



Metodología de evaluación en la recolección de células madre

Cyntia Arrais

Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo

Universidade de São Paulo



Fuentes de Células Madre

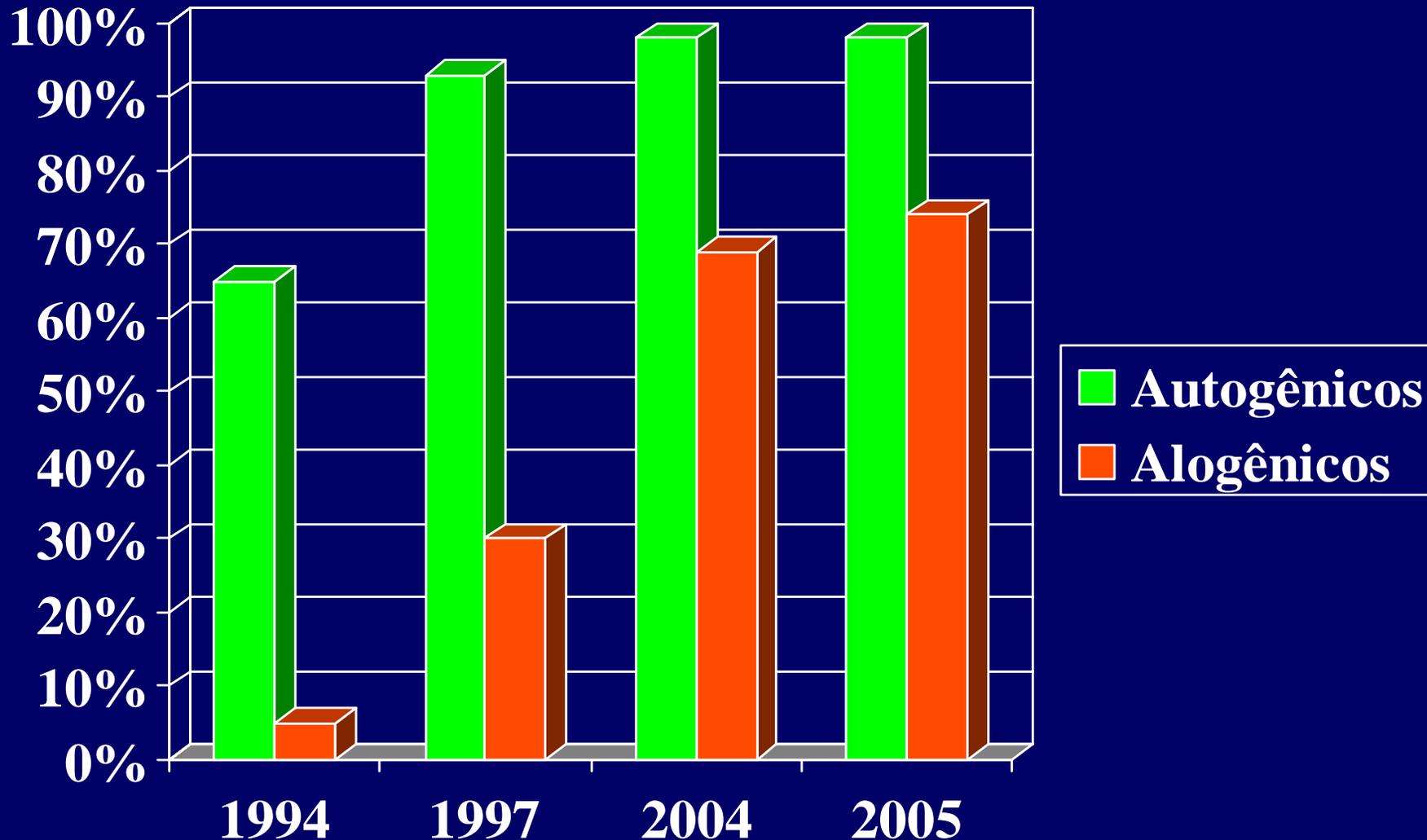
- ◆ Médula Ósea
 - Fuente clásica
 - D. Thomas, 1963
- ◆ Hígado fetal
- ◆ *Stem Cell* periférica
 - 1981
- ◆ Cordón umbilical
 - 1988

Historico

- ◆ 1909 - primeros relatos de la presencia de *stem cell* en la sangre periférica
- ◆ 1962 - *Goodman* - MNC de la sangre periférica restauran la hematopoesis en ratón irradiados
- ◆ 1971 - *McCredie* - células madre pueden ser recolectadas en la sangre periférica
- ◆ 1980 - Inicio de la era “PBSC”
- ◆ 1990 - “PBSC” como la fuente más importante
- ◆ IBMT - 1994: 65% auto, 5% alo
 - 2005: 98% auto, 75% alo



Historico





Qué es una célula madre?

- ◆ Célula madre o stem cell se define como una célula progenitora, autorenovable, capaz de regenerar uno o más tipos celulares diferenciados.
- ◆ **CD34:** La mayoría de las células madre hematopoyéticas expresan el antígeno CD34, una glicoproteína de membrana que se expresa en la superficie de las células progenitoras hematopoyéticas, así como algunas células endoteliales y del estroma medular.

CD 34

- Sangre periférica: 0,06%
- Médula Ósea: 1,1%
- Las células CD34 + tienen papel:
 - Injertía medular
 - Injertía estable

CD34-/ CD133+

Composición celular

- ◆ Sangre periférica manipulada X MO
 - Células T, monocitos, células NK (10:1)
 - CD3+, CD4-, CD8- (9:1)
 - CD19 (6:1)
 - CD34+ (2-4 vezes)

Ventajas de PBSC

- ◆ Facilidad en la recolección
 - Riesgo más bajo de complicaciones
- ◆ Recuperación hematológica más rápida
- ◆ *Heldal et al, 2000; Bensinger et al, 2001:*
 - Sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad mayor a MO

Curso clínico post-TMO

Días p/alcanzar (mediana)	PBSC (n = 38)	Auto-BMT (n = 13)	Alo-BMT (n = 14)
Neutrófilos			
0.1 x 10 ⁹ /l	10	15	19.5
0.5 x 10 ⁹ /l	11	22	24.5
2.0 x 10 ⁹ /l	14	32	31
Plaquetas			
50 x 10 ⁹ /l	13.5	32	33
150 x 10 ⁹ /l	35.5	63	179

Curso clínico post-TMO

	PBSC	Auto-BMT	Alo-BMT
•Días de Internación	27.5	35.1	42.0
•Días post Recuperación	18	26.2	28.4
•Transfusión de C.H.	5.4	8.8	9.1
•Transfusión de Plaquetas	4.0	10.3	10.9
•Días con cuadro febril	8.3	14.2	12.4
•Dias con Antibióticos	9.3	14.3	16.6

Métodos de movilización

Método

Aumento de CFU-GM en la SP

•Quimioterapia	20- 50 veces
•Factor de Crecimiento	
G-CSF	20 - 50 veces
GM-CSF	~10 veces
GM-CSF y G-CSF	20- 50 veces
•Quimioterapia y Factor de Crecimiento	~70 veces (25 a 250)

Mobilización con G-CSF

• G-CSF solo

- G-CSF ($\sim 10\mu/\text{Kg}$) subc diariamente
- Pico de CD34 (día 4-7)
- Inicio de la recolección en el día 5

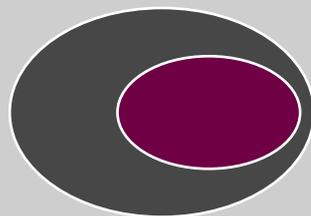
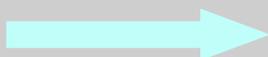
• QT/G-CSF

- CD34 periférico aumenta con el aumento de leucocitos ($\sim 10-14$ días)
- Recolección en el pico máximo de CD34



Mecanismo de mobilización

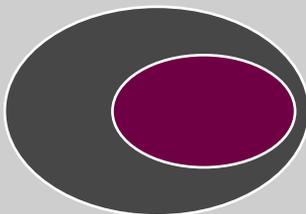
G-CSF



Célula meta

Médula Ósea

- Alteración de las moléculas de adhesión
 - Liberación de proteasas
- Modulación en la expresión de SDF-1



Sangre
Periférica

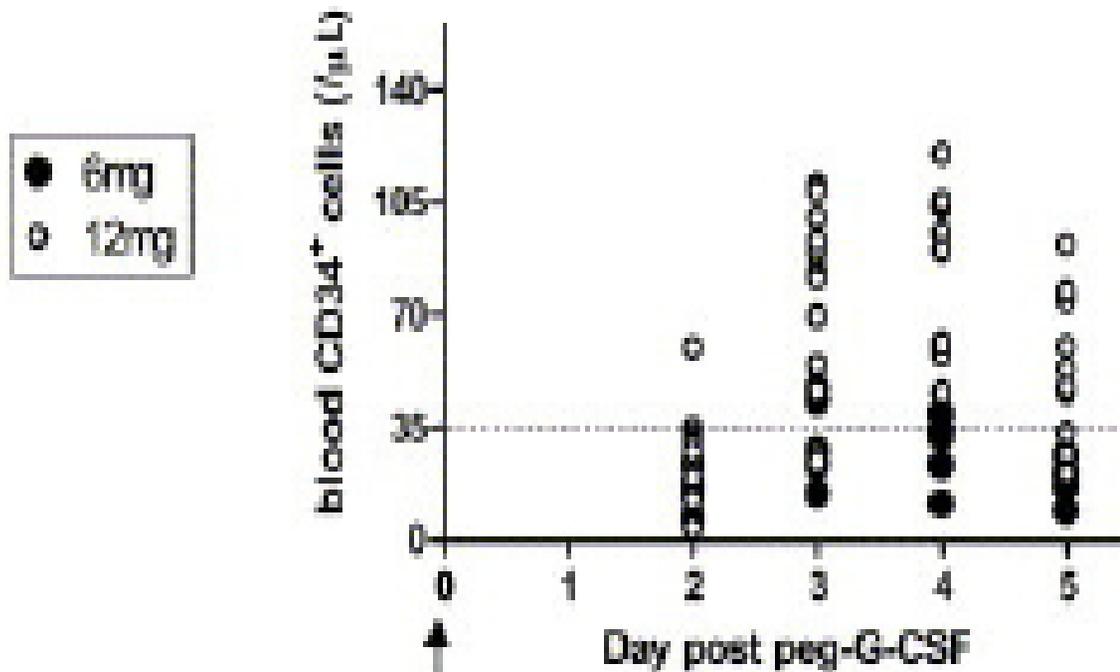


Agentes mobilizadores

- ◆ **G-CSF**
- ◆ **GM-CSF**
- ◆ **G-CSF peguilato**
- ◆ **Stem cell factor (SCF)**
- ◆ **AMD3100**
- ◆ **Hormna de crecimiento (GH)**



Pegfilgastrin en donantes



Hill et al, Biol of Blood and Marrow Transplantation, 2006



45ptes, MM, mobilização post CTX

	Peg-G-CSF 6mg	Peg-G-CSF 12 mg	G-CSF 8ug/kg/d
n	15	15	15
Days to peak CD34	13	12	14
Peak CD34/uL	131 (39-1064)	85 (97-1055)	75 (5-760)
CD34 Collected (10 ⁶ /kg)	10.2 (4.2-72.4)	7.4 (2.3-38)	8.6 (5-87)

Eruns et al, Transfusion, 2006

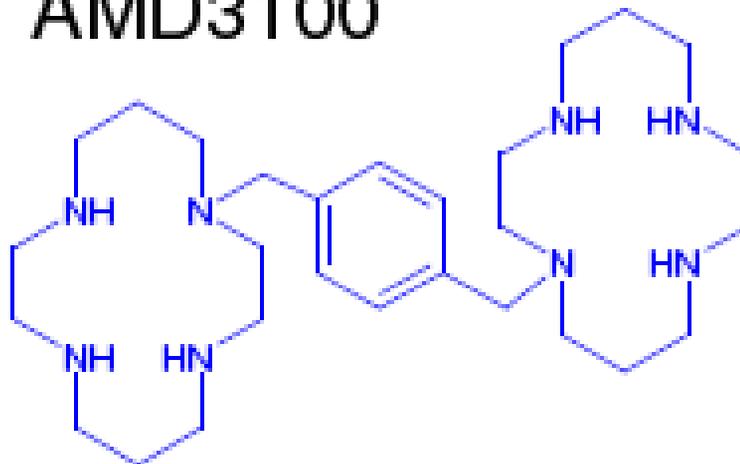
Conclusiones

- ◆ Efectivo en la movilización, básicamente equivalente al G-CSF
- ◆ Ventajas:
 - Una inyección, más conveniente
- ◆ Desventajas:
 - Caro
 - No aprobado por FDA



AMD3100

AMD3100



AMD3100 interfere en la acción del SDF-1/CXCR4 de mantener las células madre en la médula ósea, resultando en movilización

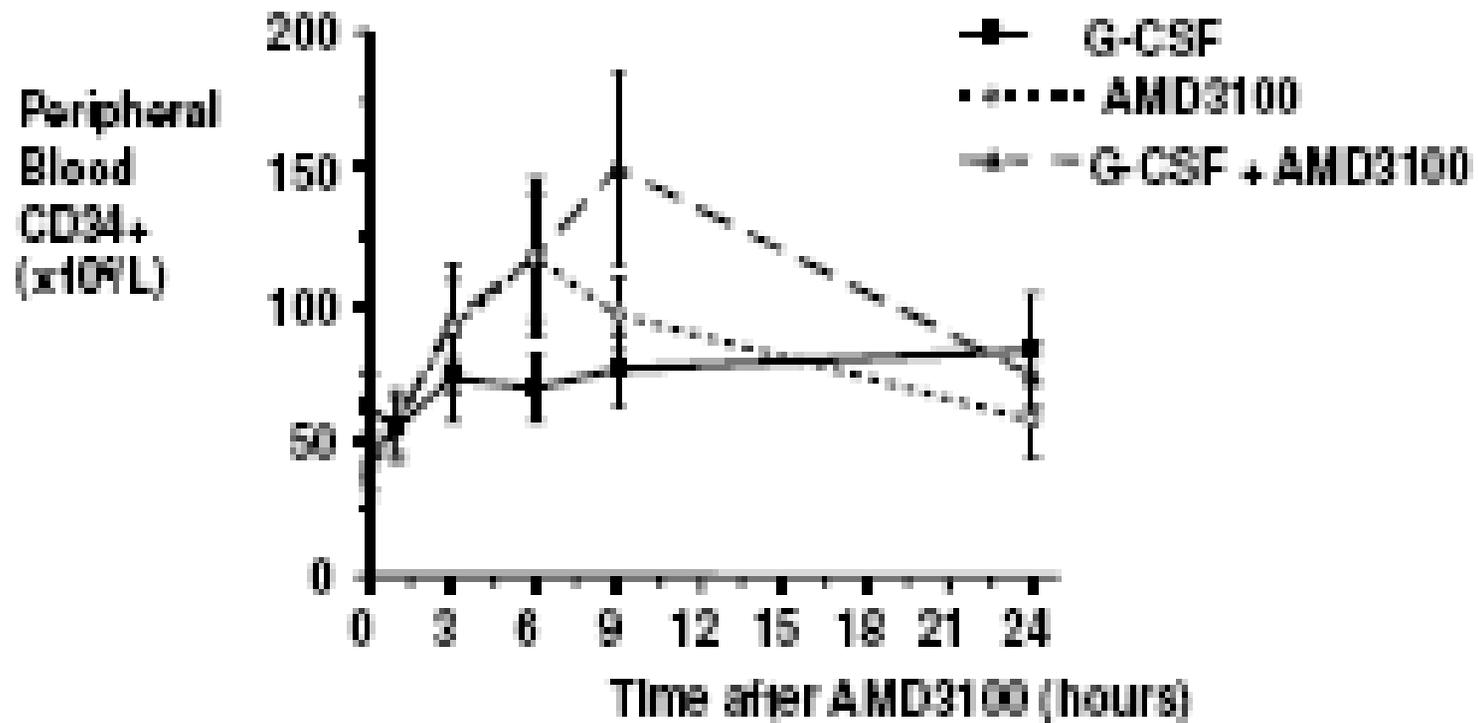


Mobilización con AMD3100+/-G-CSF

- ◆ Donantes= 18
- ◆ Esquemas:
 1. G-CSF 10µg/Kg/día por cinco días
 2. G-CSF 10µg/Kg/día por cinco días +AMD3100 160µg/Kg en el día 05
 3. G-CSF 10µg/Kg/día por cuatro días +AMD3100 160µg/Kg en el día 05
- ◆ Evaluación
 - Contajes celulares
 - Contaje de CD34 periférico



Resposta





Biología de la movilización

- Resulta de alteraciones funcionales citocino-inducidas en el perfil de adhesión expresado por las *stem cells* hematopoyéticas, facilitando la liberación de la MO.
- G-CSF: agente movilizador más utilizado
- “ *Poor mobilizers* ”

Experiencia clínica

- Objetivo de la movilización
 - $2,0 \times 10^6$ células CD34 + (autogénico)
 - $4,0 \times 10^6$ células CD34 + (alogénico)
- Relación inversa entre el número de células infundidas y el día de la injertía

Variables relacionadas con el paciente

- Buena correlación entre CD 34 pre y CD34 del producto recolectado
- Recuperación medular post-QT de movilización
 - Si rápida, recolección única suficiente
- RT, QT con agentes alquilantes
- Donantes: variación individual
 - G-CSF superior a GM-CSF
 - Efectos adversos
- Controvertido:
 - Edad del donante
 - Esquema de administración del G-CSF

Respuesta a citocinas

- Dosis dependiente, si movilización sin QT
- QT + G-CSF: mejor movilización
- En la manipulación de los “*poor mobilizers*”
 - QT específica
 - Ej: Ifosfamida, VP-16, Ara-C, CE en LNH
 - Nuevas citocinas
 - G-CSF + SCF: intervalo de 4 semanas para re-movilizar

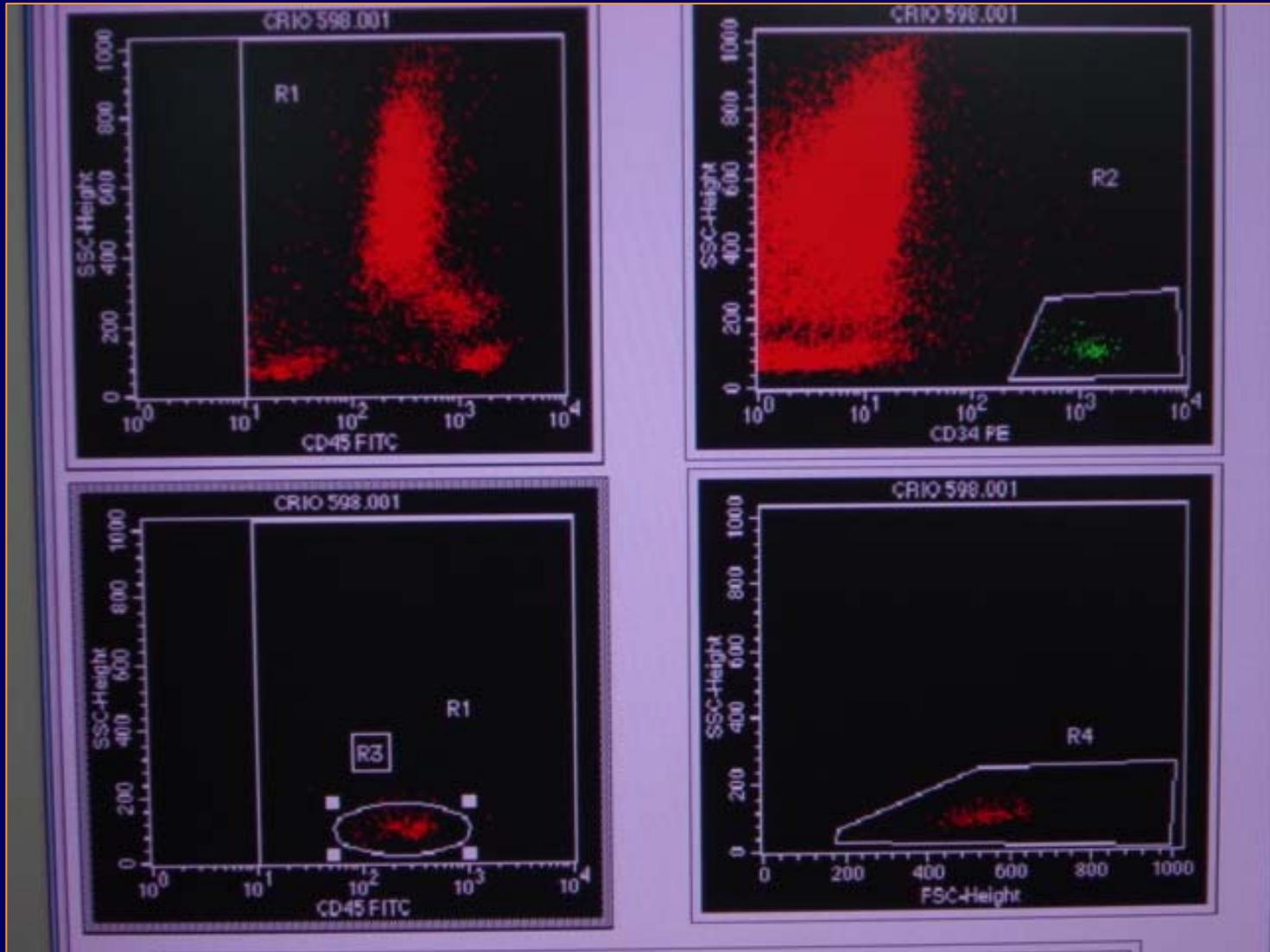
Determinación de las células CD 34

- Marcación con los anticuerpos monoclonales :
 - **CD 34-PE e CD45-FITC**
- Incubación y lavado con solución tampón salino fosfato (PBS)
- Lisis y fijación de las células con buffer
- Lectura de las muestras en el citómetro de FACSCalibur - BD

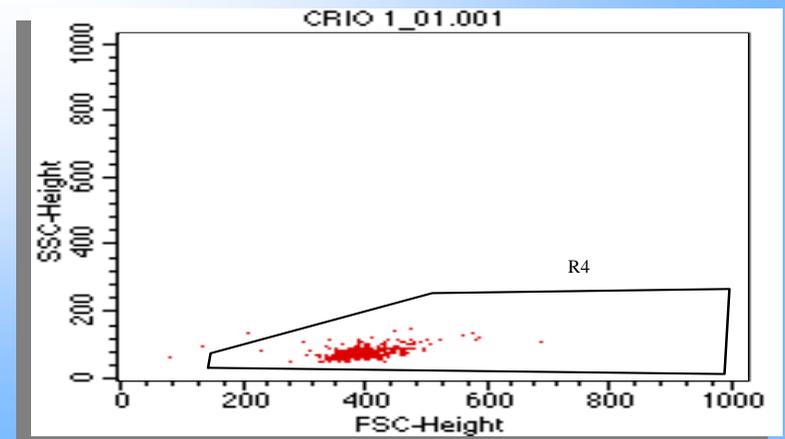
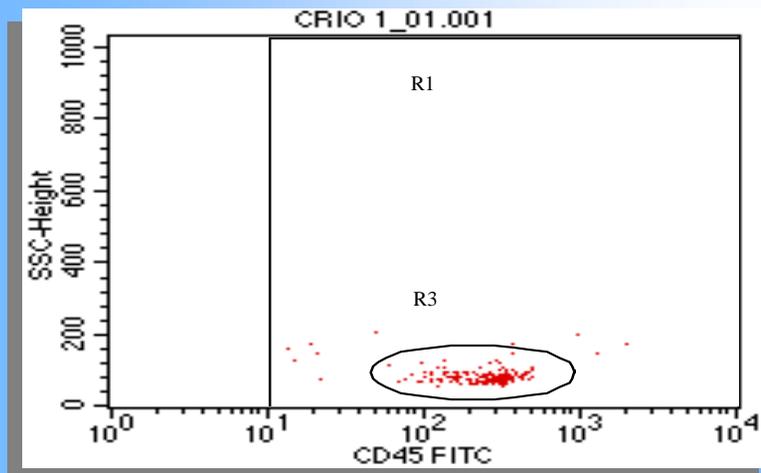
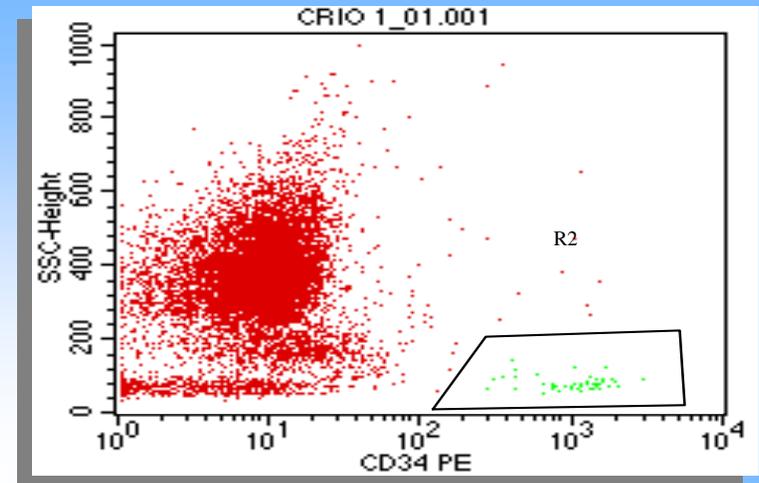
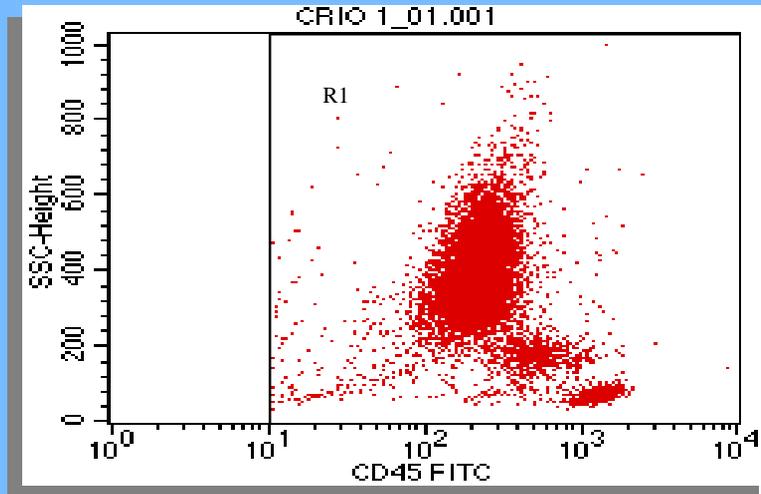
Determinación de las células CD 34



Determinación de las células CD 34



Determinación de las células CD 34



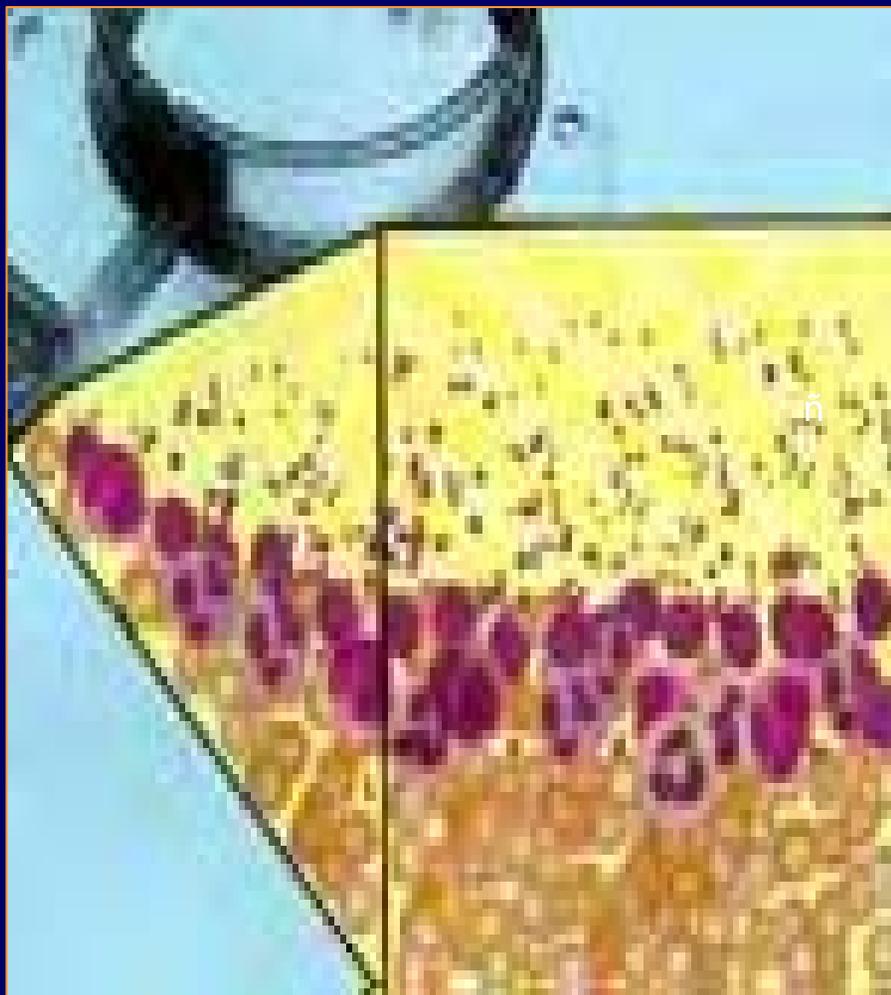
Aféresis

•Recolección

- Equipo automatizado
- Remueve la sangre total del paciente
- Los componentes sanguíneos son separados por centrifugación
- El equipo retiene el componente sanguíneo deseado
- Retorno de los componentes restantes al paciente



Separación por densidad



La velocidad de sedimentación (v_0) celular depende:

densidad específica de las células (r)

tamaño (d)

densidad plasmática (r_0)

viscosidad plasmática (h)

$$v_0 = d^2 \cdot (r - r_0) \cdot g / 18h$$

Componente	Densidad	Volumen
Plasma	1.026	
Plaquetas	1.058	16
Monócitos	1.062	740
Linfócitos	1.070	230
Neutrófilos	1.082	270
Hematíes	1.100	87

Aféresis

•Recolección

- VS a procesar en cada sesión: 04 volemias
- Flujo de retirada de la sangre: 70 - 90 ml/min
- Anticoagulación: ACD-A 1/13
- Profilaxis de toxicidad del citrato



Aféresis





Factores que influyen en la recolección

- Diagnóstico
 - LMA
 - LNH, LH
 - MM tras 12 meses de diagnóstico
- Movilización lenta en pacientes con LH
 - Riesgo de 2° neoplasia
- Edad: menos que 50 años
- Sexo: datos conflictivos



Factores que influyen en la recolección

- Factores que pronostican una mala movilización:
- *Perea et al. (2001)*:
 - MM con más de 12 meses de diagnóstico
 - MO infiltrada
 - Exposición prolongada a los agentes alquilantes



Factores que influyen en la recolección

- Factores que pronostican una mala movilización:
- *Canales et al. (2001)*: pacientes con LH
 - Por lo menos 02 cursos de mini-BEAM
 - Varios regímenes diferentes de QT
 - Más de nueve meses de alquilantes



Esquema para trasplante autólogo

Movbilización de Stem Cell

Ciclofosfamida 60 mg/día IV x 2 días

En el nadir de la QT: Filgrastin 10 mcg/kg/día



Leucocitos $> 1000/\text{mm}^3$



Contaje diario de células CD34⁺ por inmunofentipaje



Células CD34⁺ $\geq 10/\text{mm}^3$



Iniciar Aféresis



Esquema para trasplante autólogo

Contaje de células CD34⁺
en la bolsa $\geq 2,0 \times 10^6 / \text{Kg}$

Sí

Parar la recolección

No

- Aumentar Filgrastin hasta 16mcg/kg/dia????
- Continuar la recolección



Esquema para trasplante alogénico

Mobilización de Stem Cell

Filgrastin 10 mcg/kg/dia



Em el 5^o día de movilización → Iniciar aféresis



Contaje de células CD34⁺
em la bolsa $\geq 4,0 \times 10^6 / \text{Kg}$ → Parar la recolección



Esquema para trasplante alogénico

Contaje de células CD34⁺
em la bolsa $\leq 4,0 \times 10^6 / \text{Kg}$



Aumentar Filgrastim
hasta 16mcg/kg/dia



Continuar la
recolección por
aféresis



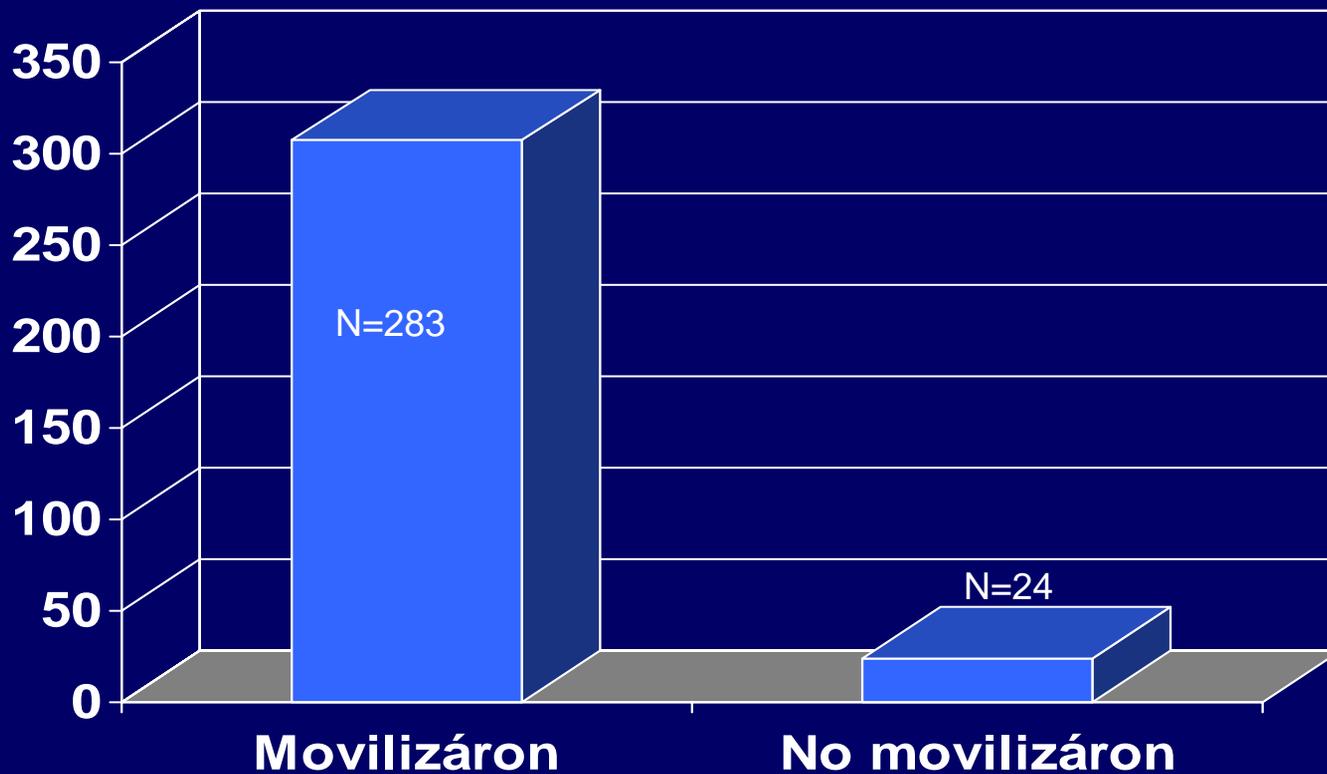
Contaje de células CD34⁺
em la bolsa $\leq 4,0 \times 10^6 / \text{Kg}$



Parar la recolección por
aféresis

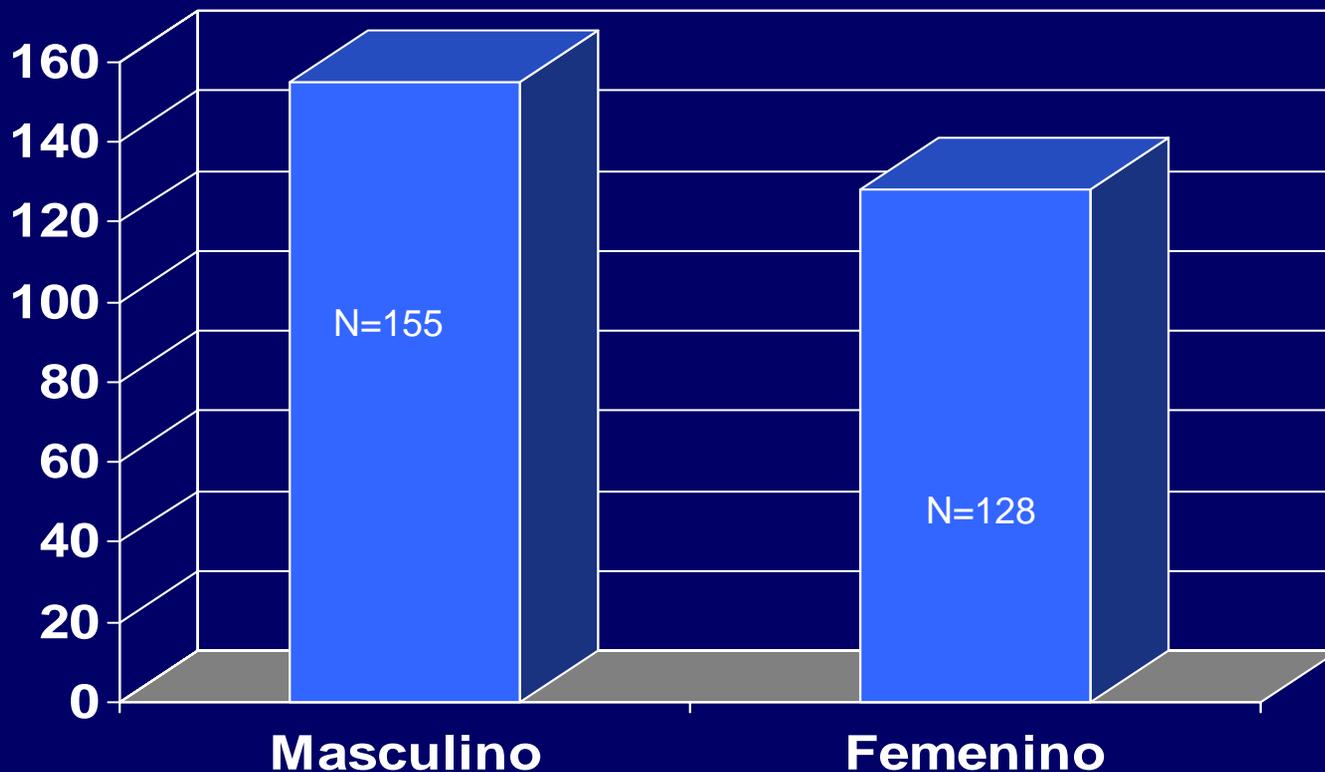


Características de los pacientes



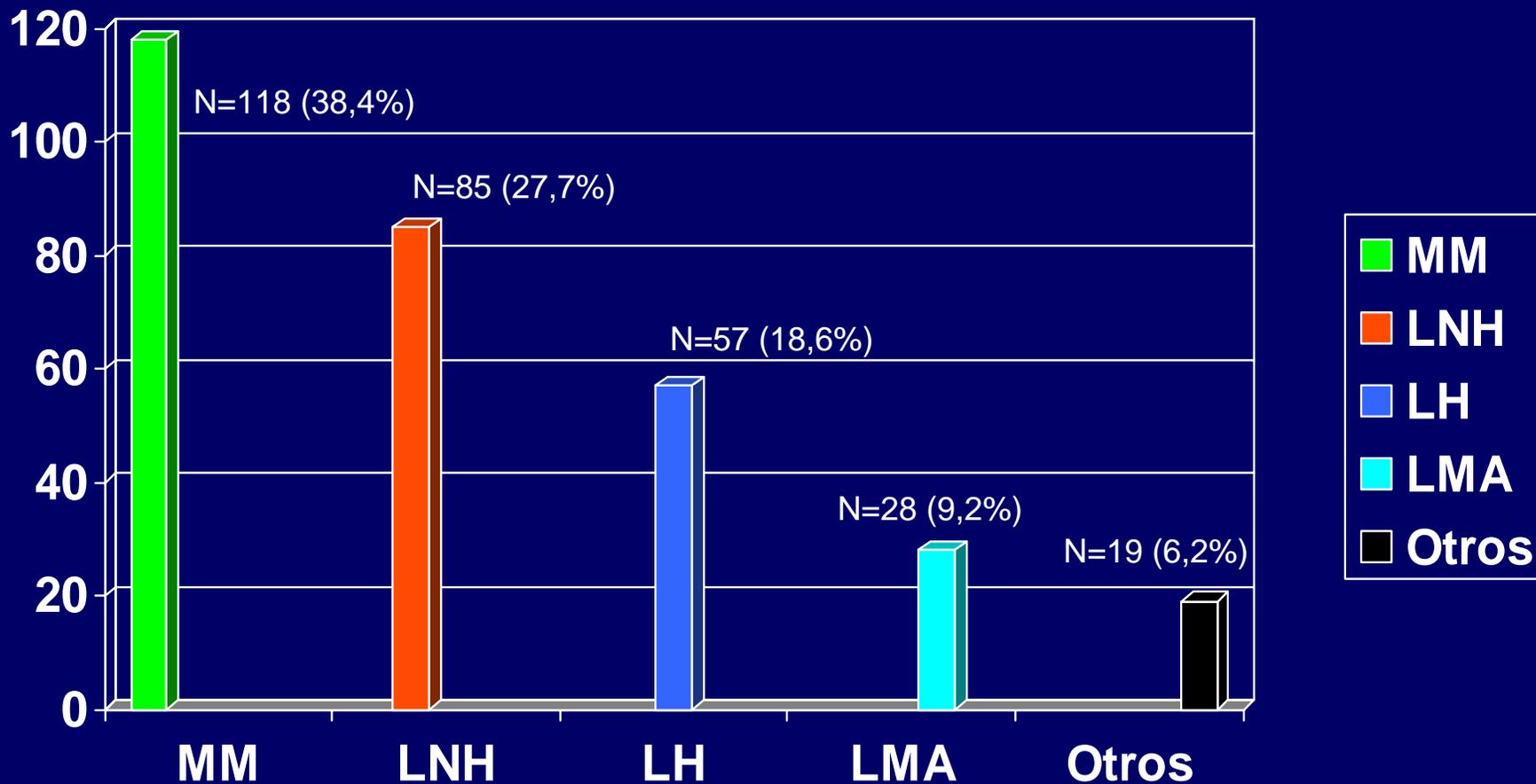


Características de los pacientes





Características de los pacientes





Características de los pacientes

•Edad

M= 42,3 años (9 – 68)

Mediana= 44 años

•Volumen sanguíneo total

•M= 4372 (1796 – 6575ml)

•VS procesados

•M= 04 (1,5 – 7)



Características de los pacientes

- **leucocitos pre:**

- M= 23807 (900- 75.000)

- **CD 34 pre:**

- M= 45 (01 – 1111) Mediana= 17

- **% CD 34 pre:**

- M= 0,46 (0,005 – 15,5) Mediana= 0,09

- **Cd 34 final en la bolsa:**

- M= 3 (0,05- 46) Mediana= 1,5



Características de los pacientes

- **Número de recolecciones:**

- M= 02 (01 – 10) Mediana= 1

- **Intervalo entre el inicio de la movilización y el pico de CD34:**

- M= 16,3 días (8 – 43)

- Mediana= 14,5 días



Potencial de las células madre





cyntia.arrais@prosangue.sp.gov.br