

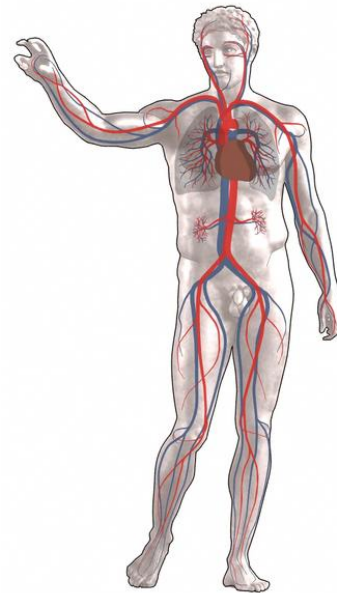
Universidade Federal de Pelotas
Centro de Desenvolvimento Tecnológico
Disciplina de Engenharia de células e tecidos
Prof: Fernanda Nedel e Flávio Demarco

Aplicações clínicas de células tronco hematopoiéticas

João Paulo Luiz
Lucas Lorenzon
Wallace Pereira

Sangue

- Fluido corpóreo especializado
- Composto por células e plasma sanguíneo
- Sistema circulatório

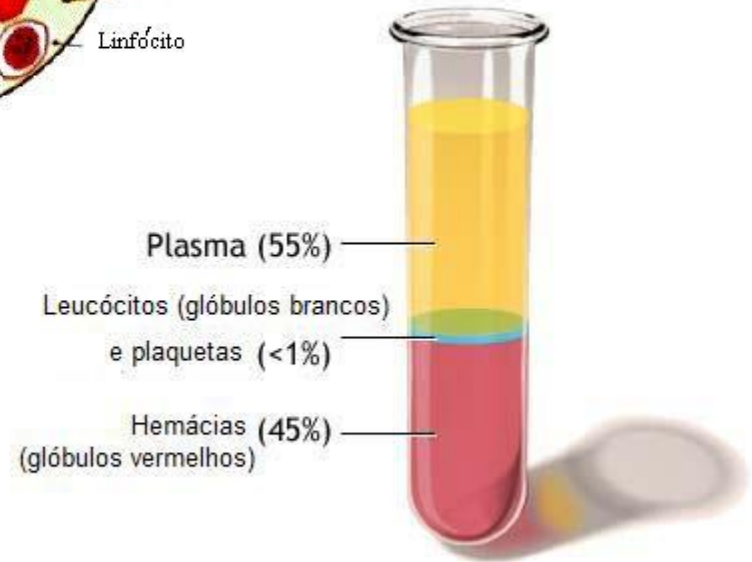
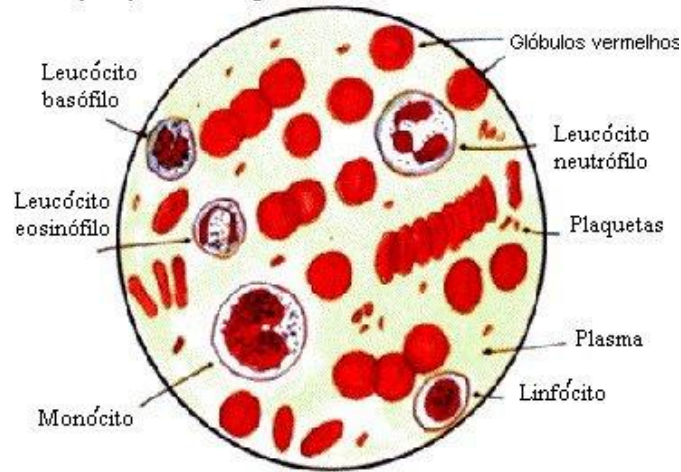


Componentes do sangue

- Células
 1. Eritrócitos
 2. Leucócitos
 3. Trombócitos

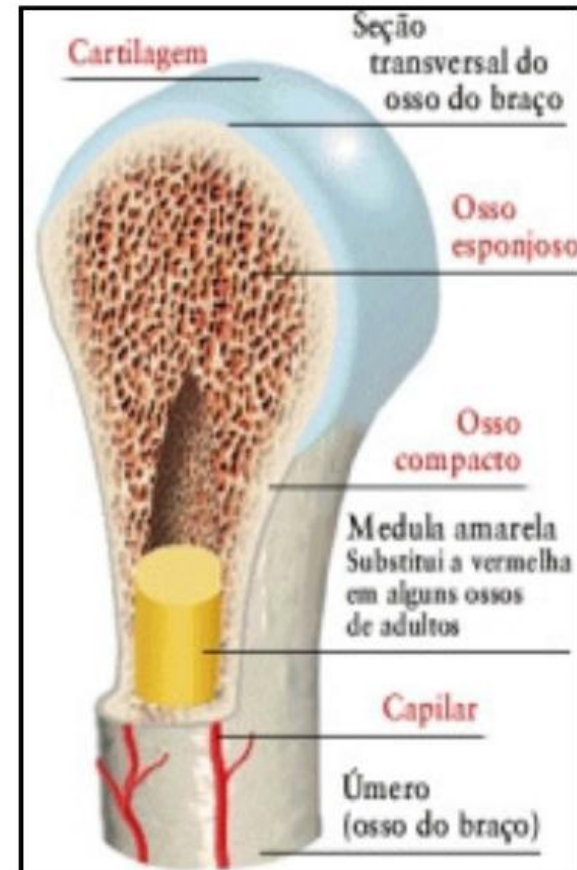
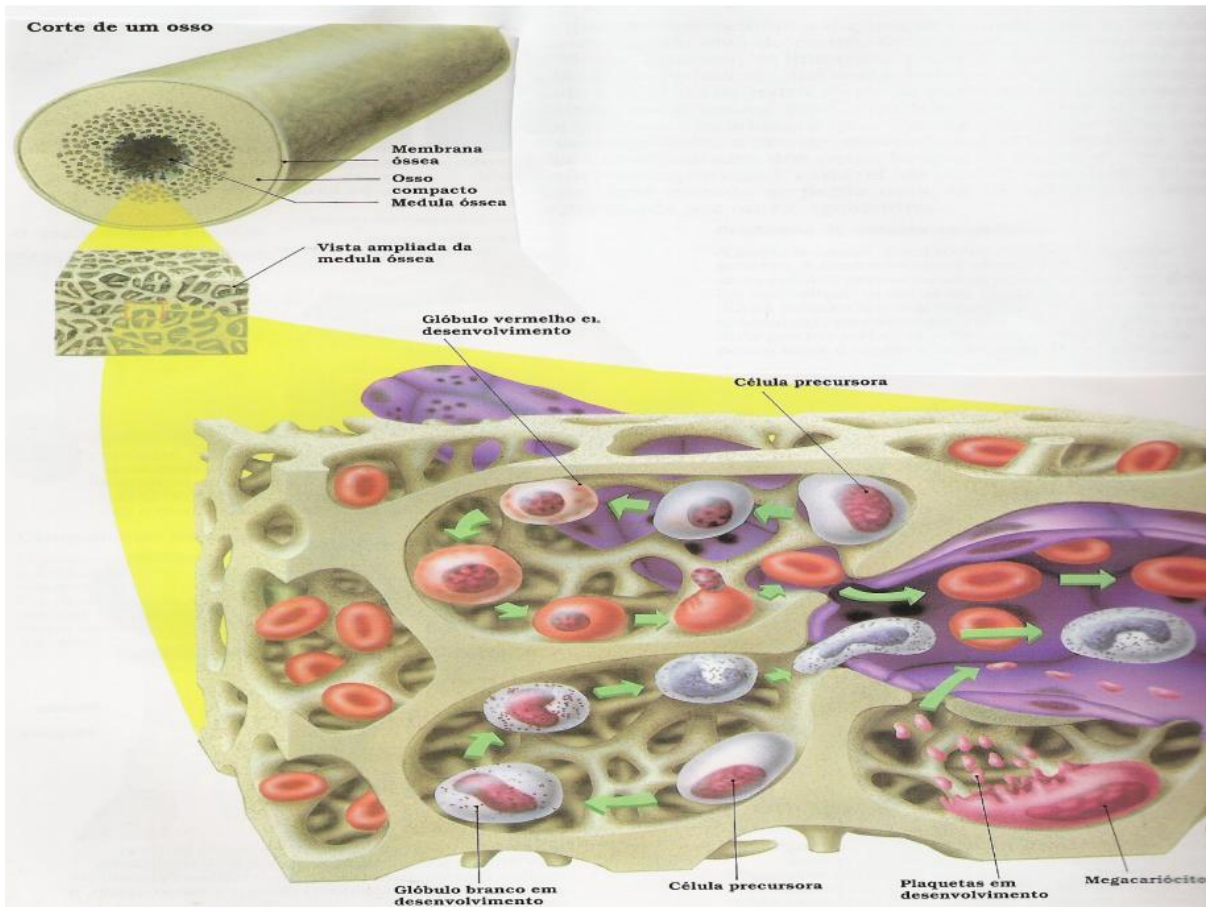
- Plasma

Composição do sangue



Médula Óssea

- Órgão central formador de células do sangue
- Localização
- Medula óssea ativa e inativa



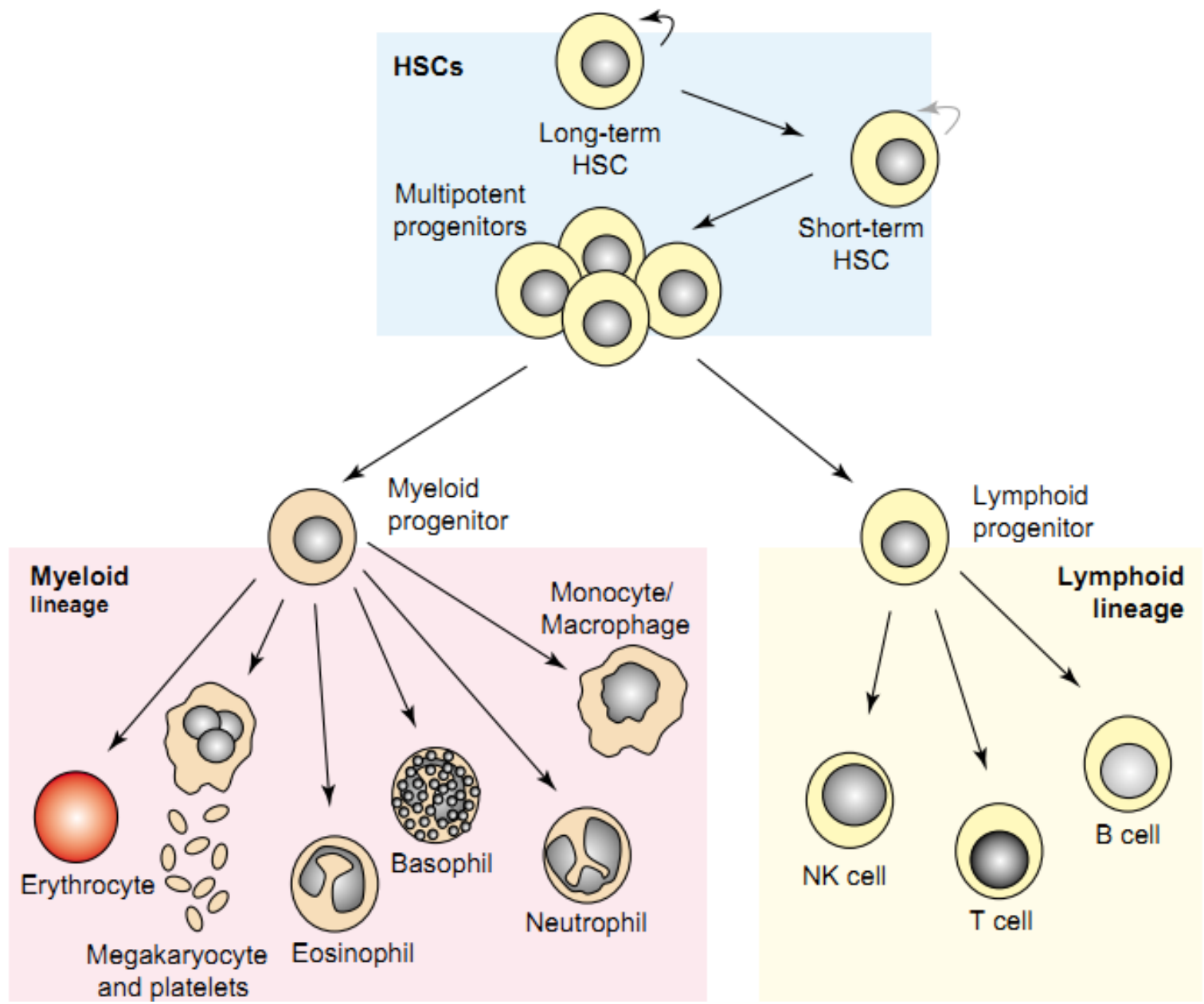
Células tronco hematopoiéticas

Características funcionais:

- Auto-renovação
- Multipotência
- Plasticidade
- Heterogeneidade
- Mobilidade

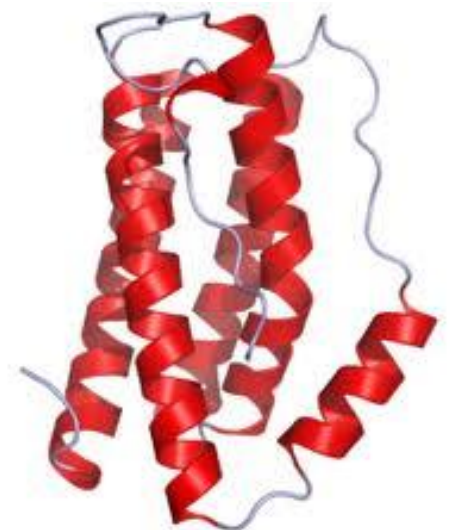
Tipos de HSC

- long-term self-renewing HSCs (LT-HSCs),
- short-term self-renewing HSCs (ST-HSCs),
- multipotent progenitors (MPPs)



Mecanismos celulares e moleculares

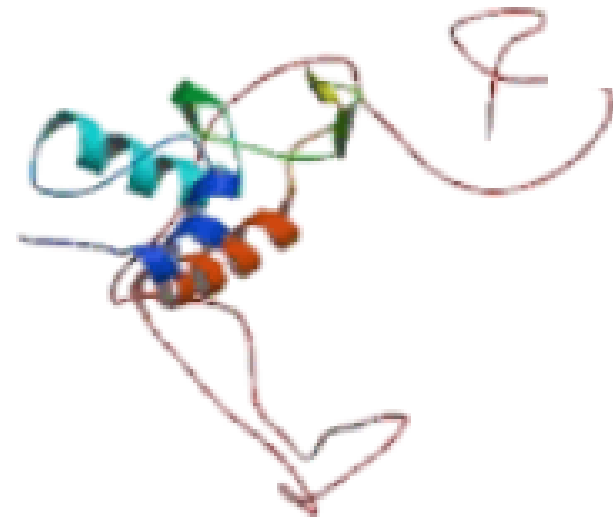
- A dinâmica da hematopoiese é relativamente complexa;
- A comunicação entre as células é feita através de moléculas sinalizadoras, as citocinas.
- Proliferação, diferenciação e apoptose.



Interleucina 6

Mecanismos celulares e moleculares

- Estroma da medula óssea (adipócitos, células endoteliais, macrófagos and fibroblastos);
- Colágeno e proteoglicanos;
- Fixação de HSC a moléculas de adesão;
- CD164;



CD164

Mecanismos celulares e moleculares

- As HSC possuem marcadores de superfície celular específicos;
- CD34⁺ /CD38⁻

Markers of human hematopoietic stem cells (HSCs)

Name	Function	SWISS-PROT entry ^a
CD34 ⁻ or -	Sialomucin, possibly involved in cell-cell adhesion	P28906
Thy 1 ⁻ (CD90)	Possibly involved in cell-cell interaction	P04216
CD38 ⁻	ADP-ribosyl cyclase 1, synthesizes cyclic ADP-ribose; indicates differentiation to both erythroid and myeloid progenitors	P28907
c-Kit ⁻ (CD117)	Tyrosine kinase receptor for stem cell factor (SCF)	P10721
AC133 ⁻ (CD133)	Prominin-like protein, function unknown	O43490
lin ⁻ (lineage)	Generic designation for several markers of blood cell lineages	-

A plus (+) sign indicates presence of the marker in HSCs, whereas a minus (-) indicates its absence.

^a<http://www.expasy.ch/sprot/>

Expansão *ex vivo*

- Meio de cultura: depende da objetivo da expansão;
- Meio contendo soro – vantagens e desvantagens;
- Nutrição + proteção;
- Controle;



Expansão *ex vivo*

- Células acessórias: produzem citocinas, importantes para o cultivo;
- Cultivos com estroma pré-estabelecido mantém as células no seu fenótipo primitivo;

Cytokines used in human hematopoietic stem cell (HSC) culture *ex vivo*

Cytokine (abbreviation)	Function
Fms-like tyrosine kinase-3 ligand (Flt-3L, FL)	Potentiates the effects of other cytokines; promotes survival of HSCs
Granulocyte CSF (G-CSF)	Mobilization of HSCs to peripheral blood
Interleukin 3 (IL-3)	Together with IL-6, promotes proliferation of HSCs
Interleukin 6 (IL-6)	Together with IL-3, promotes proliferation of HSCs
Interleukin 10 (IL-10)	Helps proliferation of HSCs
Interleukin 11 (IL-11)	Shortens the G ₀ period of the cell cycle of HSCs
Jagged-1	Regulates HSC self-renewal
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Mitogen for connective tissue cells
Stem cell factor (SCF)	Growth factor for HSC progenitor cells
Thrombopoietin (TPO)	Stimulator of megakaryocytopoiesis

CSF, colony-stimulating factor; *Fms*, fibromyalgia syndrome gene.

Expansão *ex vivo*

- Produção de fatores inibitórios da proliferação das células tronco;
- Parâmetros fisiológicos, como pH, glicose e O₂ interferem na produção endógena de citocinas;
- Estratégias para manter o balanço entre moduladores inibitórios e indutores da proliferação;

Expansão *ex vivo*

- Tensões de oxigênio de 1 a 10 % aumentam o tamanho e a quantidade de células;



- Baixas concentrações de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e radicais de oxigênio

Expansão *ex vivo*

- A acidificação do meio pode causar inibição do crescimento.
- Pequenas variações no pH podem alterar a sobrevivência e a diferenciação das HSC.
- Granulócito e macrófago → pH 7.2 – 7.4
- Eritrócito → pH 7.6

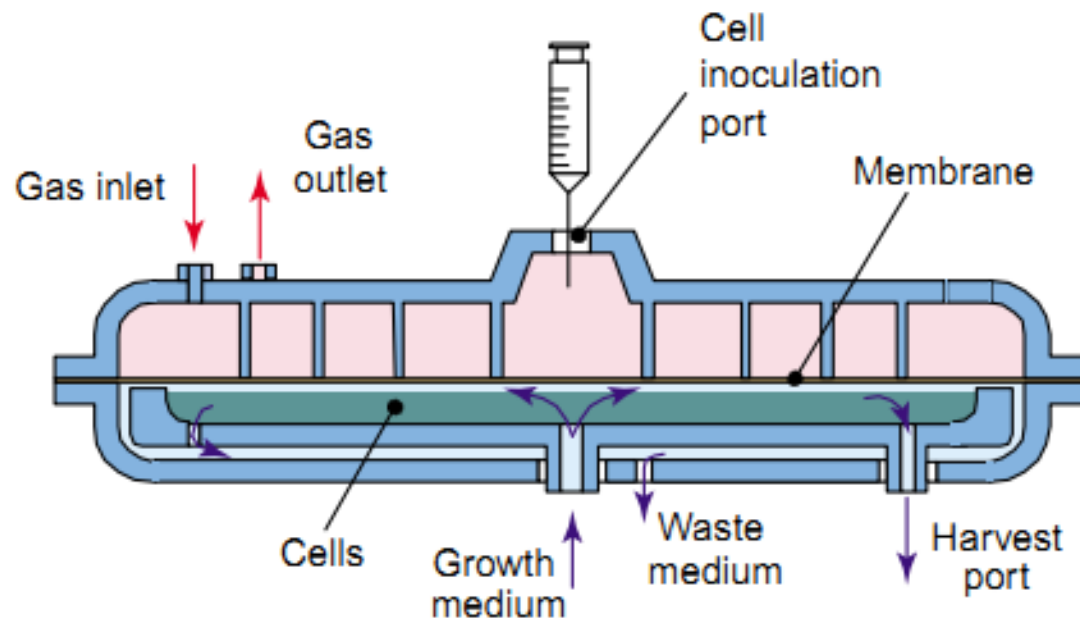
Biorreatores

- T-flask – cultura estática;
- Limitações: gradientes de concentração, manuseio, baixa reprodutibilidade, difícil controle, produtividade limitada pela superfície da garrafa;



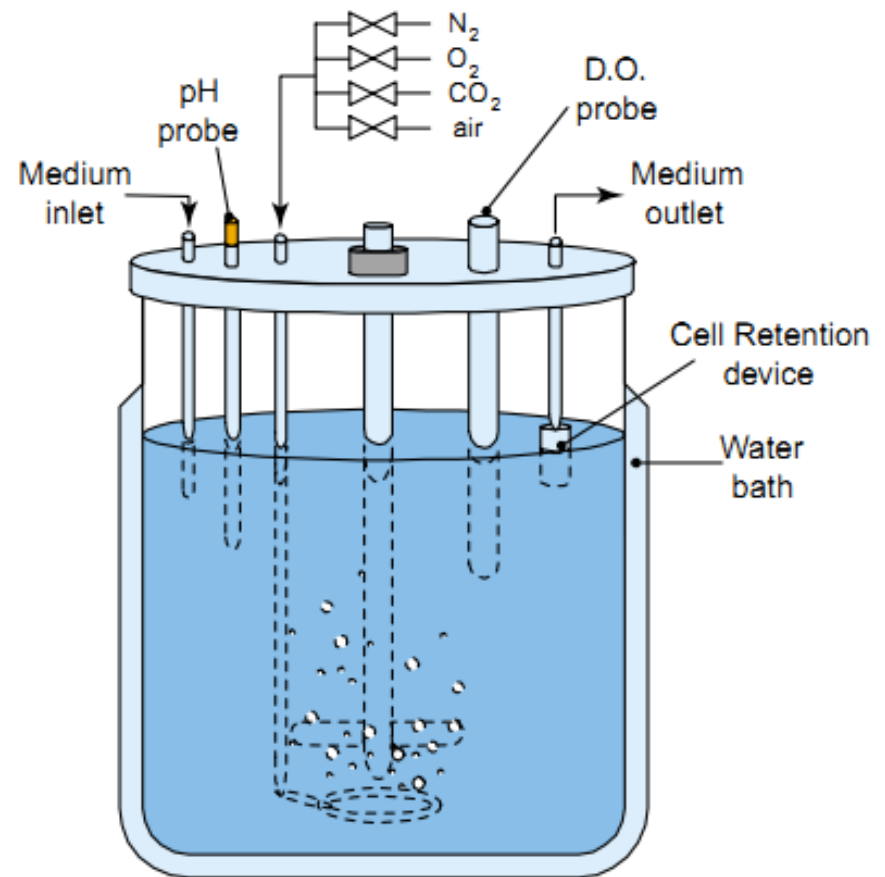
Biorreatores

- Câmara de perfusão



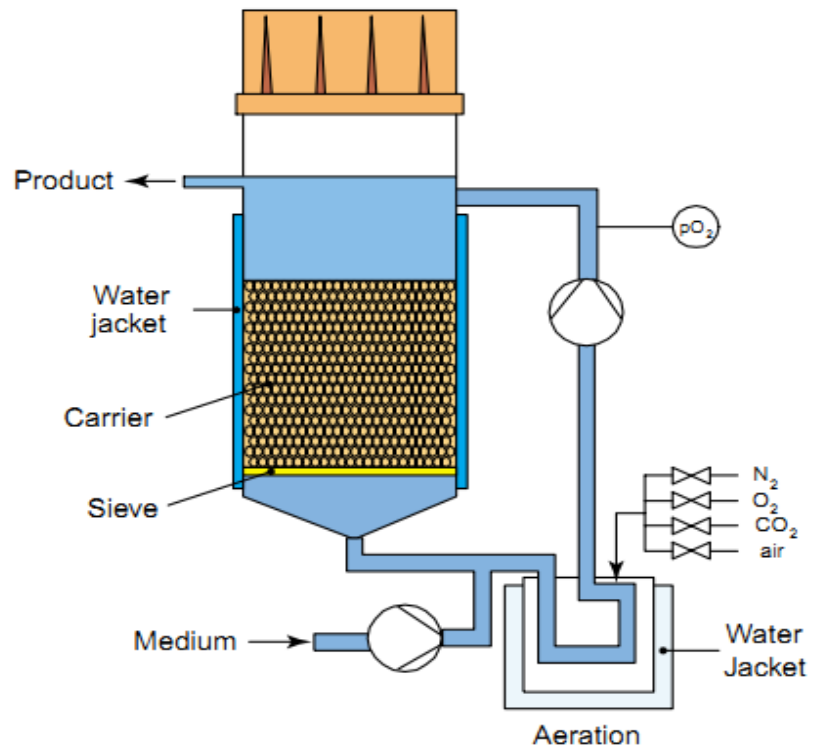
Biorreatores

- *Stirred reactors;*
- Não requer ligação à superfície;
- Agitação pode alterar Receptores de citocina.



Biorreatores

- *Packed bed reactors*
- Primeiramente, cultivo de células do estroma;



Obtenção das HSC

- Múltiplas punções com agulhas -bacia, esterno, costela e vértebras
- Mobilização das células
- 10 a 15 ml/kg
- Através de leucaférese

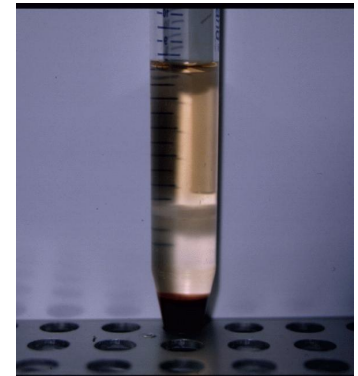
Separação de células sanguíneas

- Centrifugação
- Panning
- Separação imunomagnética
- Cromatografia de afinidade
- Citometria de Fluxo
- FACS (fluorescence- activated cell sorter)

Separação de células sanguíneas

Centrifugação em gradiente

- Envolve a separação de partículas com base na sua massa e forma numa solução de densidade e/ou concentração decrescente
- A amostra é colocada no cimo do tubo e durante a centrifugação migra de acordo com a sua velocidade e sedimentação, ex: gradiente de **Ficoll-Hypaque**
- Eritrócitos+ PMNs - mais densos
- Células mononucleares (linfócitos/ monócitos)-menos densos: recuperados à superfície



Separação de células sanguíneas

Panning

- Aderência celular a uma superfície sólida



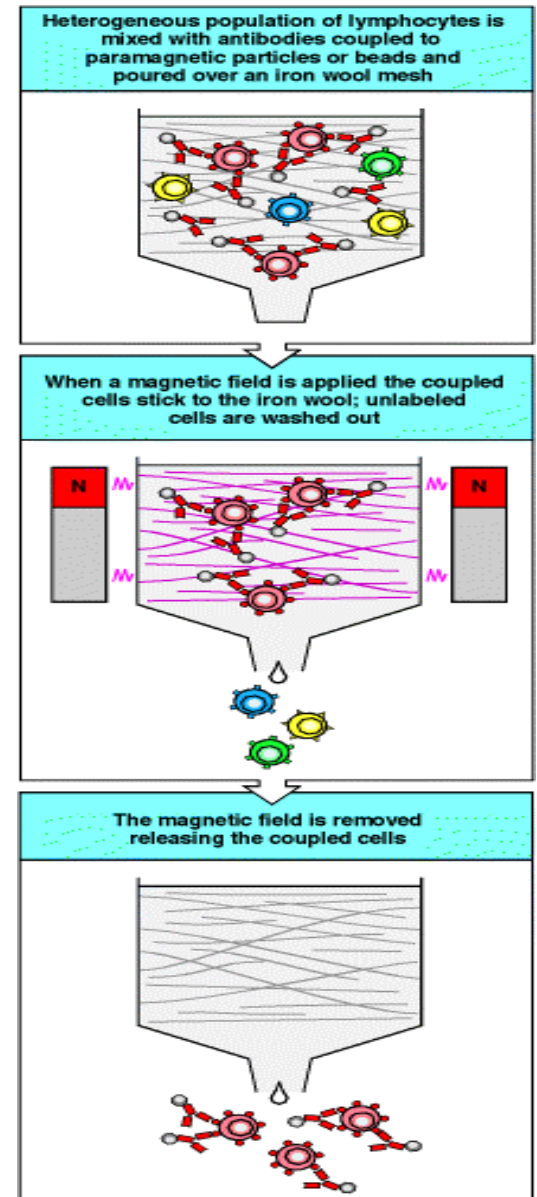
Separação de linfócitos por Panning

Análises Clínicas (Linfócitos)

- Técnica usada no isolamento de subpopulações de linfócitos, em que estes podem aderir á superfície se esta estiver coberta com os anticorpos apropriados
- Método eficaz na separação Th de Tc usando anticorpos CD4+ e CD8+
- Eficaz também na separação de linfócitos T e B usando anti-Igs

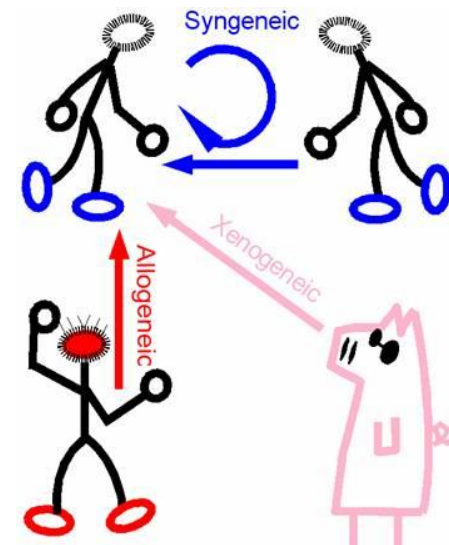
Separação de células sanguíneas

Separação imunomagnética

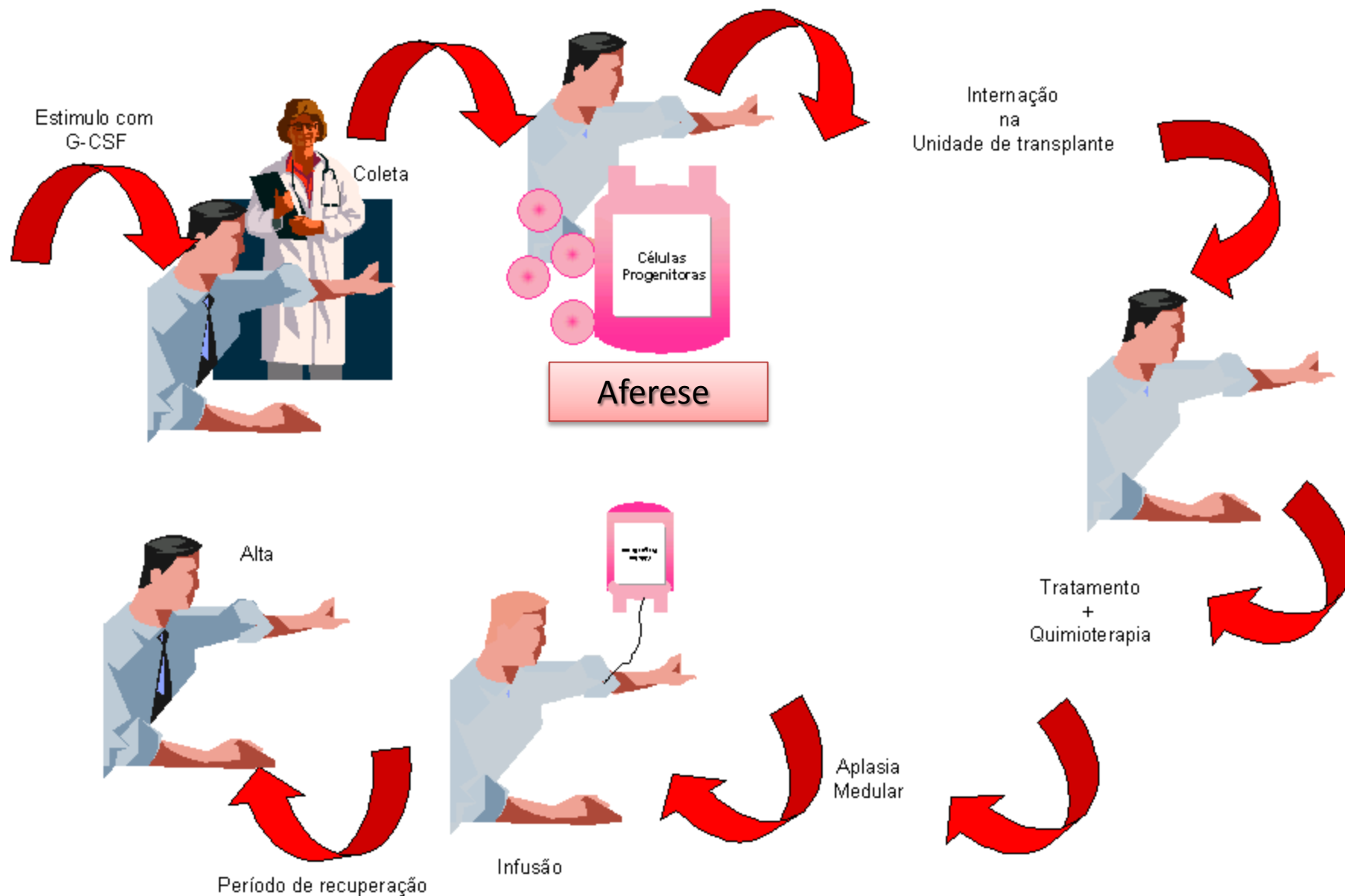


Transplante de HSC

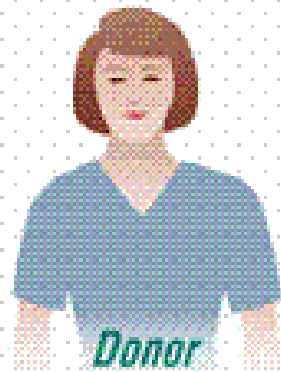
- São definidos de acordo com o doador e a origem das células transplantadas
 - Autólogo: Retiradas do próprio paciente
 - Alogênico: Doador compatível, podendo ser familiar ou não-familiar
 - Singênico: Gêmeos univitelinos



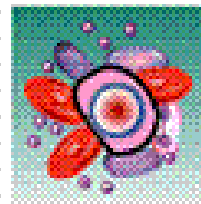
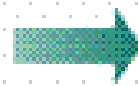
Transplante Autólogo de Células Progenitoras de Sangue Periférico



The Allogeneic Transplant Process

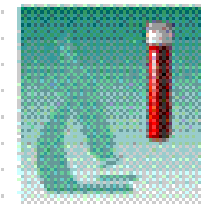
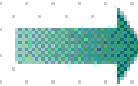


Irmão: 25%
Familiar: < 5%
Não aparentado: ?



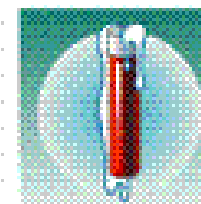
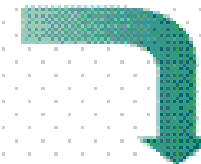
1 *Collection*

Stem cells are collected from the patient's bone marrow or blood.



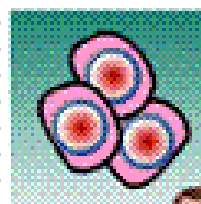
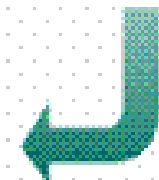
2 *Processing*

Bone marrow or peripheral blood is taken to the processing laboratory where the stem cells are concentrated and prepared for the freezing process.



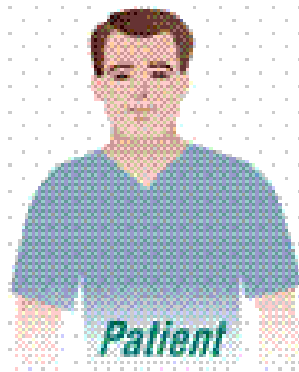
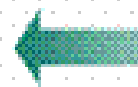
3 *Cryopreservation*

Bone marrow or blood is preserved by freezing (cryopreservation) to keep stem cells alive until they are infused into the patient's bloodstream.



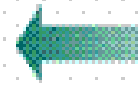
4 *Chemotherapy*

High dose chemotherapy and/or radiation therapy is given to the patient.



5 *Infusion*

Thawed stem cells are infused into the patient.



Origem das HSC para transplante

- Medula óssea
 - Punção
 - Metodologia clássica
- Sangue periférico
 - Aferese
 - Metodologia mais utilizada atualmente em pacientes > 20 anos
- Cordão umbilical
 - Em média 100 mL, contendo HCS
 - Mais utilizada em crianças

Métodos para aumentar o sucesso do transplante

Expansão quantitativa *ex vivo*

- Cultivo *in vitro*
- Biorreatores

Imunossupressão

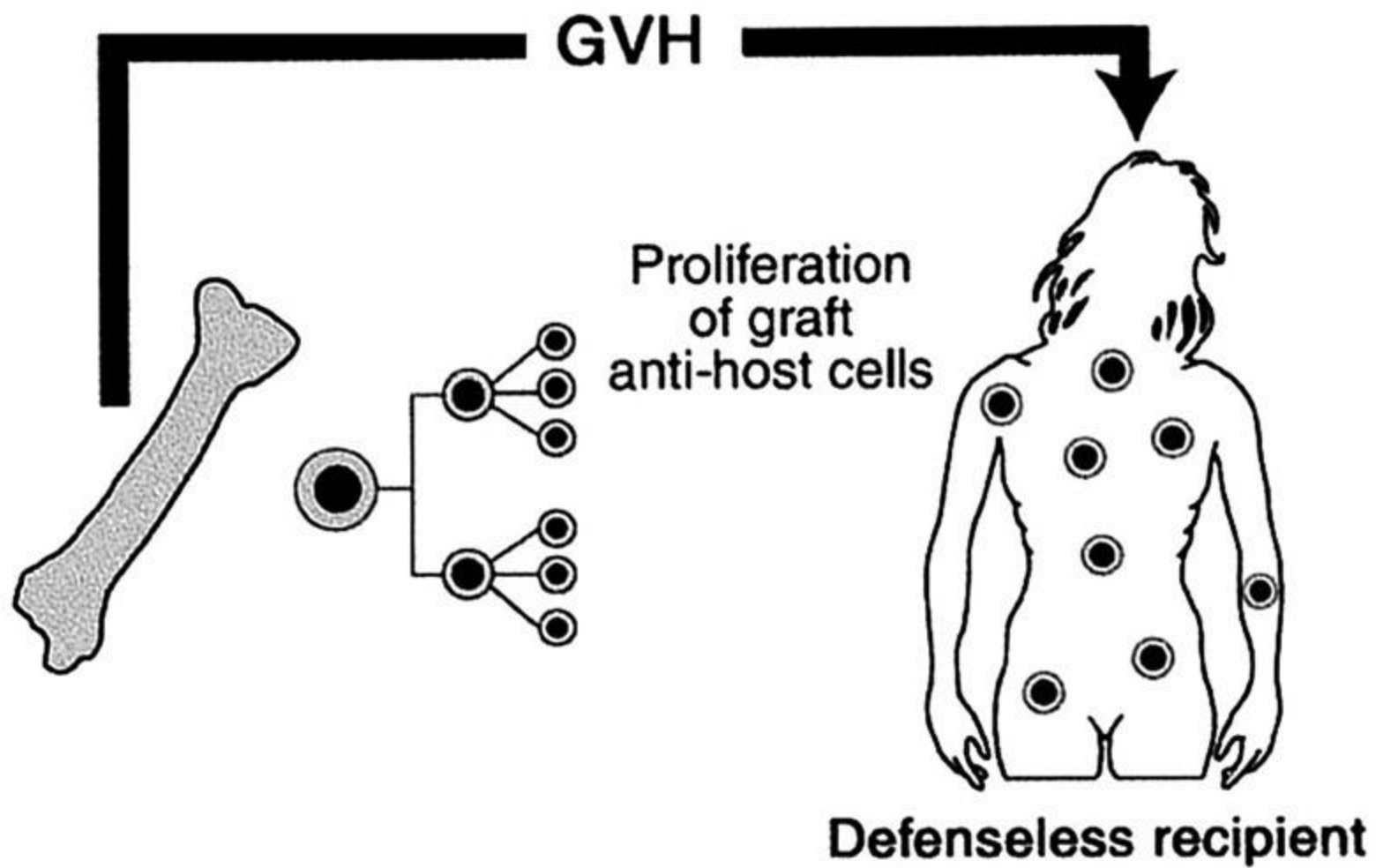
- Quimioterapia e radioterapia
- Ciclosporina A e FK-506: Inibe síntese de IL-2 (ligação Ag-receptor)
- Rapamicina: Interfere transdução de sinal IL-2xIL-2R
 - Agentes bloqueadores de proliferação de células T

Seleção de doador

- Regiões com HLA D compatíveis
- ABO compatível
- Baixa compatibilidade: Remoção de linfócitos T do doador

Rejeição das HCS transplantadas

- Hospedeiro contra o enxerto:
 - Receptor imunocompetente
 - Resposta imune contra as células enxertadas.
- Enxerto contra o hospedeiro:
 - Receptor imunocomprometido
 - Progenitor linfóide competente
 - Células T imunoreativas atacam tecidos do receptor



Indicações de transplante de HSC autólogo

- Benefícios já provados em grandes estudos:
 - Linfoma Não-Hodgkin Recaídos
 - Leucemia Mielóide Aguda
 - Mieloma Múltiplo
- Benefício provável
 - Leucemia Mielóide Aguda
 - Doença de Hodgkin Recaída
 - Tumores Germinativos Recidivados
- Benefícios possíveis (ainda não comprovados)
 - Câncer de mama
 - Leucemia Linfóide Crônica
 - Câncer de pulmão
 - Outros tumores
 - Doenças autoimunes severas (ex: artrite reumatóide)

Indicações de transplante de HSC alogênico

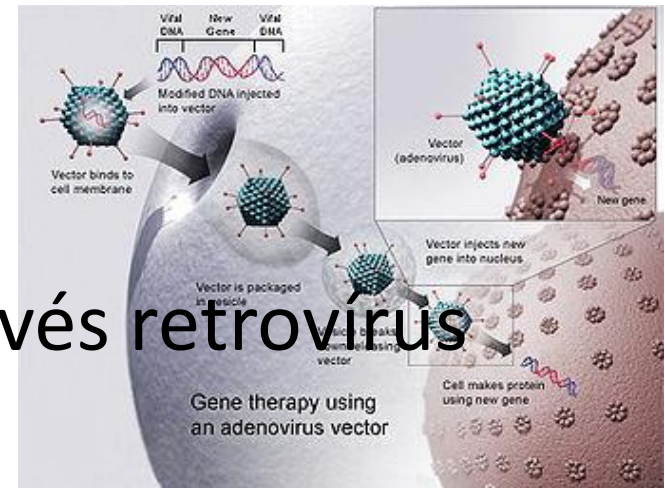
- Como única chance de cura:
 - Aplasia de medula
 - Hemoglobinopatias (Talassemias e anemia falciforme)
 - Imunodeficiências primárias
 - Leucemia Mielóide Crônica
- Como tratamento melhor que a quimioterapia:
 - Leucemia Mielóide Aguda
 - Leucemia Linfóide Aguda
 - Mielodisplasias

Potenciais aplicações clínicas

- Restauração de células T e B
 - Células T esgotadas
- Cordão umbilical
 - baixa capacidade de indução de reatividade
 - limitado número de células
- Sangue periférico

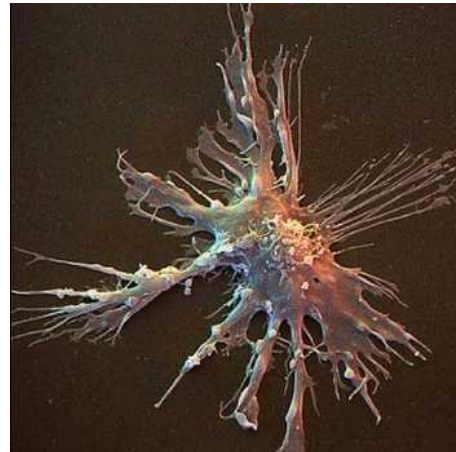
Expansão *ex vivo* para terapia gênica

- Longo tempo de vida
- Geralmente modificados através retrovírus
- Todos seus progenitores carregam o gene de interesse
- Necessitam de indução de citocinas



Imunoterapia baseado em células dendríticas

- Poderosas células apresentadoras de antígenos
- Estimulam células T citotóxicas e T helpers
- Difícil isolamento



Produção de células sanguíneas maduras

- Produção em larga escala de produtos sanguíneos maduros
- Elimina problemas como:
Escassez de tipos sanguíneos específicos
- Aumento de produtividade e melhora no controle das linhagens

Referência

- Cabrita et al. Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. TRENDS in Biotechnology. 2003
- Sorretino et al. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. Nature. 2004
- McAdams et al. Hematopoietic cell culture therapies (part II): clinical aspects and applications. TRENDS in Biotechnology. 1996
- Kondo et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annual Reviews of Immunology. 2003