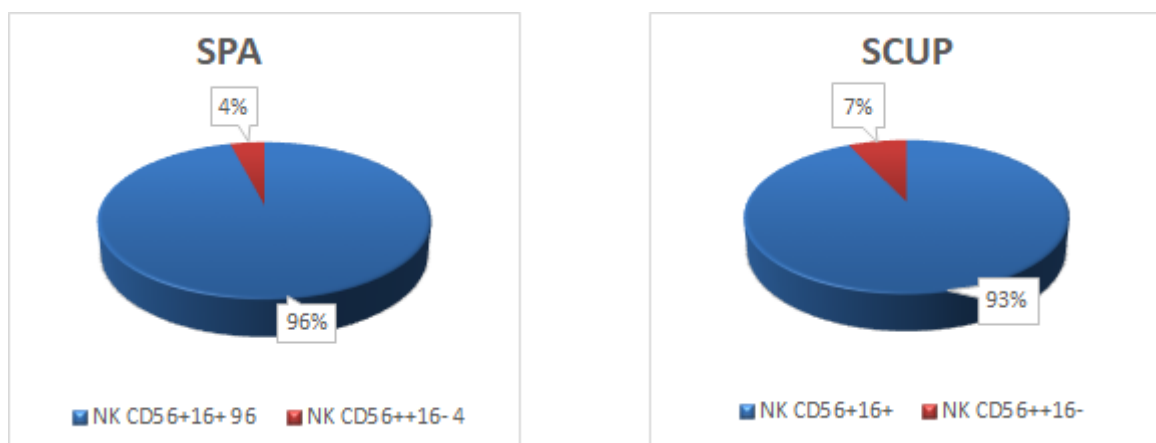


Figura 9. Representação gráfica da distribuição das subpopulações de células NK no SPA e no SCUP

4.2.4 Subpopulações de monócitos

Analisando a distribuição de monócitos, verifica-se que o SCUP tem maior proporção de monócitos clássicos (SCUP vs. SPA, em %: 88,6 vs. 77 $p<0,001$) e menor proporção de monócitos intermediários (SCUP vs. SPA: 7,9 vs. 9,4 $p=0,017$) e não clássicos (SCUP vs. SPA: 2,8 vs. 10,7 $p<0,001$), comparado ao SPA.

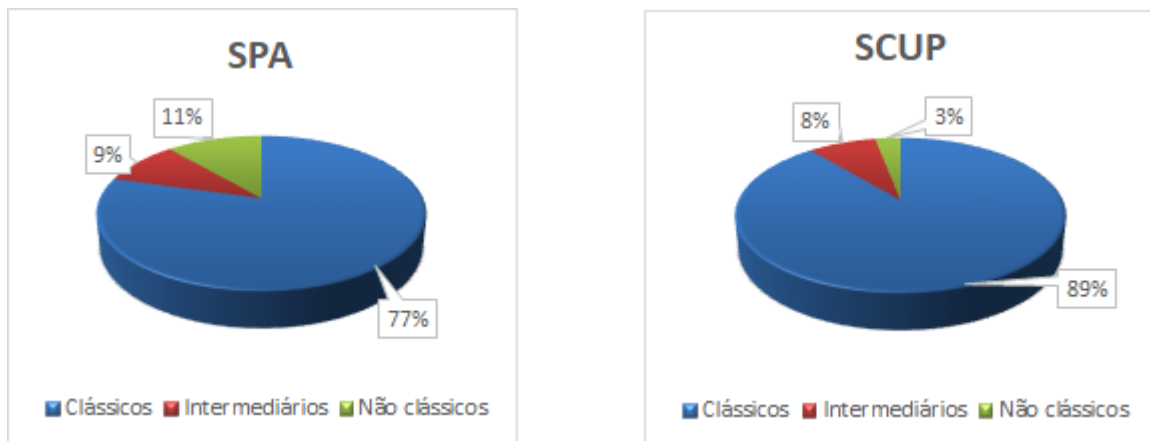


Figura 10. Representação gráfica da distribuição das subpopulações de monócitos no SPA e no SCUP

4.2.5 Subpopulações de células dendríticas

Comparado ao SPA, o SCUP tem dentro as DCs proporção menor de mDC e maior de pDC. Assim, a razão mDC/pDC foi menor no SCUP (SCUP vs. SPA: 1,8 vs. 3, $p < 0,0001$).

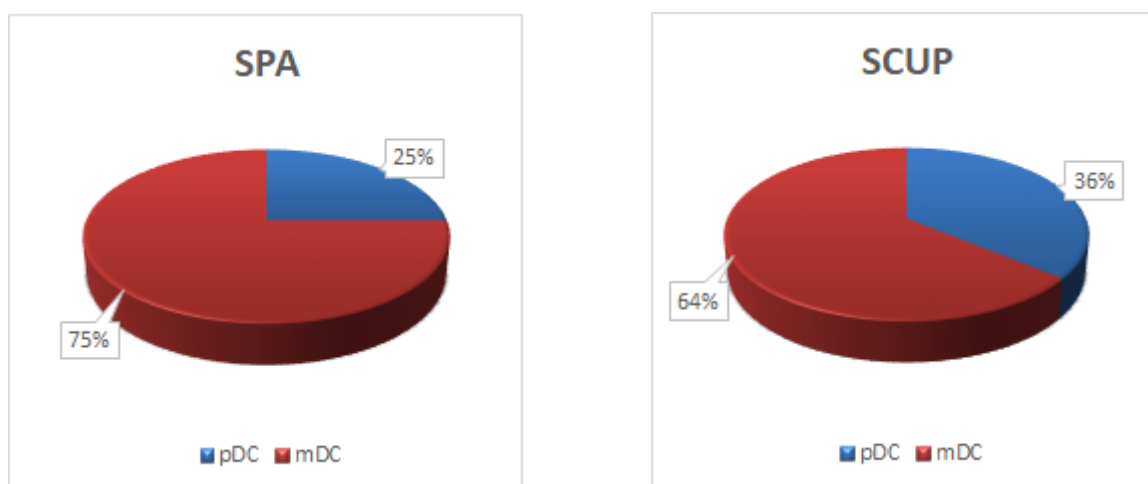


Figura 11. Representação gráfica da distribuição das subpopulações de células dendríticas no SPA e no SCUP

Tabela 2. Distribuição de leucócitos e subpopulações no SCUP e SPA

POPULAÇÃO CELULAR (%)	SPA, mediana (variação)	SCUP, mediana (variação)	p
Neutrófilos	60% (35 a 70)	60% (25 a 78)	1
Neutrófilos imaturos (% dos neutrófilos)	0,2% (0 a 0,9)	5% (0 a 20)	<0,001
Eosinófilos	2% (0,2 a 5,6)	3% (0,7 a 9)	0,08
Monócitos totais	5,5% (3 a 8,4)	9% (2,6 a 23)	<0,001
Subpopulações de monócitos (% dos monócitos)			
Clássicos	77% (61 a 86)	89% (75 a 97)	<0,001
Intermediários	9% (6 a 24)	8% (2 a 22)	0,017
Não clássicos	11% (6 a 22)	3% (1 a 13)	<0,001
Linfócitos totais	30% (21 a 55)	26% (12 a 57)	0,052
Subpopulações de linfócitos (% dos linfócitos)			
Linfócitos T	75% (55 a 85)	61% (37 a 82)	0,0001
Linfócitos B	11% (7 a 21)	16% (4 a 31)	<0,0001
Células NK	11% (2 a 37)	20% (5 a 46)	<0,006
Subpopulações de linfócitos T (% dos linfócitos T)			
CD4+	60% (33 a 85)	68% (47 a 84)	0,001
CD8+	31% (12 a 60)	27% (13 a 47)	0,03
CD4+/CD8+	0,3% (0 a 0,9)	0,1% (0 a 1,4)	<0,0001
CD4-/CD8-	4% (1,4 a 10)	2,5% (1 a 5)	<0,0001
Subpopulações de células NK (% das células NK)			
CD56+/CD16+	96% (76 a 99)	93% (72 a 99)	0,03
CD56+/CD16-	4% (1,5 a 24)	7% (1 a 29)	0,03
Células dendríticas totais	0,33 (0,20 a 0,79)	0,22 (0,07 a 0,76)	<0,001
Subpopulações de células dendríticas (% das células dendríticas)			
pDC	25% (14 a 41)	36% (14 a 62)	<0,001
mDC	75% (59 a 87)	64% (38 a 89)	<0,001

Neutrófilos, eosinófilos, monócitos totais, linfócitos totais e células dendríticas totais estão expressos em porcentagem dos leucócitos.

SPA: sangue periférico de adultos saudáveis; SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

Tabela 3. Razões entre subpopulações de leucócitos encontradas no SCUP e SPA

RAZÃO	SPA, mediana (variação)	SCUP, mediana (variação)	p
Linfócitos T CD4:CD8	1,8 (0,5 a 6,4)	2,3 (1 a 6)	0,01
Células NK CD56+CD16+:CD56++CD16-	24 (3 a 66)	13,7 (2,5 a 75)	0,03
Monócitos Intermediários :não clássicos	7 (3 a 14)	28,3 (5,8 a 96)	<0,0001
Células dendríticas mDC:pDC	3 (1,4 a 5,9)	1,8 (0,6 a 7)	<0,0001

SPA: sangue periférico de adultos saudáveis; SCUP: sangue de cordão umbilical e placentário.

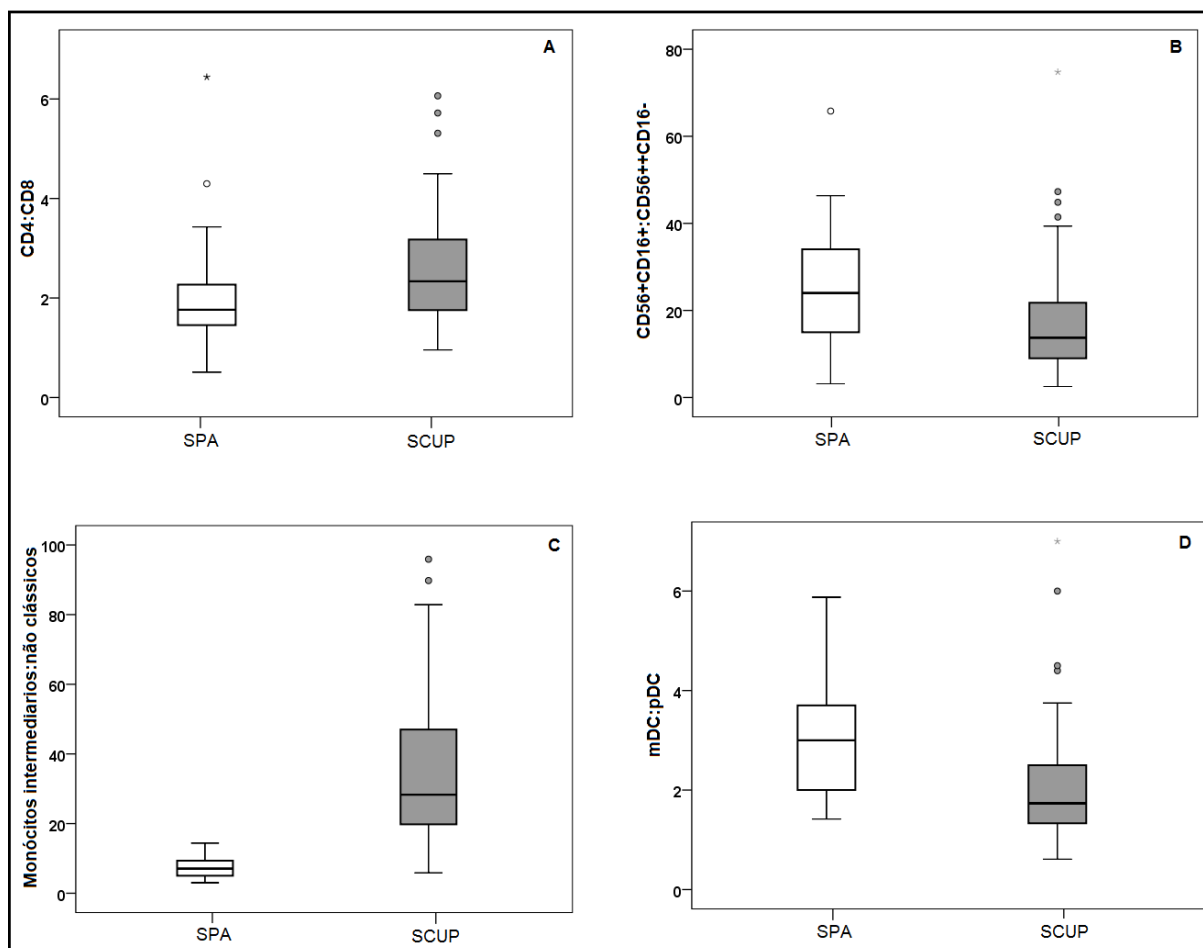


Figura 12. Representação gráfica das razões entre subpopulações de leucócitos encontradas no SPA e SCUP

A: razão entre linfócitos T CD4 e CD8; **B:** razão entre células CD56+CD16+ e 56++16-; **C:** razão entre monócitos intermediários e não clássicos; e **D:** razão entre as células dendríticas mDC e pDC.

5. DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Neste estudo quantitativo analítico comparamos os valores absolutos e a distribuição de subpopulações de leucócitos no SP de adulto (SPA) e no SCUP.

A contagem de leucócitos no SCUP é maior que no SPA, como já observado por outros autores (D'Arena et al., 1998; Hagendorens et al., 2003; Szabolcs et al., 2003; Prabhu et al., 2016). Dessa forma, as subpopulações de leucócitos em sua maioria também aparecem em quantidades superiores no SCUP, com exceções apenas na contagem de linfócitos T (quantidades similares de linfócitos T totais, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ e quantidades menores de linfócitos T duplo-positivos e duplo-negativos); células CD3+/CD56+ (quantidade menor) e DCs (quantidades similares de DCs totais e subpopulação mDC).

Esses resultados diferem um pouco de outros autores que encontraram no SCUP valores absolutos maiores das populações de linfócitos T totais e subpopulações CD4+, CD8+ (D'Arena et al., 1998; Prabhu et al., 2016) e duplo positiva (Prabhu et al., 2016). A população duplo-negativa não foi estudada por esses dois grupos. Além disso, outros autores observaram quantidades maiores de DCs totais no SCUP (Aldebert et al., 2006; Prabhu et al., 2016). Essas diferenças podem ser atribuídas a pequenas diferenças no desenho do *gate* ao realizar a análise dos dados de citometria.

Analizamos então a distribuição das subpopulações de leucócitos dentro de cada linhagem.

O receptor CD16 (FcγRIII) aparece na linhagem neutrofílica a partir do estágio de metamielócitos, atingindo sua expressão mais alta nos bastonetes e segmentados (Jacob et al., 2016). O SCUP apresentou porcentagens de neutrófilos CD16- muito superiores ao SPA, concordando com os resultados de Prabhu et al. (2016). Esse achado mostra que a maturação mieloide ainda não está concluída ao nascimento. Outra explicação seria que essas células imaturas estariam migrando do fígado e baço para a medula óssea, visto que a hematopoese na medula óssea é precedida pela hematopoese no fígado e baço fetais (Golub e Cumanó, 2013).

Os monócitos de SP podem ser divididos de acordo com a expressão de CD14 e CD16. Os monócitos clássicos são CD14+CD16- e correspondem a aproximadamente 90% dos monócitos circulantes. Podem ganhar CD16 enquanto

perdem CD14, originando inicialmente os monócitos intermediários CD14+CD16+ e, finalmente, os monócitos não clássicos CD14fraco/- CD16+ (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Observamos que no SCUP essa diferenciação monocítica está diminuída em relação ao SPA, pois são menores no SCUP as quantidades de monócitos não clássicos. Esses dados diferem de outras publicações em que os autores encontraram quantidades maiores (Prabhu et al., 2016) ou similares (Almeida et al., 2001; Crespo et al., 2004) de monócitos não clássicos no SCUP comparado ao SP de adulto.

Monócitos intermediários e não clássicos estão relacionados a processos inflamatórios e, portanto, aumentados nessas condições (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). O recém-nascido saudável não tem células inflamatórias nas proporções de um adulto, provavelmente por ainda não ter sido exposto a condições que desencadeiam reações inflamatórias importantes.

A quantidade de DCs totais encontradas no SCUP foi similar à encontrada no SPA, dado semelhante a alguns estudos anteriores (Almeida et al., 2001; Crespo et al., 2004) mas divergentes de alguns outros (Aldebert et al., 2007; Prabhu et al., 2016).

A subpopulação mDC foi encontrada em quantidades similares no SCUP e no SPA. Prabhu et al. (2016) e Crespo et al. (2004) também chegaram a esse resultado, entretanto, outros autores encontraram quantidades maiores de mDC (Szabolcs et al., 2003). A discordância de resultados pode talvez ser atribuída à diferença na técnica empregada, pois Szabolcs e colegas realizaram a contagem absoluta das subpopulações através do uso de *beads*.

O subtipo pDC, população com conhecida função tolerogênica, está em maior quantidade no SCUP que no SPA, confirmando resultados de outros autores (Szabolcs et al., 2003; Prabhu et al., 2016). Além disso, a análise da distribuição de DCs nos mostra que o SCUP, em relação ao SPA, tem maior proporção de pDC e menor de mDC, resultando em uma razão mDC:pDC menor no SCUP. Resultados semelhantes foram obtidos por Crespo et al. (2004) e Prabhu et al. (2016). Portanto, o SCUP tem maior quantidade e frequência de DC com função tolerogênica (pDC) e quantidade similar e menor frequência de DC com alta capacidade de ativar linfócitos T (mDC), o que pode ser uma vantagem quando se utiliza o SCUP no TCPH.

A maior quantidade absoluta e relativa de pDC no SCUP é um achado interessante. Gonçalves et al. (2015) mostraram que pacientes que receberam transplante alogênico e apresentaram altas contagens de células dendríticas, principalmente pDC, em três semanas após a enxertia, tiveram menor mortalidade não relacionada à recaída da doença, menor incidência de DECH aguda e melhor sobrevida global. Pacientes submetidos ao TCPH com células de SCUP poderiam, então, se beneficiar da maior quantidade e proporção de pDC encontradas nesta fonte de CPH. Tais benefícios podem ser decorrentes das funções tolerogênicas que apresentam as pDCs (Matta et al., 2010).

As DCs de cordão têm sido associadas a um fenótipo mais imaturo, com expressões diminuídas de CD80, CD86 e HLA-DR (Encabo et al., 2007). Além disso, há estudos que apontam para uma redução de capacidades funcionais, como síntese de citocinas e deficiência na ativação e/ou expressão de genes relacionados à síntese de citocinas. Estas características em conjunto refletem a imaturidade das DCs ao nascimento e também podem contribuir, em parte, para a menor ocorrência e gravidade de DECH observada nos transplantes com células de SCUP (Lin et al., 2012).

A distribuição dos linfócitos foi diferente no SCUP e no SPA. Enquanto o primeiro apresentou menos linfócitos T e mais linfócitos B e células NK, o segundo, ao contrário, tem mais linfócitos T e menos linfócitos B e células NK. A distribuição de linfócitos no SCUP encontrada neste estudo é semelhante ao que observaram Cairo et al. (2005), que analisaram subpopulações de linfócitos em 8 mil unidades de SCUP.

É interessante a observação de que embora o SCUP tenha maior número absoluto de linfócitos em relação ao SPA, os linfócitos T e suas subpopulações CD4 e CD8 foram encontrados em valores similares. Além disso, a porcentagem de linfócitos T do total de leucócitos da amostra, assim como dentre os linfócitos, foi menor no SCUP que no SPA.

Em nosso estudo, observamos entre os linfócitos T do SCUP maior porcentagem de linfócitos CD4+ e menor porcentagem da população CD8+. A razão CD4:CD8 no SCUP é, portanto, maior que no SPA, concordando (Prabhu et al., 2016) ou discordando (D'Arena et al., 1998) de outros grupos. Entretanto, temos que observar que D'Arena e colegas tiveram uma limitação técnica ao utilizar painel de

anticorpos com duas cores apenas, o que diminui a acurácia da análise das populações celulares.

A porcentagem de linfócitos T duplo-positivos e duplo-negativos foi menor no SCUP que no SPA. A pequena quantidade de linfócitos T duplo-negativos encontrada no SCUP vai de acordo com as observações de trabalho anterior do nosso grupo (Gonçalves et al., 2012), em que pacientes transplantados com células de SCUP precisaram de um tempo muito maior para recuperar linfócitos T duplo-negativos do que pacientes que receberam células progenitoras de outras fontes.

Além de aparecerem em frequências menores, os linfócitos T do SCUP são menos alorreativos. Sabe-se que no SCUP os linfócitos T expressam em sua maioria CD45RA, isoforma do antígeno CD45 que aparece em células *naïve*, com uma pequena parte expressando CD45RO, que é a isoforma expressa pelos linfócitos de memória. Esse fenótipo é totalmente diferente do que é encontrado nos linfócitos de SP adulto, em que há prevalência de linfócitos CD45RO. Linfócitos T de SCUP produzem menos citocinas, têm expressão baixa de CD40L e citotoxicidade mediada por Fas diminuída (D'Arena et al., 1998; López et al., 2014).

A alorreatividade dos linfócitos T, que em graus menores tem um efeito benéfico importante – o efeito GVL –, em graus maiores pode levar à DECH, grave complicação pós transplante (Yeh et al., 2012). Portanto, as características de imaturidade dos linfócitos T associadas à menor frequência destas células no SCUP podem explicar em parte a menor incidência e gravidade de DECH observada em transplantes realizados com esta fonte de CPH (Rocha, 2016).

A porcentagem de linfócitos B encontrados no SCUP foi maior que no SPA. Com o painel de AcMo utilizados neste estudo não foi possível caracterizar subpopulações de linfócitos B, mas autores que analisaram mais detalhadamente estas células em SCUP mostram que neste tipo de amostra há maior proporção de linfócitos B *naïve*, ou seja, com expressão de CD45RA e ausência de expressão de CD27, quando comparado ao SP de adulto (Paloczi et al., 1998; Ha et al., 2008), além de aumento na proporção de linfócitos B *naïve* imaturos CD10+ (Prabhu et al., 2016).

No SCUP há uma grande porcentagem de linfócitos B CD5+. Esses linfócitos são predominantemente linfócitos B transicionais imaturos, recém-saídos da medula

óssea. Esta população diminui com a idade e aparece em pequenas quantidades no sangue de adulto (Lundell et al., 2014).

Os linfócitos B de SCUP possuem capacidade diminuída de produção de imunoglobulinas comparados aos de sangue de adulto (Luchini et al., 2015) e uma grande parte produz IgM (imunoglobulina μ) polirreativa e não é capaz de produzir IgG (Paloczi et al., 1998). A ativação celular via CD40 é ineficiente. Essas características em conjunto provavelmente contribuem para a maior demora na recuperação das funções dos linfócitos B após TCPH com células de SCUP (Ha et al., 2008).

As células NK são as primeiras a se recuperar após o TCPH, atingindo valores normais em até três meses. Durante essa fase de recuperação há predomínio da população CD56++CD16- (Lucchini et al., 2015).

Observamos que o SCUP apresenta maior frequência de células NK comparado ao SPA, assim como foi observado por outros autores (Beck e Lam-Po-Tang, 1994; D'Arena et al., 1998; Dalle et al., 2005). Sabendo que as células NK são de grande importância para a ocorrência do efeito GVL, pode ser uma vantagem no contexto do TCPH que o SCUP tenha essas células em maiores quantidades. Em relação à distribuição dos subtipos de células NK, semelhante ao que foi encontrado por López et al. (2009), o SCUP apresentou menor frequência do subtipo CD56+CD16+ e maior frequência de CD56++CD16-, o que leva a uma diferença significativa na razão CD56+CD16+:CD56++CD16-, menor no SCUP, sugerindo maior imaturidade deste compartimento.

Embora as células NK de SCUP e de adulto tenham expressão de perforina, granzima e de receptores ativadores equivalentes, as primeiras têm atividade citotóxica reduzida (Lin et al., 2012). Uma característica que pode contribuir para essa condição é a capacidade reduzida que têm as células NK de SCUP de formar a sinapse imunológica actina F com células alvo, evento que ocorre logo após o contato da célula NK com a célula tumoral (Xing et al., 2010). Outra peculiaridade das células NK de cordão é a menor habilidade de secretar IFN γ (Luevano et al., 2012; López et al., 2014). Mesmo com essas diferenças, células NK de cordão parecem ter importante atividade GVL. Willemze et al. (2009) mostraram que pacientes com leucemia aguda que receberam transplante de SCUP com incompatibilidade KIR/ligante na direção enxerto contra hospedeiro (células NK do

doador não reconhecem ligante KIR no receptor) tiveram menor taxa de recaída e melhor sobrevida global e livre de doença.

Células CD3+/CD56+ são um subtipo de linfócito T maduro que compartilham características de células NK, como o marcador NK1.1, além de expressarem o receptor de células T (TCR). Caracteristicamente, a cadeia alfa da molécula TCR é invariante (Godfrey et al., 2004). Reconhecidas por seu fenótipo CD3+CD56+, foram encontradas em proporções menores no SCUP que no SPA. Outros autores obtiveram os mesmos resultados (Beck e Lam-Po-Tang, 1994; D'Arena et al., 1998; Theilgaard-Mönch et al., 2001; Dalle et al., 2012).

Podemos dizer então que embora o SCUP tenha maiores quantidades de quase todas as subpopulações de leucócitos quando comparado ao SPA, células de grande importância no contexto de ativação de resposta imune e reação inflamatória, como mDC e monócitos não clássicos, são encontrados no SCUP em quantidades similares ou menores que no SPA. Por outro lado, células com efeito benéfico no TCPH, como as pDC e as células NK, estão em maiores quantidades no SCUP que no SPA.

Tomados em conjunto, estes dados sugerem que o SCUP possua maiores quantidades de populações ainda em maturação e menos inflamatórias, como maiores quantidades de pDC, maiores quantidades de NK CD56++CD16-, menor proporção de linfócitos T CD8 – células citotóxicas - e menor diferenciação monocítica. Este perfil explicaria em parte a menor incidência e gravidade de DECH pós transplante de SCUP quando comparado ao de SP mobilizado.

6. CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

Caracterizamos a distribuição das subpopulações de linfócitos, células NK, células dendríticas e monócitos em 54 unidades de SCUP.

Quando comparamos os 54 SCUPs ao SP de 25 adultos saudáveis, observamos:

- Maior número absoluto de neutrófilos, monócitos clássicos e intermediários, linfócitos B, células NK e pDCs no SCUP.
- Contagens similares de linfócitos T nos dois grupos, mas com maior relação CD4:CD8 e menores quantidades de duplo-positivos e duplo-negativos no SCUP.
- Maior quantidade de células NK e menor relação CD56⁺16⁺:CD56⁺16⁻ no SCUP.
- Menor contagem de monócitos não clássicos no SCUP.
- Maior contagem de pDC no SCUP e quantidades similares de mDC nos dois grupos, gerando menor relação mDC:pDC.

Estes dados sugerem que o SCUP possua maiores quantidades de populações ainda em maturação e menos inflamatórias, além de menor diferenciação monocítica do que o SPA.

7. REFERÊNCIAS

7 – REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

Aldebert D, Diallo M, Niang M, Sarr D, Cisse C, Moreau JC, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in peripheral, placental and cord blood in African pregnant women. *J Reprod Immunol*. 2007;73(1):11-9.

Almeida J, Bueno C, Algueró MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol*. 2001;100(3):325-38.

Anderson BE, McNiff JM, Jain D, Blazar BR, Shlomchik WD, Shlomchik MJ. Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organ. *Blood*. 2005;105(5):2227-34.

Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *N Engl J Med*. 2007;357(15):1472-5.

Auletta JJ, Devine SM, Waller EK. Plasmacytoid dendritic cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation: benefit or burden? *Bone Marrow Transplant*. 2015;51(3):333-43.

Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood*. 2010;115(9):1843-9.

Beck R, Lam-Po-Tang PR. Comparison of cord blood and adult blood lymphocyte normal ranges: a possible explanation for decreased severity of graft versus host disease after cord blood transplantation. *Immunol Cell Biol*. 1994;72(5):440-4.

Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH, von Andrian UH. Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol*. 2006;7(10):1092-100.

Borràs FE, Matthews NC, Lowdell MW, Navarrete CV. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br J Haematol*. 2001;113(4):925-31.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 56 de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o regulamento técnico para o funcionamento dos laboratórios de processamento de células progenitoras hematopoéticas (CPH) provenientes de medula óssea e sangue periférico e bancos de sangue de cordão umbilical e

placentário, para finalidade de transplante convencional e dá outras providências. Diário Oficial da União; Poder Executivo. 2010 Dez 17; Seção 1:119-32.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3828-32.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(2):645-50.

Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, Defor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*. 2010;116(22):4693-9.

Cairo MS, Wagner EL, Fraser J, Cohen G, van de Ven C, Carter SL, et al. Characterization of banked umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells and lymphocyte subsets and correlation with ethnicity, birth weight, sex, and type of delivery: a Cord Blood Transplantation (COBLT) Study report. *Transfusion*. 2005;45(6):856-66.

Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26.

Crespo I, Paiva A, Couceiro A, Pimentel P, Orfão A, Regateiro F. Immunophenotypic and functional characterization of cord blood dendritic cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13(1):63-70.

D'Arena G, Musto P, Cascavilla N, Di Giorgio G, Fusilli S, Zendoli F, et al. Flow cytometric characterization of human umbilical cord blood lymphocytes: immunophenotypic features. *Haematologica*. 1998;83(3):197-203.

Dalle JH, Menezes J, Wagner E, Blagdon M, Champagne J, Champagne MA, et al. Characterization of cord blood natural killer cells: implications for transplantation and neonatal infections. *Pediatr Res*. 2005;57(5 Pt 1):649-55.

Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sörensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol*. 2008;9(5):551-7.

Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, et al. Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol*. 2004;172(12):7393-8.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-

3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000;165(11):6037-46.

Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, Kurtzberg J, Scaradavou A, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet.* 2007;369(9577):1947-54.

Encabo A, Solves P, Carbonell-Uberos F, Miñana MD. The functional immaturity of dendritic cells can be relevant to increased tolerance associated with cord blood transplantation. *Transfusion.* 2007;47(2):272-9.

Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993;82(10):3170-6.

Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, et al. Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 2003;102(3):814-9.

Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(8):594-606.

Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009;44(10):621-6.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med.* 1989;321(17):1174-8.

Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica.* 2009;94(4):451-4.

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):231-7.

Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis.* 2013;51(4):226-31.

Gonçalves MV, Yamamoto M, Kimura E, et al. Low Counts Of Natural Killer Cells CD56 bright CD16 negative After Engraftment Are Associated With Worse Survival In Patients Receiving Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood.* 2013; 122:4625.

Gonçalves MV, Yamamoto M, Colturato VAR, Souza MP, Mauad M, Ikoma MV et al. Low counts of CD4-CD8- T-cells during the first weeks after umbilical cord blood transplant [abstract]. In: 38th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation; 2012 Apr 1-4; Geneva, Switzerland. *Bone Marrow Transplantation*; 2012 (47): S284.

-
- Gonçalves MV, Yamamoto M, Kimura EY, Colturato VA, de Souza MP, Mauad M, et al. Low Counts of Plasmacytoid Dendritic Cells after Engraftment Are Associated with High Early Mortality after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(7):1223-9.
- Ha YJ, Mun YC, Seong CM, Lee JR. Characterization of phenotypically distinct B-cell subsets and receptor-stimulated mitogen-activated protein kinase activation in human cord blood B cells. *J Leukoc Biol*. 2008;84(6):1557-64.
- Hagendorens MM, Ebo DG, Schuerwegh AJ, Huybrechts A, Van Bever HP, Bridts CH, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(5):633-9.
- Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(5):547-54.
- Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, et al. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood*. 2005;105(12):4878-84.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer [Internet]. Acesso em 2017 Jul 23. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/orientacoes/site/home/rede_brasilcord
- Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
- Jacob MC, Souvignet A, Pont J, Solly F, Mondet J, Kesr S, et al. One tube with eight antibodies for 14-part bone marrow leukocyte differential using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;92(4):299-309.
- Korkosz M, Bukowska-Strakova K, Sadis S, Grodzicki T, Siedlar M. Monoclonal antibodies against macrophage colony-stimulating factor diminish the number of circulating intermediate and nonclassical (CD14(++)CD16+)/CD14(+)CD16(++) monocytes in rheumatoid arthritis patient. *Blood*. 2012;119(22):5329-30.
- Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. *Clin Immunol Immunopathol*. 1989;52(1):48-60.
- Leary AG, Ogawa M, Strauss LC, Civin CI. Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J Clin Invest*. 1984;74(6):2193-7.
- Lemarie C, Esterni B, Calmels B, Dazey B, Lapierre V, Lecchi L, et al. CD34(+) progenitors are reproducibly recovered in thawed umbilical grafts, and positively

influence haematopoietic reconstitution after transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(8):453-60.

Lin SJ, Yan DC, Lee YC, Hsiao HS, Lee PT, Liang YW, et al. Umbilical cord blood immunology: relevance to stem cell transplantation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42(1):45-57.

López MC, Palmer BE, Lawrence DA. Phenotypic differences between cord blood and adult peripheral blood. *Cytometry B Clin Cytom.* 2009;76(1):37-46.

López MC, Palmer BE, Lawrence DA. Naïve T cells, unconventional NK and NKT cells, and highly responsive monocyte-derived macrophages characterize human cord blood. *Immunobiology.* 2014;219(10):756-65.

Lorenzi, Therezinha F. Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica. 4ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2006.

Lucchini G, Perales MA, Veys P. Immune reconstitution after cord blood transplantation: peculiarities, clinical implications and management strategies. *Cytotherapy.* 2015;17(6):711-22.

Luevano M, Daryouzeh M, Alnabhan R, Querol S, Khakoo S, Madrigal A, et al. The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation. *Hum Immunol.* 2012;73(3):248-57.

Lundell AC, Johansen S, Adlerberth I, Wold AE, Hesselmar B, Rudin A. High proportion of CD5+ B cells in infants predicts development of allergic disease. *J Immunol.* 2014;193(2):510-8.

MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002;100(13):4512-20.

Mascanfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, et al. IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol.* 2013;14(10):1054-63.

Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CI, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol.* 2009;182(11):6815-23.

Matta BM, Castellana A, Thomson AW. Tolerogenic plasmacytoid DC. *Eur J Immunol.* 2010;40(10):2667-76.

Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 2015;5:13886.

Murphy WJ, Bennett M, Kumar V, Longo DL. Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow

transplantation. *J Immunol.* 1992;148(9):2953-60.

Murphy WJ, Kumar V, Bennett M. Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells. Differences in kinetics and target antigens recognized. *J Exp Med.* 1987;166(5):1499-509.

Nakahata, T e Ogawa, M. Hemopoietic Colony-forming Cells in Umbilical Cord Blood with Extensive Capability to Generate Mono- and Multipotential Hemopoietic Progenitors. *The Journal of Clinical Investigation.* Volume 70, 1324-1328, 1982.

Narimatsu H, Miyakoshi S, Yamaguchi T, Kami M, Matsumura T, Yuji K, et al. Chronic graft-versus-host disease following umbilical cord blood transplantation: retrospective survey involving 1072 patients in Japan. *Blood.* 2008;112(6):2579-82.

Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GVL effect. *Blood.* 2005;105(10):4135-42.

Paloczi K, Batai A, Gopcsa L, Ezsi R, Petranyi GG. Immunophenotypic characterisation of cord blood B-lymphocytes. *Bone Marrow Transplant.* 1998;22 Suppl 4:S89-91.

Plantinga M, de Haar C, Nierkens S, Boelens JJ. Dendritic Cell Therapy in an Allogeneic-Hematopoietic Cell Transplantation Setting: An Effective Strategy toward Better Disease Control? *Front Immunol.* 2014;5:218.

Prabhu SB, Rathore DK, Nair D, Chaudhary A, Raza S, Kanodia P, et al. Comparison of Human Neonatal and Adult Blood Leukocyte Subset Composition Phenotypes. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162242.

Reddy P, Maeda Y, Liu C, Krijanovski OI, Korngold R, Ferrara JL. A crucial role for antigen-presenting cells and alloantigen expression in graft-versus-leukemia responses. *Nat Med.* 2005;11(11):1244-9.

Reddy V, Iturraspe JA, Tzolas AC, Meier-Kriesche HU, Schold J, Wingard JR. Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death, and acute graft-versus-host disease. *Blood.* 2004;103(11):4330-5.

Reizis B. Classical dendritic cells as a unique immune cell lineage. *J Exp Med.* 2012;209(6):1053-6.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999;283(5405):1183-6.

Rocha V. Umbilical cord blood cells from unrelated donor as an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation in children and adults. *Semin Hematol.* 2016;53(4):237-45.

Rocha V, Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(2):207-14.

Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(16):1512-20.

Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*. 1993;81(7):1679-90.

Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, et al. Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 1999;94(1):333-9.

Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, et al. Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood*. 2007;110(1):433-40.

Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, et al. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1995;85(10):2910-7.

Sarvaria A, Jawdat D, Madrigal JA, Saudemont A. Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017;8:329.

Seber, A. O transplante de células-tronco hematopoéticas na infância: situação atual e perspectivas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31 (1):59-67.

Sela U, Olds P, Park A, Schlesinger SJ, Steinman RM. Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *J Exp Med*. 2011;208(12):2489-96.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(3):151-61.

Simonetta F, Alvarez M, Negrin RS. Natural Killer Cells in Graft-versus-Host-Disease after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*. 2017;8:465.

Steinbrink K, Mahnke K, Grabbe S, Enk AH, Jonuleit H. Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? *Hum Immunol*. 2009;70(5):289-93.

Steinman RM. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:1-22.

Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine

lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*. 2007;204(8):1775-85.

Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells*. 2003;21(3):296-303.

Takenaka MC, Quintana FJ. Tolerogenic dendritic cells. *Semin Immunopathol*. 2017;39(2):113-20.

Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*. 2009;227(1):75-86.

Theilgaard-Mönch K, Raaschou-Jensen K, Palm H, Schjødt K, Heilmann C, Vindeløv L, et al. Flow cytometric assessment of lymphocyte subsets, lymphoid progenitors, and hematopoietic stem cells in allogeneic stem cell grafts. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28(11):1073-82.

Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol*. 2003;64(12):1144-51.

Ueno H, Klechevsky E, Schmitt N, Ni L, Flamar AL, Zurawski S, et al. Targeting human dendritic cell subsets for improved vaccines. *Semin Immunol*. 2011;23(1):21-7.

Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(7):543-55.

Waller EK, Logan BR, Harris WA, Devine SM, Porter DL, Mineishi S, et al. Improved survival after transplantation of more donor plasmacytoid dendritic or naïve T cells from unrelated-donor marrow grafts: results from BMTCTN 0201. *J Clin Oncol*. 2014;32(22):2365-72.

Willemze R, Rodrigues CA, Labopin M, Sanz G, Michel G, Socié G, et al. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia*. 2009;23(3):492-500.

Xing D, Ramsay AG, Gribben JG, Decker WK, Burks JK, Munsell M, et al. Cord blood natural killer cells exhibit impaired lytic immunological synapse formation that is reversed with IL-2 exvivo expansion. *J Immunother*. 2010;33(7):684-96.

Yeh SP, Liao YM, Lo WJ, Lin CL, Bai LY, et al. Kinetics of T Helper Subsets and Associated Cytokines Correlate Well with the Clinical Activity of Graft-Versus-Host Disease. *PLoS ONE*. 2012;7(9): e44416.

Yoo KH, Lee SH, Kim HJ, Sung KW, Jung HL, Cho EJ, et al. The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated

cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39(9):515-21.

Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood.* 2010;115(2):274-81.

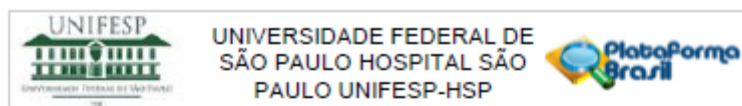
Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80.

Zlotnikov-Klionsky Y, Nathansohn-Levi B, Shezen E, Rosen C, Kagan S, Bar-On L, et al. Perforin-Positive Dendritic Cells Exhibit an Immuno-regulatory Role in Metabolic Syndrome and Autoimmunity. *Immunity.* 2015;43(4):776-87.

ANEXOS

Anexos

Carta de aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de São Paulo



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS NATURAL KILLER EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

Pesquisador: MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 00777612.0.0000.5505

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.232.277

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda para apresentação de nova versão do TCLE conforme solicitação da Instituição co-participante.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentação de emenda para envio de nova versão do TCLE.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

sem riscos associados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O TCLE enviado em 25/08/15 foi alterado por solicitação da Instituição co-participante. Foi incluída a informação do motivo de escolha do participante e a informação de que a não participação ou a desistência de participação não prejudicarão o tratamento e acompanhamento do paciente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nova versão de TCLE apresentada de forma adequada

Recomendações:

sem recomendações adicionais

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5530-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.232.277

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências. EMENDA aprovada

Considerações Finais a critério do CEP:

- O parecer do relator foi acatado pelo colegiado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	img003.pdf	21/03/2012 18:30:45		Aceito
Outros	188 PB PRE ANALISE - Miriam Cristina.docx	09/04/2012 18:19:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Banco de Cordão.doc	31/05/2012 20:29:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE doador banco de sangue.docx	31/05/2012 20:29:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE doador de sangue periférico mobilizado e medula.docx	31/05/2012 20:37:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta de aceite HSL.pdf	23/12/2014 11:00:18		Aceito
Outros	MCRB329 Aprovação Avap.pdf	23/12/2014 11:00:42		Aceito
Outros	Declarações HSL.pdf	19/02/2015 14:25:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto sangue de cordão CEP.pdf	19/02/2015 14:27:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_crianca_controle_normal.docx	25/08/2015 12:10:01	MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA	Aceito
Outros	Justificativa_de_alteracoes.docx	04/09/2015 12:49:19	MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA	Aceito
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_578211	04/09/2015		Aceito

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.023-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.cepunifesp@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.232.277

Básicas do Projeto	E2.pdf	12:51:15		Aceito
--------------------	--------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 17 de Setembro de 2015

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.025-061
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: secretaria.opunifesp@gmail.com

Carta de aprovação do Comitê de Ética do Hospital Sírio Libanês

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS NATURAL KILLER EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO

Pesquisador: MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 00777812.0.3001.5461

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP/EPM

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.234.792

Apresentação do Projeto:

Esta Emenda foi criada pois o TCLE enviado em 25/08/15 foi alterado por solicitação da Instituição co-participante. Foi incluída a informação do motivo de escolha do participante e a informação de que a não participação ou a desistência de participação não prejudicarão o tratamento e acompanhamento do paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar as subpopulações de células dendríticas e linfócitos NK em unidades de sangue de cordão umbilical; 2. Comparar as subpopulações de células dendríticas e linfócitos NK de sangue de cordão umbilical com as de sangue periférico materno, de adulto e criança saudáveis e sangue periférico mobilizado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já foram avaliados anteriormente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não Há

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não Há

Endereço: Rua Peixoto Gomide, 316 - 7º andar
Bairro: Jardim Paulista CEP: 01409-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3394-5701 E-mail: cepesq@hsf.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 1.234.792

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda do projeto cadastrado no CEPesq como HSL 2015-33, aprovado nesta data (aprovado em 18/09/2015) conforme as versões descritas abaixo:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para criança doadora de medula óssea.
- Justificativa para as alterações.

Lembramos que o pesquisador deverá manter o CEPesq informado sobre o andamento de sua pesquisa através do envio de relatórios parciais (semestrais) e final. Caso haja alterações no cronograma do estudo, por favor, submeter atualização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Folha de Rosto	img003.pdf	21/03/2012 18:30:45		Aceito
Outros	188 PB PRE-ANALISE - Miriam Cristina.docx	09/04/2012 18:19:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE - Banco de Cordão.doc	31/05/2012 20:29:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE doador banco de sangue.docx	31/05/2012 20:29:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE doador de sangue periférico mobilizado e medula.docx	31/05/2012 20:37:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta de aceite HSL.pdf	23/12/2014 11:00:18		Aceito
Outros	MCRB329 Aprovação Avap.pdf	23/12/2014 11:00:42		Aceito
Outros	Declarações HSL.pdf	19/02/2015 14:25:47		Aceito
Projeto Detalhado	Projeto sangue de cordão CEP.pdf	19/02/2015		Aceito

Endereço: Rua Pelvoto Gomide, 316 - 7º andar
Bairro: Jardim Paulista CEP: 01.409-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3394-5701 E-mail: cepesq@hsl.org.br

HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS /
SOCIEDADE BENEFICENTE DE
SENHORAS



Continuação do Parecer: 1.234.792

/ Brochura Investigador	Projeto sangue de cordão CEP.pdf	14:27:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_crianca_controle_normal.docx	25/08/2015 12:10:01	MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA	Aceito
Outros	Justificativa_de_alteracoes.docx	04/09/2015 12:49:19	MIRIAM CRISTINA RODRIGUES BARBOSA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_578211_E2.pdf	04/09/2015 12:51:15		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Setembro de 2015

Assinado por:
Bernardo Garicochea
(Coordenador)

Endereço: Rua Peloto Góndi, 316 - 7º andar
Bairro: Jardim Paulista CEP: 01.409-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3394-5701 E-mail: cepesq@hsf.org.br

Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participante: doador de sangue

Origem: Hemocentro do Hospital São Paulo

Título do Projeto: “ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS *NATURAL KILLER* EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO”

O transplante de células progenitoras hematopoéticas, conhecido também como transplante de medula óssea, é um procedimento para o tratamento de doenças hematológicas. O sangue de cordão umbilical e placentário vem sendo utilizado com sucesso como substituto da medula óssea neste tipo de transplante.

No sangue existem vários tipos de glóbulos brancos, que são as células responsáveis pela defesa do organismo. Entre eles, estão as células dendríticas e os linfócitos *natural killer*. O sangue de cordão umbilical e placentário também apresenta estas mesmas células, entretanto, elas são mais imaturas. Tais células são importantes para o resultado do transplante, pois desempenham papel fundamental na doença do enxerto contra o hospedeiro, que é uma complicação que pode ocorrer após o transplante. Também são importantes no combate às infecções que podem acometer pacientes que receberam transplante.

Estas informações estão sendo fornecidas para a sua participação voluntária nesta pesquisa, que tem como objetivo estudar as células dendríticas e os linfócitos *natural killer* do sangue de cordão e compará-los com as células do sangue de adulto e criança saudáveis.

Neste estudo, o seu sangue será colhido junto com a coleta que já estava programada para ser feita no momento da doação voluntária de sangue para o banco de sangue, não sendo necessário você vir ao hospital ou ser submetido a punções além do que já estava previsto. A medida das células dendríticas e dos linfócitos *natural killer* será feita através de um método sofisticado de análise celular (imunofenotipagem por citometria de fluxo).

Em qualquer etapa do estudo, você poderá receber toda informação necessária quanto ao andamento do estudo ou qualquer dúvida que possa aparecer com a biomédica Míriam Cristina Rodrigues Barbosa na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, localizada à Rua Dr. Diogo de Faria, 824, 3º andar - São Paulo-SP. Fone: (11)5576-4240. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571-1062, Telefone 5571-1062 – E-mail: cepunifesp@epm.br

As informações obtidas serão analisadas sem a divulgação da identificação dos doadores.

Não há despesas pessoais para participação em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, desde que comprovado, você tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Os resultados obtidos serão utilizados apenas nesta pesquisa. O sangue colhido poderá ser guardado para análises posteriores, desde que essa análise seja permitida pelo Conselho de Ética em Pesquisa (CEP).

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações contidas na carta informativa que li ou que leram para mim, referentes ao trabalho “Estudo das subpopulações de células dendríticas e linfócitos *natural killer* em sangue de cordão umbilical e placentário”. Ficaram claros para mim os propósitos do trabalho, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, e a garantia de acesso ao tratamento necessário nesta instituição. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, podendo retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

____/____/____ RG _____ Data: _____
Assinatura do Participante

____/____/____ RG _____ Data: _____
Assinatura da Testemunha

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação nesse estudo.

Assinatura do Pesquisador Responsável

São Paulo, SP

Data: ____/____/____

Solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido do Hospital Sírio Libanês



HOSPITAL SÍRIO-LIBANÊS

São Paulo, 05 de novembro de 2014.

Ilmo Sr. Coordenador
Dr. Álvaro Sadek Sarkis
Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Sírio Libanês

Protocolo: MCRB329

Pesquisador: Celso Arrais Rodrigues da Silva

Assunto: Solicitação de Dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Eu, Celso Arrais Rodrigues da Silva, Pesquisador responsável pelo Projeto de Pesquisa: "ESTUDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS E LINFÓCITOS NATURAL KILLER EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO" a ser conduzido no Hospital Sírio Libanês, por este termo, solicito ao Comitê de Ética desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois ao doarem o sangue de cordão do recém-nascido para o Banco de Sangue de Corão Umbilical e Placentário as mães assinam um termo de consentimento livre e esclarecido que inclui autorização para utilização do sangue doado em projetos de pesquisa aprovados pelo comitê de ética do hospital ou maternidade vinculado ao Banco de Sangue de Corão Umbilical e Placentário.

Comprometo-me a preservar a privacidade dos sujeitos de pesquisa, garantindo que os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para a execução do projeto em questão, e que as informações divulgadas, de maneira nenhuma identifiquem o sujeito de pesquisa.

Esperamos ter atendido satisfatoriamente às exigências desse Comitê, aguardamos retorno.

Atenciosamente,

Celso Arrais Rodrigues da Silva

Pesquisador Principal

Rua Dona Adma Jafet, 91 Bela Vista - CEP 01308-000 São Paulo/SP
www.hospitalsiriolibanes.org.br

Bibliografia consultada

Bibliografia consultada

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª. Edição. São Paulo, 2005.

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2a ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited 2017 Mai 01]. Available from <http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertacoes>