

Laboratório de Produção de Componentes Sanguíneos e Medicina Regenerativa

Responsável: dra. Laura Mazzucco

SC Medicina Trasfusional

Agência hospitalar SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo

Alexandria - Itália

RecoveryCell - sistema de microaspiração multiradial de medula óssea autóloga (M-BMA) - Montado por: Joint Srl

O sistema ***RecoveryCell*** é um kit descartáveis constituídos essencialmente por ***Ago trocar CellColt*** projetado para a coleta de pequenas alíquotas (micro-retiradas) de medula óssea autóloga (BMA) utilizando diferentes níveis de aspiração multirradial através de um único local de acesso para a coleta. *RecoveryCell* pode potencialmente ser usado em qualquer local de origem da medula óssea (BM), mas as cristas ilíacas são recomendadas como local de amostragem para maior produção de células.

É uma técnica *one-step* que se baseia no uso de *Ago trocar CellColt* patenteado (MDL Srl) que permite, mediante um único acesso, uma amostragem multiradial para obtenção de medula óssea autóloga (BMA) para uso em ortobiologia. O procedimento de extração de BMA é realizado diretamente no *point of care*, após a preparação do local de extração de acordo com as técnicas de sedação padrão do paciente. Todo o procedimento (extração e aplicação) deve ocorrer em campo estéril e sem manipulação do produto.

RecoveryCell permite que se colete 5 mL de BMA do paciente. A microamostragem de medula pode ser utilizada na forma líquida ou adicionada a uma matriz biológica e aplicada no local de interesse.

A aspiração do BMA, graças à conformação estrutural da parte terminal do *ago trocar CellColt*, ocorre em quatro níveis diferentes e, portanto, permite uma coleta não estático, mas variável em um raio circunscrito do componente estroma medular.

O resultado é uma microamostra de BMA rica em células-tronco e progenitores celulares responsáveis por estimular o processo de reparação/regeneração dos tecidos ósseos e cartilaginosos.

Características do Ago trocar CellColt

Ago trocar CellColt é dotado de 12 furos distribuídos em forma de "espiral distal" nos 2,5 cm da ponta terminal, a cânula interna de sucção possui a ponta fechada para garantir apenas a sucção radial. Este desenho particular da agulha e em especial a sua ponta fechada, previne e reduz a diluição da micro-amostragem de BMA com o sangue periférico, recolhendo o material apenas na zona circunscrita do nicho medular, sem criar uma estimulação e a recuperação do sangue periférico adjacente.

Para maximizar a coleta de células, o trocarte é equipado com o sistema ***SLIDING BLOCK***, uma espécie de sistema de "gaveta" deslizante presente na alça do trocarte que permite que a cânula interna de sucção seja retraída para alinhar e abrir os orifícios em 4 níveis diferentes (antes do uso é recomendado lavar a agulha com solução de heparina (5.000 U / mL em cloreto de sódio)). Ao conectar a seringa de sucção (pré-carregada com 1mL de anticoagulante - Citrato de Sódio para evitar microcoágulos) à agulha do trocarte, pode-se prosseguir com a amostragem de BMA; a primeira microaspiração é de 2 mL e é obtida através dos 6 orifícios presentes nos 2 primeiros níveis, então, sem mover o trocarte do local de amostragem, pressionando o sistema de gaveta ***SLIDING BLOCK***, a cânula interna de sucção é retraída e realiza a segunda microaspiração de mais 2 mL de medula óssea dos 6 orifícios posicionados nos outros 2 níveis. O volume final coletado (cerca de 5 mL) maximiza, por meio desta técnica de sucção em dois níveis de profundidade no nicho medular, a recuperação da fração do caule sem contaminação do excesso de coleta de sangue. A micro-amostragem de BMA obtida através deste sistema está imediatamente pronta para uso.

Avaliação de desempenho do sistema

Considerando que o método possui variabilidade intrínseca devido à amostragem não padronizada e em parte pela idade e condição do paciente, produziu-se para avaliação 10 amostras de BMA com o sistema *RecoveryCell*. De cada uma das 10 retiradas foi amostrado 1 mL como material representativo para a execução das dosagens de verificação. Hemogramas completos foram realizados em todos para avaliar o número de células nucleadas (em milhões x mL) e a dosagem das células progenitoras formadoras de colônia (UFC) como indicadores da presença do componente-tronco. As dosagens de UFC (ensaio de clonogenicidade) são um dos métodos comumente usados para quantificar o número de progenitores ou células mesenquimais (MSCs) presentes na BMA, células de medula óssea são semeadas (1×10^6), cultivadas em condições adequadas por 14 dias e ao término do período as colônias celulares (aderentes ao plástico) presentes são coloridas e contadas. O sistema de sucção (agulha de trocarte) foi pré-tratado com solução de heparina e cloreto de sódio (proporção 1:10); no campo estéril a seringa de sucção ***VACLOK*** é pré-carregado com 1 mL de Citrato de Sódio para evitar micro-coágulos. Uma vez identificado o local de amostragem, o procedimento envolve a inserção do *Ago trocar CellColt* sob pressão e movimento de rotação até 3-4 cm dentro da crista ilíaca, então o estilete interno é removido e a cânula de sucção de ponta fechada inserida à qual a seringa está conectada ***VACLOCK*** pré-carregado com o anticoagulante. Prossegue-se com o ***SLIDING BLOCK*** aberto para a primeira microaspiração de 2 mL de BMA (volume total na seringa de aspiração com anticoagulante 3 mL); para a segunda microaspiração o sistema ***SLIDING BLOCK*** deve ser acionado (fechado) com uma leve pressão e então são aspirados mais 2 mL para atingir o total final de 5 mL.

Resultados

Para a avaliação foram analisados pacientes de uma faixa etária ampla (35 ± 10), mas nesses intervalos definidos mais idôneos para este tipo de tratamento; alíquotas do aspirado medular (1mL) foram processadas no laboratório imediatamente após a coleta; o volume da amostra foi fixado em 5 mL finais; os resultados para cada amostra estão descritos no Anexo 1.

As células isoladas apresentaram o comportamento típico das células-tronco mesenquimais, pois são capazes de proliferar em aderência ao plástico formando colônias (UFC).

Os resultados evidenciaram que na fração leucocitária a porcentagem de células nucleadas totais (linfócitos + monócitos) é de cerca de $36 \pm 6,6\%$ e destas, células com capacidade de tronco (UFC), são $15 \pm 13\%$.

Idade do paciente	35 ± 10
Volume retirado	5 mL
TNC %	$36 \pm 6,6$
PLT	167 ± 15 milhões /mL
UFC / mL	1962 ± 56
UFC / TNC %	15 ± 13
MSC x UFC /mL	98075 ± 2793

TNC = células nucleadas totais

UFC = células progenitoras formadoras de colônia

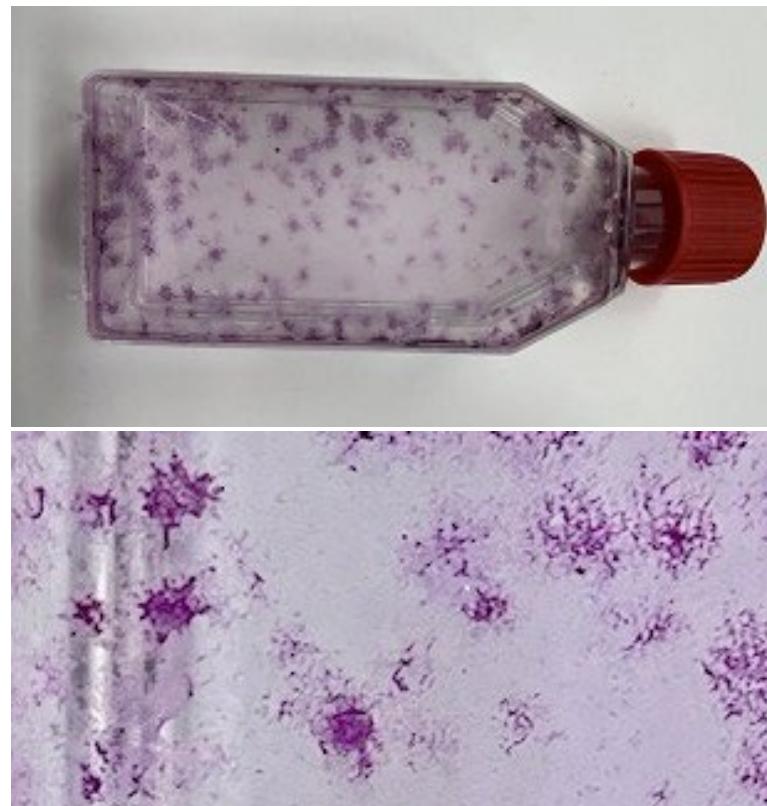
Conclusões

Este dispositivo permite coletar um produto rico em precursores do caule mesenquimal, sem a necessidade de processamento posterior. De fato, geralmente muitos sistemas de coleta de BMA requerem um grande volume de coleta, sem aumentar realmente a concentração de células progenitoras nucleadas no aspirado, mas simplesmente o nível de células nucleadas do sangue periférico (que contém muito poucas células-tronco/progenitoras) e portanto consegue que seja necessário uma manipulação mínima (fases de centrifugação) para obter um produto final enriquecido com células-tronco.

As vantagens da micro-retirada em *one step* são:

- a velocidade de execução do procedimento, sem sair do campo estéril, com redução do risco de possíveis contaminações;
- uma pequena quantidade de volume (5 mL) está disponível mesmo para procedimentos minimamente invasivos;

- a execução da amostragem através de um único local de entrada que reduz a morbidade para os pacientes;
- o fornecimento de BMA, não estático, mas variável dentro de um raio limitado, com memória mínima de sangue periférico.



As UFC coradas com Giemsa permitem avaliar o número de células com capacidade clonogênica. A intensidade da capação de corante destaca um alto número de células presentes

Em colaboração:

Diretor Dr. Danilo Chirillo

Divisão Ortopédica

Hospital Santo Spirito Casale Monferrato

ASL AL - AZIENDA SANITARIA LOCALE

[*Empresa Local de Saúde*]AL

ALEXANDRIA 28 de janeiro de 2022

[assinatura] Dra. Laura Mazzucco

Dott.ssa Laura Mazzucco



ANEXO 1

Amostra	Volume mL	WBC $10^6/\text{mL}$	GRC $10^6/\mu\text{L}$	PLT $10^6/\text{mL}$	TNC %	UFC / mL	UFC /TNC %
1	5	29,0	3,4	76	31	551	6
2	5	34,3	5,0	259	30	3361	33
3	5	25,7	4,3	141	37	1028	11
4	5	33,8	2,7	221	23	642	5
5	5	38,5	4,3	104	28	2503	24
6	5	39,3	3,5	172	27	1651	16
7	5	23,0	5,1	78	34	2346	29
8	5	16,2	3,0	260	39	292	4
9	5	20,7	6,7	53	40	2070	25
10	5	28,6	4,8	97	23	572	9

TNC = células nucleadas totais

UFC = células progenitoras formadoras de colônia

ALEXANDRIA 28 de janeiro de 2022