



Caro Colega,

Nos últimos 30 anos, uma parcela significativa e crescente da comunidade científica em todo o mundo tem se dedicado a tentar compreender o que são, como funcionam e quais as potenciais aplicações terapêuticas das células-tronco (CTs). A utilização das CTs hematopoiéticas para tratamento das afecções hematológicas e imunológicas está bem estabelecida há mais de 20 anos. No entanto, o número de células-tronco hematopoiéticas (CTHS) disponíveis para transplante ainda constitui uma barreira à ampla utilização do sangue do cordão umbilical para pacientes de maior peso corporal, especialmente os adultos. Uma das alternativas encontradas é a utilização de duas unidades de cordão para um mesmo paciente, o chamado transplante de duplo cordão.

Recentemente um grupo de pesquisadores do maior centro mundial de tratamento do câncer apresentou dados preliminares de um estudo sobre utilização de duplo transplante com foco no aumento do número de CTHs disponíveis através do cultivo ex vivo com células-tronco mesenquimais. Este é mais um contundente ensaio atestando o futuro promissor das mesenquimais como verdadeiros coringas biológicos, auxiliando na melhora da enxertia pós-transplante de CTHs derivadas do sangue do cordão umbilical.

Através do Stem Cell Review, a Cordvida vem mantendo seu compromisso com a atualização da comunidade médica na área de terapia celular células-tronco, escolhendo alguns dos mais relevantes artigos científicos para compartilhar com nossos colegas.

Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture.

N Engl J Med. 2012 Dec 13;367(24):2305-15.

de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, Alousi A, Saliba R, McMannis JD, Kaur I, Kebriaei P, Parmar S, Popat U, Hosing C, Champlin R, Bollard C, Molldrem JJ, Jones RB, Nieto Y, Andersson BS, Shah N, Oran B, Cooper LJ, Worth L, Oazilbash MH, Korbling M, Rondon G, Ciurea S, Bosque D, Maewal I, Simmons PJ, Shpall EJ.

Enxertia de SCU umbilical com co-cultura ex vivo de células-tronco mesenquimais.

O sangue de cordão umbilical (SCU) é uma fonte atraente de reconstituição hematopoética para pacientes que não possuem um doador HLA compatível na família. Apesar das vantagens oferecidas pelo transplante de SCU, tal como o uso de um aloenxerto congelado, prontamente disponível, para pacientes que são de grupos étnicos minoritários e com acesso limitado a doadores adultos, a utilidade clínica do sangue de cordão em adultos tem sido limitada pelo relativamente baixo número de células progenitoras hematopoiéticas em uma unidade de SCU. A enxertia retardada ou falha de pega de neutrófilos e plaquetas com SCU pode resultar em um aumento do risco de complicações ou de morte relacionadas com o transplante e em aumento nos custos nos cuidados de saúde, em comparação com o transplante de células progenitoras da medula óssea ou do sangue periférico.

O transplante de duas unidades de sangue de cordão ampliou o seu uso para adultos, mas a enxertia permanece inferior à obtida com células-tronco da medula óssea ou do sangue periférico. Desta maneira, o nosso grupo tem focado na expansão ex vivo de células do SCU para aumentar o número de precursores mieloides e megacariocíticos após tratamento mieloablativo. As culturas em suspensão de células mononucleares de SCU, sem o uso de seleção por CD34 resulta em mínima, se alguma, expansão de células nucleadas ou células progenitoras. Em nossa experiência, seleção por CD34 de células de SCU congelado resultou em baixas purezas e expansão ruim. Nós já havíamos demonstrado que a expansão de células progenitoras hematopoéticas não-fracionadas do SCU é acentuadamente aumentada pela co-cultura com células-tronco mesenquimais (CTMs). Estes dados sugerem que as CTMs fornecem sinais moleculares vitais para a expansão ex vivo, que estão ausentes em sistemas de expansão com base em cultura de suspensão de células progenitoras hematopoiéticas com citocinas isoladamente.

Relatamos um grupo de 31 adultos com neoplasias hematológicas que receberam transplantes de medula de sangue de 2 unidades de cordão umbilical, uma das quais continha SCU que foi expandido ex vivo, em co-cultura com CTMs alogênicas. Oitenta pacientes cujos dados foram relatados ao Centro Internacional de Pesquisa de Transplante de Sangue e Medula Óssea (CIBMTR) e que receberam transplantes de 2 unidades não-manipuladas de SCU foram utilizados como controle, como também foram um grupo separado de 60 controles, tratados no MD Anderson Cancer Center (MDACC).



Métodos .

Pacientes de 18 a 65 anos com câncer hematológico, que necessitavam de um doador HLA compatível, foram matriculados no MDACC entre agosto de 2007 e fevereiro de 2010, depois de fornecer consentimento informado por escrito. A inscrição significava receber 2 unidades de SCU, cada uma contendo mais do que 1,5 x 107 células nucleadas por quilograma de peso corporal, que eram compatíveis em quatro ou mais loci HLA por tipagem de média resolução para os alelos HLA de classe I (A e B) e de alta resolução para HLA de classe II DRB1.

Co-cultura de células mononucleares do SCU e mesenquimais

Para o grupo inicial de sete pacientes, um membro haploidêntico da família foi o doador de células mesenquimais, isoladas a partir de 100 mL de medula e cultivadas em frascos com 50 mL de meio essencial mínimo alfa suplementado com 20% de soro fetal bovino (Hyclone). As células não-aderentes foram removidas após 3 dias, e as células aderentes foram cultivadas até a sua confluência chegar a 70% ou mais. Em seguida, foram subcultivadas até que houvesse CTMs confluentes em 10 frascos. Catorze dias antes do transplante, a unidade de SCU com a dose mais baixa de células nucleadas foi descongelada, e frações iguais foram colocadas em cada um dos 10 frascos contendo as CTMs com 50 mL de soro meio contendo 100ng/mL de fator de células-tronco, ligante FLT3, trombopoetina, e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF).

Após 7 dias de co-cultivo, as células não-aderentes foram transferidas para 10 bolsas de cultura de 1 litro, contendo 450 mL de meio de cultura com citocinas e cultivadas durante mais 7 dias. No sétimo dia, os frascos receberam 50 mL do meio de cultura contendo as citocinas e cultivadas durante mais 7 dias. No 14ºdia de cultivo (dia 0 no que diz respeito ao transplante), todas as células não-aderentes dos frascos e bolsas foram reunidas, lavadas, e infundidas. Os critérios de liberação incluíam viabilidade celular (≥ 70%), teste negativo para endotoxina e para coloração de Gram.

A logística e o tempo necessário para gerar CTMs de um doador de medula membro da família limitaram o recrutamento para o estudo. Por tal motivo, foram avaliadas CTMs de grau clínico, fabricadas sob condições GMP (Mesoblast). As células foram selecionadas como uso do anticorpo monoclonal STRO-3 (específico para uma isoforma de fosfatase alcalina expressa por células mesenquimais) de aspirados de medula óssea obtidos a partir de doadores saudáveis. Um banco de células principal foi criado e as CTMs foram geradas, criopreservadas e testadas de forma abrangente para agentes infecciosos e para formação de tumores, de acordo com as orientações do FDA. As CTMs congeladas foram transportadas para o MDACC e mantidas em nitrogênio líquido até momento do uso. Nós observamos que um único frasco de CTMs STRO-3+ pode gerar 10 frascos de células em 4 dias, com resultados dos testes de expansão que não diferiram significativamente daqueles obtidos com as CTMs derivadas de um membro da família. Assim, nosso protocolo foi modificado para utilizar as CTMs STRO-3+ nos 24

pacientes subsequentes.

Imunofenotipagem e teste de formação de colônia _____

Células de SCU antes e depois da expansão foram analisadas por citometria de fluxo e por testes de unidades formadoras de colônias em cultura (CFU-C) para as células-tronco hematopoiéticas e células progenitoras, como descrito anteriormente.

Regime de condicionamento e Profilaxia para DECH ____

O regime de condicionamento ablativo consistiu em melfalano (140 mg/m2 de superfície corporal) 8 dias antes do transplante (dia -8), tiotepa (10 mg/Kg no dia -7), fludarabina (40 mg/m2 por dia) dos dias -6 ao -3, e globulina antitimocítica de coelho (1,25 mg/Kg no dia -4 e 1,75 mg/Kg no dia -3). A profilaxia contra doença de enxerto versus hospedeiro (DECH) incluiu tacrolimus (0,03 mg/Kg/dia nos dias -2 a +180) e micofenolato mofetil (MMF) (1 g 12/12 horas nos dias -2 a +100).

Transplante e Cuidados __

No dia do transplante, a unidade não-manipulada de SCU foi descongelada, lavada e administrada por via intravenosa, seguida pela infusão do SCU cujas células haviam sido expandidas. Todos os pacientes receberam G-CSF (5 mg/Kg/dia) do dia +1 até à recuperação de neutrófilos.

Recuperação hematopoiética _

O tempo para a enxertia de neutrófilos foi definido como o primeiro de três dias consecutivos com uma contagem absoluta de neutrófilos de 0,5x109/L ou superior, e o tempo para a pega plaquetária como o primeiro de 7 dias consecutivos, com uma contagem de plaquetas de 20x109/L ou superior, sem transfusão de plaquetas. O quimerismo no sangue periférico ou medula óssea foi documentado entre os dias +20 e +30, no dia +60, e depois a cada 3 meses, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), com conjuntos de primers flanqueando microssatélites repetitivos.

Comparação com Dados Históricos do CIBMTR e MDACC

Foram comparados os resultados de enxertia e sobrevida no grupo de pacientes que receberam SCU com células expandidas por co-cultura com CTMs STRO-3+ com os resultados de 80 pacientes que receberam duas unidades não-manipuladas de SCU entre 2008 e 2010 em 24 centros de transplante EUA e cujos dados foram relatados ao CIBMTR. Os controles foram pareados por idade, diagnóstico, estágio da doença, a intensidade do regime de condicionamento mieloablativo, e profilaxia do DECH com inibidor de calcineurina e MMF. O regime de condicionamento mais utilizado foi a irradiação corporal total (1320 cGy) em combinação com fludarabina e ciclofosfamida, seguido por regime contendo melfalano, fludarabina, e tiotepa. O tempo de acompanhamento médio de controles foi 6 meses (variando de 3 a 12). Também comparamos o grupo de estudo com controles do MDACC (adultos que receberam duas unidades não-manipuladas



de SCU após condicionamento mieloablativo entre 2001 e 2011). Os regimes de condicionamento mais utilizados foram tiotepa combinado com melfalano e fludarabina ou com clofarabina e bussulfano. O tempo de seguimento médio foi 7 meses (variando de 1 a 72).

Objetivos finais _

Os objetivos-finais primários foram viabilidade, segurança, incidência cumulativa de enxertia de neutrófilos e plaquetas, tempo médio para a recuperação de neutrófilos e de plaquetas entre os pacientes que alcançaram estes objetivos-finais, a proporção de pacientes em que houve transplante exitoso (tal como definido abaixo), e a incidência cumulativa de DECH aguda ou crônica. DECH aguda foi classificada de acordo com os critérios definidos em consenso. A DECH crônica foi diagnosticada quando os sinais clínicos estavam presentes ou surgiram pela primeira vez depois após o dia +100. Pelo fato de este ter sido um estudo pequeno, de curta duração, foi utilizada uma definição combinada antecipada para transplante bem-sucedido (enxertia de neutrófilos no dia +26, plaquetas no dia +60 e sobrevida no dia +100) e foram comparados receptores de transplante de SCU expandido com controles do CIBMTR e do MDACC.

Análise Estatística

As curvas cumulativas de incidência foram construídas com a utilização do método descrito por Gooley et al., sendo a morte considerada um evento concorrente. Os métodos de Fine e Gray foram utilizados para comparar as curvas cumulativas de incidência entre os grupos de pacientes. As percentagens de doentes nos quais a enxertia ocorreu em momentos específicos foram comparados entre os dois grupos, com o uso de teste-z com 2 amostras e teste de soma-Wilcoxon rank foi utilizado para comparar os receptores de SCU expandido e receptores de SCU não-manipulado com respeito a valores medianos.

Resultados

Expansão de SCU e infusão _

Após 14 dias de cultura, o total de células nucleadas foi multiplicado por um fator médio de 12,2, as células CD34+ foram ampliadas por um fator de 30,1 e as CFU-Cs expandiram num fator de 17,5. As unidades de CTMs do SCU expandido tiveram aumento na proporção de monócitos e granulócitos e diminuição na proporção de células T e B, em comparação com as unidades de SCU não-manipuladas. Megacariócitos e progenitores de plaquetas (células CD41a+/ CD61+) foram avaliados em um grupo de pacientes. Nas unidades de SCU não-manipuladas (recebidas por 15 pacientes), uma média de 202x106 células CD41a+/ CD61+ (variação de 94x106 a 308x106) foi encontrada em contagem por citometria de fluxo. Nas unidades de SCU expandido (recebida por 11 pacientes), o número médio de células CD41a+/ CD61+ foi 406x106 (variação de 50x106 a 1350x106). Os doentes receberam uma mediana de 5,08x106 células CD41a+/ CD61+ por quilograma a partir das unidades de SCU expandido com CTMs.

Não houve diferenças significativas na contagem de células nucleadas, células CD34+, CFU-Cs entre o grupo com células

de SCU expandidas em CTMs derivadas de membros da família e o grupo com células expandidas nas CTMs STRO-3+. O número de células CD34+/CD38- e células CD133+/CD33- diferiu significativamente de acordo com a fonte de SCU, com mais destes tipos de células no SCU expandido com CTMs STRO-3+ (p=0,02 e p=0,03, respectivamente). A expansão gerou uma mediana de 5,84 x107 células nucleadas/Kg, 0,95 x106 CD34+/Kg e 3,00 × x105 CFU-Cs/Kg. Estas doses foram superiores aos nossos transplantes anteriores com 2 unidades não-manipuladas de SCU. Para todas as unidades de SCU, a viabilidade celular foi superior a 70% e estavam negativos antes da infusão a coloração de Gram e os testes de endotoxina. Não houve eventos adversos graves relacionados com as infusões de SCU.

Recuperação de neutrófilos e plaquetas _

Um paciente morreu de sepse fúngica no dia +30, sem enxertia observável de neutrófilos ou plaquetas. Em pacientes nos quais a enxertia ocorreu, o tempo médio para a recuperação de neutrófilos foi de 15 dias (variação de 9 a 42) e o tempo médio de recuperação de plaquetas foi de 42 dias (intervalo, 15 a 62). Não houve diferenças significativas no tempo para enxertia de neutrófilos ou plaquetas entre os pacientes que receberam SCU expandido em co-culturas com mesenquimais derivadas de um membro da família e os que receberam SCU expandido com CTMs STRO-3+. Além disso, dentro das limitações da pequena amostra, o grau de compatibilização HLA entre doador e receptor não se correlacionou com a velocidade ou a frequência da enxertia.

Uma decisão foi tomada para continuar ao estudo com CTMs STRO-3+ em vez de CTMs de membro da família. Assim, restringimos nossa análise comparativa com os controles do CIBMTR para receptores de SCU expandido com CTMs STRO-3+. O tempo médio para o enxerto de neutrófilos foi de 15 dias nos receptores de SCU expandido versus 24 dias para os controles CIBMTR que receberam apenas SCU não-manipulado (p<0,001). O tempo médio para o enxerto de plaquetas foi de 42 dias nos receptores de SCU expandido versus 49 dias em controles (p=0,03).

No dia +26, a incidência cumulativa da enxertia de neutrófilos foi de 88% entre os receptores de SCU expandido, em comparação com 53% entre os controles CIBMTR (p<0,001). No dia +60, a incidência de enxertia de plaquetas foi 71% entre os receptores de SCU expandido, em comparação com 31% na coorte do CIBMTR (p<0,001). A dose de células nucleadas por quilograma nos receptores de SCU expandido se correlacionou com o tempo para a recuperação de neutrófilos (p=0,004). A dose de células CD34+ por quilograma nos receptores de SCU expandido também se correlacionou com o tempo de enxertia de neutrófilos (p=0,006). Para o objetivo-final composto de enxertia de neutrófilos ao dia +26, a enxertia de plaquetas ao dia +60 e de sobrevivência ao dia +100, as taxas de sucesso foram de 63% entre os receptores de SCU expandido versus 24% entre os controles CIBMTR (p<0,001) e 35% entre os controles do MDACC (p=0.03).

Quimerismo _

Vinte e oito pacientes que puderam ser avaliados



apresentaram quimerismo completo (100%), com uma ou duas unidades de SCU, nos compartimentos de células T e de células mieloides, entre os dias +21 e +30 após o transplante. Quinze dos 28 pacientes (54%) apresentaram evidência de hematopoiese unicamente a partir da unidade de SCU não-manipulado e 13pacientes (46%) tinham hematopoiese derivada de ambas as unidades (a unidade de SCU não-manipulada predominou em 9 pacientes e a unidade de SCU expandido predominou nos outros 4). Aos seis meses após o transplante, o SCU expandido estava presente em 13% dos pacientes, apesar de o SCU não-manipulado ser o predominante. A enxertia de longo prazo (> 1 ano) foi produzida primariamente pela unidade de SCU não-manipulado em todos os pacientes.

Nas unidades de SCU expandido, o número total de células nucleadas por quilograma de peso corporal se correlacionou com a velocidade de enxertia de neutrófilos (coeficiente de correlação de Spearman, -0.51, p=0,004), e o número de células CD34+ por quilograma também se correlacionou com a velocidade de enxertia de neutrófilos (coeficiente de correlação de Spearman, -0.48, p=0,006).

DECH aguda e crônica _

A incidência cumulativa de DECH aguda grau II a IV foi 42% e a incidência cumulativa de DECH grau III ou IV foi 13%; DECH crônica foi observada em 45% dos pacientes. Não houve diferenças significativas entre os receptores SCU expandido em CTMs STRO-3+ e os controles do CIBMTR ou MDACC no que diz respeito ao grau II a IV para DECH aguda ou à DECH crônica grau III ou IV.

Sobrevida e Causas de Morte _

Em um acompanhamento médio de 12 meses (intervalo de 6 a 20), 10 dos 31 pacientes de alto risco permaneceram vivos. As causas de morte entre os receptores de SCU expandido incluíram: recaída (4 pacientes), DECH (4), toxicidade induzida pela quimioterapia (2) e infecções (11). Infecções bacterianas ocorreram em 3 pacientes, viral em 1, e fúngicas em 5. A fonte da infecção permaneceu obscura em 2 pacientes.

Discussão _

Procuramos melhorar a hematopoese e a enxertia propagando progenitores hematopoiéticos derivados de SCU em co-culturas com CTMs alogênicas antes do transplante. Brunstein et al. relataram que, em 536 receptores adultos de 2 unidades não-manipuladas SCU, o tempo médio para a enxertia de neutrófilos foi 26 dias e o tempo médio para a enxertia de plaquetas foi 53 dias - intervalos significativamente maiores do que os observados em séries de receptores de células-tronco de medula óssea ou de sangue periférico. Nesta série de casos, verificou-se que os pacientes que receberam terapia mieloablativa seguida de 2 unidades de SCU, com uma unidade que continha o SCU expandido ex vivo em co-culturas com CTMs, levaram um tempo mais curto para a pega e apresentaram incidências cumulativas mais altas de enxertia de neutrófilos e plaquetas, em comparação com controles históricos e controles de outros locais, que receberam apenas SCU não-manipulado.

Nós atribuímos os resultados positivos de enxertia

ao aumento do número de progenitores mieloides e megacariocíticos comprometidos com a diferenciação no enxerto de SCU expandido, que foram capazes de pega rápida após o transplante. De fato, para cerca de metade dos pacientes avaliados, a pega de células expandidas foi associada à recuperação precoce de neutrófilos. Os nossos dados sugerem que as CTMs, ao recapitularem alguns dos sinais fisiológicos do nicho de células-tronco (ausentes nas culturas em suspensão), proporcionam condições que aumentam a sobrevivência e proliferação de células progenitoras do SCU, responsáveis pela repopulação precoce da medula óssea. Outra vantagem potencial de se transplantar uma unidade de SCU expandido e uma unidade não-manipulada de SCU é que esta abordagem garante recuperação hematopoética inicial precoce com a unidade de SCU expandido e a enxertia definitiva com a unidade de SCU não-expandido (que apresentava maior grau de compatibilização HLA). O processo de expansão parece favorecer um aumento das células capazes de repovoamento precoce. No entanto, porque o enxerto em longo prazo ficou a cargo uniformemente da unidade de SCU não-manipulada, deve também ser reconhecido que o processo de cultura parece esgotar as células capazes de repovoamento tardio/de longo prazo.

A incidência e gravidade da DECH foram semelhantes às de outros ensaios de transplante, com expansão ou não, de células de SCU. Durante a última década, diversas estratégias para expandir ex vivo progenitores de SCU têm sido investigadas, com pouco impacto na melhoria do tempo até a enxertia. Recentemente, no entanto, Delaney et al. investigaram a utilização de células progenitoras do SCU selecionadas via CD34 em cultura com fatores de crescimento, na presença do ligante para Notch. Eles relataram uma melhoria no tempo até a enxertia de neutrófilos, que foi semelhante à melhoria que nós observamos. Outras estratégias promissoras para melhorar a enxertia incluem a administração intraóssea de uma unidade de sangue de cordão único, a adição a uma única unidade de SCU não-manipulada de células progenitoras CD34+ de sangue periférico haploidênticas e a expansão de uma fração vde uma única unidade de SCU utilizando fatores de crescimento e um quelante de cobre. Outra abordagem potencialmente eficaz é a de aumentar a migração (homing) do SCU para a medula via fucosilação da unidade ou tratando-a com prostaglandina E2 antes do transplante. O nosso grupo optou em investigar a expansão de toda a fração de células mononucleares do SCU porque nos nossos estudos clínicos anteriores de expansão de células CD34+ do SCU demonstraram perdas celulares proibitivas com processo de enriquecimento imunomagnético.

Os nossos resultados apoiam a hipótese de que o transplante de células de SCU expandidas com CTMs encurta o tempo necessário para a recuperação de neutrófilos e plaquetas após transplante em adultos. A migração da técnica de cultura com CTMs de um familiar para co-cultura com CTMs STRO-3+ aumentou significativamente a viabilidade clínica de nossa estratégia sem comprometer a expansão do SCU. Novas comparações serão necessárias para confirmar os dados por nós observados.