
TERAPIA CELULAR

TERAPIA CELULAR

111

ACUTE ADVERSE REACTIONS SECONDARY TO MESENCHYMAL STROMAL CELL INFUSIONS

Prata KL¹, Rodrigues MCO^{1,2}, De-Santis GC^{1,2}, Orellana MD^{1,2}, Moraes DA², Couri CEB², Junior RDRL³, Simões BP^{1,2}, Voltarelli JC^{1,2}, Covas DT^{1,2}

¹National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy, Center for Cell Therapy and Regional Blood Center, Ribeirão Preto, Brazil

²Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

³Department of Pediatrics, School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Introduction: Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) infusions for type 1 diabetes mellitus (T1DM) are a novel therapeutic approach aiming immune modulation and preservation of residual pancreatic beta cells. MSC infusions are being used in our institution to treat T1DM in an experimental protocol. Unlike most indications for MSC applications, T1DM patients are immunocompetent and do not have co-morbidities, therefore allowing identification of subtle acute adverse effects to cell infusions. Our objective was to evaluate the occurrence of acute adverse reactions associated with allogeneic MSC infusions in T1DM patients. **Patients and Methods:** In our facility, we have a T1DM protocol with 8 already enrolled patients (4 adults and 4 children). Bone marrow (BM) MSC cultures were derived from BM-aspirates obtained from 9 related allogeneic donors selected according the current protocol for BM transplantation. Clinical-grade MSCs were generated under good manufacturing practice conditions. BM mononuclear cells (MNC-BM) were obtained by Ficoll-HypaqueTM gradient centrifugation. MSCs were isolated by plastic adherence and expanded ex vivo by culturing in culture flasks (175 cm²) with α -MEM enriched with 15% of fetal bovine serum. At confluence, MSCs were harvested, washed and resuspended in saline solution with 5% human albumin and 5% ACD and infused through a membrane filter (170 μ m). Microbial contamination was assessed in each passage and immediately before the infusion. The patients have already received a total of 62 BM-MSCs infusions. **Results:** 7 out of 8 (87.5%) patients presented some adverse reaction, all of them mild. The most commons adverse effects were [Number of patients experiencing adverse reactions (%); Total of adverse events (%); Headache [4 (50%); 11 (18%)]; Mild cough [3 (38%); 12 (19%)]; Fever [3 (38%); 5 (8%)]; Malaise [2 (25%); 10 (16%)]; Chills and tremors [2 (25%); 9 (15%)]; Thoracic pain (mild) [2 (13%); 5 (8%)]; Facial redness [2 (25%); 4 (7%)]; Respiratory discomfort (mild) [2 (25%); 3 (5%)] and Nausea [2 (25%); 2 (3%)]. One patient presented enlargement of both parotid glands, starting about 2hs after the third infusion, which persists to this day, 22 months after infusion. Ultra-sound evidenced bilateral parotid enlargement; and amylase serum levels persisted elevated up to four months. Parotid gland biopsy did not show abnormalities. Three patients had mild cough for 4-8 hs after infusions. One of them was submitted to spirometry, before and after the following infusion, which resulted normal despite recurrence of the same symptom (curiously, this patient also referred improvement of an associated atopic dermatitis after cell infusions). Two patients had a clinical picture suggestive of inflammatory reaction. All adverse effects resolved spontaneously or with analgesics. **Discussion:** Risks related to MSC infusions are not completely known. To date no significant adverse events were reported. However, there is a scarcity of reports of acute adverse reactions to MSC infusion. A confounding aspect is the background disease, which could influence the appearance or perception of acute adverse effects. For

this reason, we believe that patients with T1DM are the most adequate group of patients to study this issue, as they are relatively healthy, and acute adverse events could be attributed exclusively to the infusion.

112

CONGELAMENTO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL E PLACENTÁRIO UTILIZANDO BOLSAS DE 25 ML, CÂMARA COM DECAIMENTO PROGRAMADO DE TEMPERATURA E ARMAZENAMENTO EM TANQUE DE NITROGÊNIO LÍQUIDO

Alvarez KCA¹, Kondo AT¹, Mazieiro DA¹, Oliveira DC¹, Araujo ICC¹, Colesanti MV¹, Campos TCXB¹, Ribeiro AAF¹, Sakashita AM¹, Kutner JM¹

¹Hospital Israelita Albert Einstein

Introdução: O sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) é uma fonte de células-tronco hematopoéticas, podendo ser utilizada em transplante de medula óssea para pacientes sem doadores compatíveis. O congelamento e armazenamento de SCUP são considerados pontos críticos ao processo. De acordo com a metodologia empregada pode haver variação na validade final do produto. **Objetivo:** Necessitando de técnicas alternativas para Backup, foi validado o processamento e congelamento em bolsas de 25 mL de SCUP, congeladas em câmaras com decaimento programado de temperatura, armazenadas em tanques de nitrogênio líquido e posteriormente transferidas ao sistema Bio Arquivo. **Material e Métodos:** Na metodologia atual as bolsas são processadas e congeladas / armazenadas no sistema Bio Arquivo. Para a validação do método Backup foram analisadas 7 unidades de SCUP. O processamento foi similar ao utilizado na rotina, porém o congelamento foi realizado em câmaras com decaimento programado de temperatura, o armazenamento foi em tanques de nitrogênio líquido e, em até 48 horas, as unidades foram transferidas para o sistema Bio Arquivo. **Resultados:** A viabilidade média pré congelamento foi de 97%, as unidades permaneceram congeladas por um período médio de 48 dias (34-57). No descongelamento a viabilidade média, com corante tripan blue foi de 86% (79-96) e por citometria de fluxo foi de 74,5% (55-88). Realizado o ensaio clonogênico de todas as unidades com crescimento dentro do esperado, média de 6,98 x 10⁵ (4,15-13,21). **Conclusões:** Embora 2 unidades tenham apresentado viabilidade por citometria de fluxo de 55,2% e 58,2%, o crescimento de CFU foi dentro do esperado, 13,21 x 10⁵ e 4,2 x 10⁵ respectivamente. O tempo entre o descongelamento do material e a realização do teste pode ter influenciado no resultado final da viabilidade. A automatização do sistema Bio Arquivo para o congelamento e armazenamento das amostras é um grande diferencial à qualidade do produto dentro de um serviço de criopreservação. A técnica, congelamento programado, armazenamento em tanques de nitrogênio líquido e posterior transferência para o Bio Arquivo, estabelece um método backup válido de armazenamento temporário das unidades de SCUP. Para a utilização deste método um sistema de localização de bolsas deve estar disponível.

113

VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS: COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE TRIPAN BLUE E DE CITOMETRIA DE FLUXO

Alvarez KCA¹, Kondo AT¹, Mazieiro DA¹, Oliveira DC¹, Araujo ICC¹, Colesanti MV¹, Campos TCXB¹, Cardoso PN¹, Ribeiro AAF¹, Sakashita AM¹, Kutner JM¹

¹Hospital Israelita Albert Einstein

Introdução: O teste de Viabilidade Celular é uma avaliação qualitativa das Células Progenitoras Hematopoéticas (CPH) realizada in vitro. O teste pode servir para validação de novas técnicas de processamento e criopreservação, controle de qualidade de coleta, congelamento e armazenamento de CPH ou avaliar o potencial do material a ser utilizado para transplante. O objetivo deste trabalho é comparar os resultados da viabilidade realizados pela técnica de coloração por tripan blue e por citometria de fluxo utilizando 7AAD.

Material e Métodos: Foram analisadas: - 771 unidades pós processamento de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (SCUP), coletados no período de 04/2011 a 05/2012. - 63 unidades foram utilizadas para Controle de Qualidade, pós congelamento, sendo 8 unidades de Medula Óssea (MO), 20 unidades de Células Progenitoras de Sangue Periférico (CPSP) e 35 SCUP no período de 01/2011 a 05/2012. Para a técnica de tripan blue é acrescentado corante a amostra previamente diluída e realizada a contagem total de 200 células entre viáveis e inviáveis, em câmara de newbauer. Para a viabilidade por citometria de fluxo a amostra é marcada com 7AAD, incubada, as hemácias são hemolisadas e a leitura é em citômetro de fluxo. **Resultados:** As unidades de SCUP pós processamento tiveram média de viabilidade por tripan blue de 97,8% (87 - 100) e citometria de fluxo de 94,08% (77 - 99,5). Das unidades do controle de qualidade com testes pós descongelamento obtivemos os seguintes resultados: - MO com intervalo médio de congelamento de 66 meses (27-180) a média de viabilidade por tripan blue foi de 83,8% (70,5 - 90) e por citometria de fluxo 71,4 (48 - 88) - CPSP com intervalo médio de congelamento de 58 meses (16 - 100) a média de viabilidade por tripan blue foi de 81,9 % (70 - 93) e por citometria de fluxo 77,03 (53,1 - 91) - SCUP com intervalo médio de congelamento de 46 meses (13 - 77) a média de viabilidade por tripan blue foi de 86,5 % (73 - 98) e por citometria de fluxo 73,3 (45,2 - 99). **Conclusões:** A técnica de citometria de fluxo demonstra maior especificidade em relação ao tripan blue. Amostras a fresco tem resultados com menor discrepância, demonstrando que o tempo entre o descongelamento da amostra e a realização do teste pode ter influência, principalmente no resultado da citometria de fluxo. Todas as amostras do Controle de Qualidade tiveram CFU com resultado dentro do esperado. O standard do FACT, AABB e a RDC 56 recomendam a análise da viabilidade celular pela técnica de citometria de fluxo. Como garantia de segurança o Hospital Israelita Albert Einstein padroniza as 2 técnicas em sua rotina.

114

MÚLTIPLAS INFUSÕES DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS APARENTADAS PARA DIABETES MELITO DO TIPO 1

Rodrigues MCO¹, Moraes DA¹, Couri CEB², Liberatore-Junior RDR², Prata KL¹, Farias KCM¹, Stracieri ABPL¹, Barros GMN¹, Zombrilli AF², Simões BP¹

¹Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

²Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

O diabetes melito do tipo 1 é uma doença autoimune, em que ocorre inflamação e destruição progressiva das células beta pancreáticas,

produtoras de insulina. As células mesenquimais (MSCs) têm sido aplicadas na medicina regenerativa por seus efeitos imunomoduladores, por secreção de agentes tróficos e, possivelmente, por induzir reparo de tecidos lesados. O presente estudo avaliou a segurança e eficácia de injeções endovenosas de MSCs derivadas de medula óssea de doadores aparentados, em pacientes portadores de diabetes melito do tipo 1 recém diagnosticado. Oito pacientes, com idade variando de 12 a 31 anos, sendo seis do sexo feminino, todos tendo recebido o diagnóstico de DM1 há menos de 6 semanas, foram incluídos no estudo. Os doadores foram parentes de primeiro grau não portadores de diabetes ou qualquer outra doença autoimune. Aproximadamente 100ml de medula óssea foram aspirados do osso ilíaco em centro cirúrgico, sob sedação e ventilação não-invasiva. O material foi prontamente enviado a laboratório de cultura celular do Hemo-centro e Centro de Terapia Celular de Ribeirão Preto. Após aproximadamente 5 semanas em cultura, e obtenção de número suficiente de células (mínimo de 1×10^6 MSCs/kg do receptor por dose), as células passaram a ser infundidas nos receptores diabéticos. Cada paciente recebeu 7 ou 8 infusões endovenosas, sendo as 3 ou 4 primeiras com intervalo semanal, e as demais com intervalo mensal. O número médio de células infundidas por paciente foi de $2,7 \times 10^6$ MSCs por quilograma de peso, por dose, variando de $1,2$ a $7,1 \times 10^6$. Das pacientes, entretanto, receberam doses mais elevadas de MSCs, comparadas àquelas dos demais pacientes. Todos os pacientes foram acompanhados durante todo o período do estudo por equipe de transplante de medula óssea, hemoterapia e endocrinologista. Não houve eventos adversos graves durante ou sucedendo as infusões de células mesenquimais, mas alguns pacientes apresentaram tosse seca, cefaléia, febre, mialgia, náuseas e rash cutâneo, entre outros eventos leves relatados, que foram associados às infusões e prontamente resolvidos com medicamentos sintomáticos. Duas pacientes, coincidentemente aquelas que receberam maiores doses de células, apresentaram diminuição importante das necessidades insulínicas após as infusões, mantendo uso de baixas doses de insulina exógena ($<0,2$ UI/kg/dia) por pelo menos 33 e 21 meses após a última dose de células. Uma dessas pacientes apresentou gestação após o término das infusões, que evoluiu a termo, sem intercorrências e sem descompensação do diabetes. Os demais seis pacientes apresentaram redução transitória e não distinguível de fase de "lua de mel" durante as infusões, retomando o uso de doses semelhantes às iniciais ao término das infusões. Três pacientes concluíram as infusões dentro dos últimos três meses, tempo ainda curto para afirmar resultados terapêuticos. Soro e sangue de todos os pacientes encontram-se armazenados, para análises imunológicas e para dosagem de peptídeo C endógeno. Tais análises serão realizadas quando todos os pacientes completarem pelo menos seis meses de seguimento pós-infusões. Conclui-se que as infusões de MSCs são seguras, porém sua eficácia mostra-se variável entre os pacientes, devendo ser avaliados fatores que possam ter influenciado tal variabilidade, como a dose de células infundidas.

115

PRODUCTION OF HEMATOPOIETIC STEM/PROGENITOR CELLS FROM HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

Costa EBO^{1,2}, Orellana MD², Magalhães DAR², Wagatsuma VMD², Silva RB², Moreira LF², Haddad SK², Covas DT², Fontes AM^{1,2}

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular

Hematopoiesis has been well described in murine models in recent decades, however, studies demonstrating the mechanisms of hematopoiesis in humans are still scarce. The first human embryonic stem cells line (hESCs) derived in 1998, has generated new perspectives about the study of hematopoiesis as in

attempting to mimic what naturally occurs during embryonic development, as for clinical application of hematopoietic cells obtained from the differentiation of these cells. However, although numerous studies have shown the production of hematopoietic cells derived from hESCs, the protocols have generated varying quantities of cells with low efficiency and functional properties of primitive stem cells. Thus, this study sought to establish a novel model for hESC-H1 differentiation in hematopoietic progenitor cells so that they could be better characterized and obtained more efficiently. For this way, we developed an in vitro differentiation system based on co-culture of hESC-H1 line with murine stromal cells in differentiation medium supplemented with fetal calf serum (FCS) and cytokines and hematopoietic growth factors in low concentrations. As a result, the development of this study allowed the establishment of a method for generation of mixed population of cells enriched in hematopoietic progenitor cells positive for the marker CD45, which proved to be co-expressed with other hematopoietic markers (CD31, CD43, CD71 and CD38), and mature hematopoietic cells positive for myeloid-specific markers (235a, CD14, CD15, CD16) and morphological characteristics typical. It was shown that these cells expressed genes related to primitive and definitive hematopoiesis (CD45, CD31, runx1, TAL1, LMO2, prom1, CD34 and NOTCH1), and had clonogenic potential in vitro of 1/574 plated cells. In addition, we corroborate the findings that hematopoietic cells have two distinct origins: they can arise as from the hemogenic endothelium as from cells with hemangioblastic properties by hemogenic endothelium-independent way. The observations of the predominance of lineage-specific precursors during differentiation opens up alternatives to select specific cell populations to direct the differentiation to specific mature hematopoietic lineages in vitro for future clinical applications and insights into ontogeny of hematopoietic lineages, both in ES cell-derived cultures and during normal development. Cytochemical, ultrastructural and functional studies in vivo are being conducted to better characterize these cells. **Financial Support:** CNPq, INCTC, FAPESP, FINEP.

116

ARMAZENAMENTO DE UNIDADES APARENTADAS EM UM BANCO PÚBLICO DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

Santos SVF¹, Marti LC¹, Ribeiro AAF¹, Alvarez KCA¹, Cipolletta ANF¹, Seber A², Odone V^{1,3}, Hamerschlag N¹, Kondo AT¹, Sakashita AM¹, Kutner JM¹

¹Hospital Israelita Albert Einstein

²GRAACC - Grupo de apoio ao adolescente e à criança com câncer

³ITACI - Instituto de tratamento no câncer infantil do Departamento de Pediatria da FMUSP

Introdução: O Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical (BPSCU) do Hospital Israelita Albert Einstein iniciou suas atividades em 2004 e até abril de 2012 foram coletadas 8468 unidades de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP). O SCUP é uma fonte alternativa para o transplante de medula óssea, tendo como vantagem a rápida disponibilidade e menor exigência de compatibilidade em comparação com outras fontes. Existem situações onde um paciente que está em tratamento para doenças com indicação para transplante de medula óssea e há a oportunidade de coleta de SCUP aparentado. Estas unidades aparentadas são direcionadas exclusivamente para o paciente e estudos demonstram probabilidade de uso quando a coleta é realizada entre parentes de primeiro grau, isto é, entre irmãos. Entre as 8468 unidades coletadas, 5 tiveram indicação médica para uso aparentado. De acordo com os critérios do BPSCU qualquer solicitação de coleta SCUP aparentada deve seguir um protocolo, que conste solicitação médica incluindo o diagnóstico do receptor. O BPSCU

somente atenderá esta solicitação mediante a aprovação do Comitê Médico. **Método:** 05 unidades aparentadas coletadas pelo BPSCU foram realizadas de acordo com o procedimento operacional padrão. O diagnóstico dos receptores foram, 03LLA, 02 LMA. Destas 05 amostras coletadas, 04 atingiram os critérios mínimos para processamento e armazenamento. Destas 04 unidades coletadas 01 foi transplantada. O transplante foi realizado em uma criança com LLA, e resultou em sucesso, sendo que o período de aplasia medular foi inferior a 15 dias. **Conclusão:** Embora a coleta aparentada de SCUP seja uma opção para o tratamento de alguns pacientes, muito pouco deste trabalho é divulgado. Este tipo de transplante tem sido relacionada com alta taxa de sucesso de acordo com dados internacionais.