

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para
aplicações clínicas

VANESSA DE SOUZA VALIM

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para
aplicações clínicas

VANESSA DE SOUZA VALIM

Orientador: Lucia Mariano da Rocha Silla. Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Valim, Vanessa de Souza

Estudo sobre condições do cultivo de células-tronco mesenquimais para aplicações clínicas / Vanessa de Souza Valim. -- 2012.
58 f.

Orientadora: Lucia Mariano da Rocha Silla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Células-Tronco Mesenquimais. 2. Terapia Celular . 3. Lisado de Plaquetas. 4. Doença do Enxerto Contra Hospedeiro. I. Silla, Lucia Mariano da Rocha , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

...À Dra Lúcia pela orientação, ensinamentos ao longo da execução deste trabalho, por me oportunizar a trabalhar com algo que tanto gosto e pelo entusiasmo que sempre acreditou no meu trabalho;

...Às colegas de laboratório: Annelise Pezzi, Bruna Amorin e Maria Aparecida da Silva pela ajuda na execução do trabalho e pelo companheirismo;

...Aos IC's pelo suporte ao laboratório e produção científica;

...Aos colegas que passaram pelo laboratório ao longo da execução do trabalho pelo companheirismo e pelos conhecimentos compartilhados;

...À minha família pelo mais importante incentivo e apoio que se pode ter.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

Introdução: Células-troco mesenquimais (CTM) vêm mostrando seus benefícios na doença do enxerto-versus-hospedeiro (DECH), observada no transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH), existem três questões em aberto: (1) Expansão de CTM em meio de cultura suplementado com soro fetal bovino (SFB), pelo o risco de xenorreação; (2) Otimização de condições de cultura para a obtenção, em tempo hábil, de um número que permita de 4 a 6 infusões de 2×10^6 cells/kg do receptor; (3) Obter células do doador de medula óssea, evitando assim a utilização de um terceiro doador. **Objetivos:** Este estudo foi desenhado para comparar o lisado de plaquetas (LP) e o SFB na expansão de CTM, a densidade de plaqueamento das células e os dias entre cada passagem, e para investigar se as células nucleadas totais obtidas da bolsa e filtro do TCTH, podem ser utilizadas para expansão de CTM para utilização clínica. **Métodos:** Células residuais foram removidas do filtro e da bolsa utilizados para o TCTH, plaqueadas e depois da primeira passagem foram cultivadas em diferentes concentrações com SFB ou LP e observado o número de dias que levaram para chegar a 80% de confluência. Em seguida, as culturas com as mesmas densidades de plaqueamento foram suplementadas com LP ou SFB e depois de sete dias contou-se o número de células para analisar o quanto elas cresceram nesse período. **Resultados:** A proliferação de CTM, na presença de LP e SFB foi em média 11,88 e 2,5 vezes, respectivamente, num período de 7 dias. A concentração mais elevada de células usando LP demorou menos tempo para atingir a confluência, em comparação com os três inferiores. Este estudo sugere que o LP é a melhor escolha como suplemento para expandir CTM, e permite a proliferação de um número suficiente de CTM de doadores para uso clínico.

PALAVRAS CHAVES:

Lisado de plaquetas, Células Tronco Mesenquimais, Terapia Celular, Doença do Enxerto versus Hospedeiro, Transplante de Células Tronco Hematopoéticas.

ABSTRACT

Introduction: Mesenchymal stromal cells (MSC) have shown their benefits in graft-versus-host disease (GVHD), with three unsettled matters:(1) MSCs expansion in medium with Fetal Calf Serum (FCS) and its risk of xenoreaction; (2) The number of cells indicated for therapy is 2×10^6 cells/Kg with the need to optimize expansion, number and time wise; and (3) the utilization of third party donors. **Aims:** This study was designed to compare the platelet lysate (LP) and FCS on the expansion of MSC, the optimal cell plating density and days between each pass, and to investigate if donor total nucleated cells (TNC) obtained from the washouts of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) explants can be expanded to be used at clinical grade. **Methods:** TNC were removed, plated and after the first passage were cultivated in different concentrations with FCS or PL and the number of days reach 80% of confluence was observed. Next, cultures with the same plating density were fed either with PL or FCS and after seven days counted to analyze how much they have grown in that period. **Results:** The proliferation of mesenchymal stromal cells in the presence of PL and SFB was averaged 11.88 and 2.5 times, respectively, in a period of 7 days. The highest concentration of plating cells using PL, took less time to reach confluence as compared with the three lower ones. This study suggests that the PL is the best choice as a supplement to expand MSC, and allows the proliferation of a sufficient number of donors MSC at P2 for clinical use.

KEY WORDS:

Platelet lysate, Mesenchymal stromal cells, cell therapy, graft-versus-host disease, hematopoietic stem cell transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação da célula-tronco hematopoética nas células sanguíneas.....	15
Figura 2: Diferenciação de CTM <i>in vitro</i>	21
Figura 3: Cultura de CTM.....	21
Figura 4: Bolsa e filtro utilizados no TCTH.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>aGVHD</i>	<i>acute graft versus host disease</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
<i>BM</i>	<i>Bone Marrow</i>
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro
EVL	Enxerto versus leucemia
<i>FCS</i>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<i>GVHD</i>	<i>Graft-versus-host disease</i>
HLA	Antígenos leucocitários humano
<i>HSC</i>	<i>Hematopoietic stem cell</i>
<i>HSCT</i>	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
IL-1 α	Interleucina-1 α
IL-1 β	Interleucina-1 β
INF- γ	Interferon-gama
LP	Lisado de plaquetas
MHC	Sistema maior de histocompatibilidade
MO	Medula óssea
<i>MSC</i>	<i>Mesenchymal stromal cells</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>PL</i>	<i>Platelet Lysates</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TCTH	Transplante de célula-tronco hematopoéticas
<i>TNC</i>	<i>Total nucleated cells</i>

TNF- α Fator de necrose tumoral- α

WHO *World Health Organization*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 MEDULA ÓSSEA	13
2.2 CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA (CTH).....	14
2.3 TRANSPLANTE DE CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA (TCTH).....	15
2.4 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA O HOPEDEIRO AGUDA	17
2.5 TERAPÊUTICA PARA DECH.....	19
2.6 CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL.....	20
2.7 O USO DE CTM PARA O TRATAMENTO DA DECH.....	21
2.8 CULTIVO DE CTM PARA USO CLÍNICO.....	23
2.8.1 <i>Fatores de Crescimento utilizados no cultivo de células Mesenquimais.....</i>	23
2.8.2 <i>Doador de CTM para uso clínico na DECH.....</i>	25
2.8.3 <i>Plaqueamento.....</i>	26
3.OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4.REFERÊNCIAS.....	29
5.ARTIGO EM INGLÊS.....	40
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco hematopoéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM), encontradas na medula óssea (MO), são células indiferenciadas com capacidade de auto renovação e diferenciação. As CTH possuem a capacidade de diferenciação em células sanguíneas [1-3] e as mesenquimais, em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo e, se acredita, compõem o estroma medular [4].

O transplante de célula-tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico é o único tratamento curativo para diversas doenças hematológicas malignas [5, 6] e não malignas [7, 8]. Porém, o TCTH é acompanhado de elevada morbimortalidade, sendo a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) a complicação mais grave [9, 10]. Na DECH aguda o tratamento de escolha é o corticoesteróide que é efetivo em 25 a 70% dos casos. Para os pacientes com DECH aguda resistente a corticoesteróides existem poucas alternativas terapêuticas e a sobrevida, em dois anos, é de apenas 10% [11-19].

As CTM vem sendo muito estudadas pelo potencial imunorregulatório que possuem [20, 21] e estão sendo amplamente utilizadas em ensaios clínicos fase I e fase II em pacientes com DECH aguda que apresentam resistência aos corticoesteróides [22-24].

Porém, alguns pacientes que se beneficiaram de CTM expandidas com meio suplementado com soro fetal bovino (SFB) apresentaram anticorpos antiproteína bovina [25]. Quanto a isto, a organização mundial da saúde emitiu um parecer não recomendando o uso de produtos de origem animal na fabricação de qualquer insumo que possa ser administrado em humanos [26]. Muitos estudos clínicos, foram realizados e ainda o são, com células cultivadas

com suplemento animal [22-24], assim, há a necessidade de otimização de um protocolo, que vise uma maior segurança para o receptor.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A principal base de dados consultada foi o PubMed, utilizando as palavras-chave: *Platelet lysate*, *Mesenchymal stromal cells*, *mesenchymal stem cells*, *graft-versus-host disease*. Ao cruzar as palavras-chaves *Platelet lysate* e *Mesenchymal stromal cells*, *Platelet lysate* e *mesenchymal stem cells*, *Mesenchymal stromal cells* e *graft-versus-host disease*, *mesenchymal stem cells* e *graft-versus-host disease* foram encontrados 35, 58, 140 e 388 artigos respectivamente.

2.1 MEDULA ÓSSEA (MO)

Na medula óssea encontra-se o nicho das células-tronco hematopoéticas (CTH), que possuem a capacidade de auto-renovação e de originar a células hematopoéticas [2]. O termo "nicho da célula tronco" foi introduzido em 1980 e foi definido como uma estrutura que as abriga [3].

Atualmente há dois modelos conhecidos de nicho medular, o nicho endosteal, que é a região onde as CTH encontram-se em contato com a cavidade medular e estão quiescentes. O outro nicho é o perivascular, onde as CTH migram em direção ao centro da MO, para a zona vascular, e deixam de ficar quiescentes, regenerando de forma contínua a hematopoese [27-30].

Células-tronco mesenquimais (CTM), osteoblastos (células que revestem a cavidade da MO), células reticulares do estroma e células endoteliais, devem ser considerados os principais componentes do nicho de CTH e parecem desempenhar um papel crítico na regulação dessas células [31, 32].

2.2 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICA (CTH)

As células-tronco hematopoética (CTH) quando analisadas por citometria de fluxo devem expressar o antígeno CD34 em sua membrana. A CTH é uma célula-tronco multipotente que tem a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em todas as células que compõem a linhagem hematopoética[30].

A capacidade da CTH de se diferenciar em outras células e se auto-renovar se chama de divisão assimétrica. Existem dois mecanismos pelos quais esta assimetria pode ser alcançada, a simetria pré (assimetria divisória) e pós (assimetria ambiental). Na assimetria divisória, as duas células filhas são diferentes, uma é igual à de origem e a outra é diferenciada. Já na assimetria ambiental a célula-tronco sofre uma divisão de auto-renovação simétrica, produzindo duas células filhas idênticas, uma célula filha permanece no nicho, conservando-se células-tronco, a outra entra em contato, passivamente ou ativamente, com um microambiente diferente, e deixa de preservar o fenótipo de células-tronco, iniciando a diferenciação[29].

Dependendo do estímulo que a CTH recebe ela passa para uma célula progenitora da linhagem linfóide ou mielóide. As progenitoras linfóides dão origem aos linfócitos, enquanto a linhagem mielóide origina os granulócitos, monócitos, megacariócitos e eritrócitos (figura 1)[30, 33].

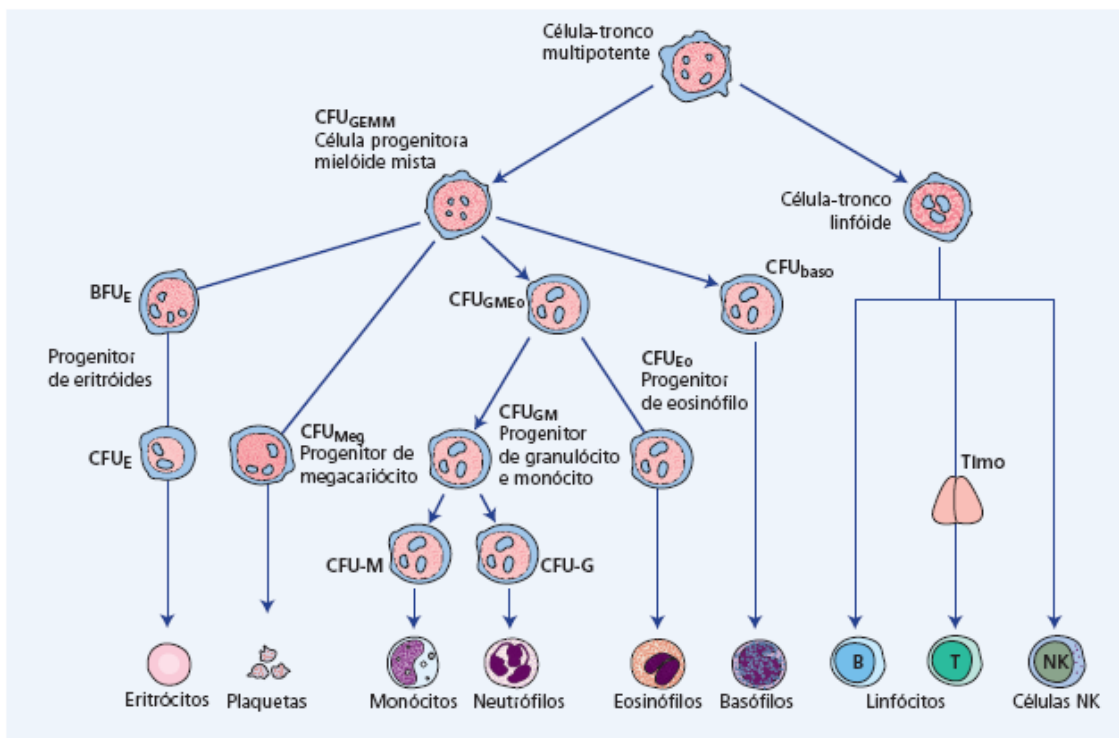


Figura 1: Diferenciação da célula-tronco hematopoética nas células sanguíneas

2.3 TRANSPLANTE DE CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA (TCTH)

As primeiras experiências de transplante de medula óssea ocorreram no início dos anos de 1950, quando animais foram irradiados e receberam células da MO alogênica. Nestes experimentos, foi observada uma “doença secundária”, hoje amplamente reconhecida como a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) [34]. Thomas em 1957 descreveu a primeira experiência com transplante alogênico de medula óssea em humanos, quando foram tratados seis pacientes com radioterapia e quimioterapia que, em seguida, receberam a infusão intravenosa de medula de um doador normal. A infusão não foi acompanhada de efeitos adversos graves, mas nenhum paciente sobreviveu além de 100 dias [35].

Na década de 60 houve a descoberta dos genes que fazem parte do sistema maior de histocompatibilidade (MHC) e no final dessa década e início da década de 70 compreendeu-se a relação desses genes com o transplante

de MO, [36, 37] permitindo o sucesso da terapia. O desenvolvimento de melhores técnicas para um suporte transfusional plaquetário e de melhores antibióticos e agentes anticâncer mais efetivos, fez com que o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) começasse a ser utilizado como tratamento de diversas patologias [34]. Em artigo comemorativo aos 50 anos do primeiro TCTH estimou-se que aproximadamente 50.000 pessoas em todo o mundo foram beneficiadas com essa terapia até o ano de 2006 [38].

Como já referido, o TCTH alogênico é o único tratamento curativo para diversas doenças hematológicas malignas [5, 6] e não malignas, como por exemplo, as hemoglobinopatias, [7] e doenças auto imune [8]. A fonte de CTH pode ser de MO, de sangue periférico ou de sangue do cordão umbilical [8, 39].

De acordo com o tipo de doador é realizada a classificação do TCTH. Um transplante autólogo é quando o doador é o próprio receptor; quando o doador é um irmão gêmeo univitelino o transplante é denominado singênico, já quando o doador é outro indivíduo a nomenclatura é transplante alogênico. O transplante alogênico se divide em aparentado ou relacionado (quando é da mesma família) e não aparentado ou não relacionado (quando o doador não é familiar) [40].

São avaliados para a compatibilidade entre o doador e o receptor os antígenos leucocitários humano (HLA) de classe I (HLA-A, -B, -C) e classe II (HLA-DRB1). Sendo considerado um bom doador “matched” não relacionado quando 10 dos 10 alelos HLA são idênticos. Um TCTH é chamado “mismatched” quando existe disparidade em algum alelo. Quando realizado entre indivíduos com disparidade no HLA, mas com identidade de haplótipos

(pai ou mãe doadora e, menos frequentemente de um irmão) chama-se haploidentico [40].

O TCTH é acompanhado de elevada morbi-mortalidade, sendo a DECH aguda a complicação mais grave desse tipo de transplante [9, 10]. Mesmo o doador e receptor tendo o sistema HLA 100% compatível, pode ocorrer a DECH, pois há indícios de que esta possa ocorrer por disparidade de antígenos menores de histocompatibilidade [41].

2.4 DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO AGUDA

A DECH aguda é uma importante e frequente causa de morbidade e mortalidade relacionada ao TCTH alogênico, mesmo quando o grau de compatibilidade do sistema HLA é elevado [42, 43]. A sua incidência e gravidade depende de vários fatores, tais como método de profilaxia, compatibilidade entre o doador e o receptor, a intensidade do regime de condicionamento e da composição do enxerto [44]. O nível socioeconômico mais baixo do receptor parece também estar envolvido no desenvolvimento da DECH aguda [45].

A fisiopatologia da DECH ocorre em três fases já conhecidas. A primeira ocorre quando as células apresentadoras de antígenos (APCs) são ativadas pelas citocinas pró-inflamatórias resultantes da toxicidade tecidual do regime de condicionamento do transplante. Na segunda fase da doença, as APCs do receptor apresentam alopeptídeos que se ligam a moléculas de MHC, que ficam na superfície dessas células, expostas às células T do doador. Quanto maior for a disparidade HLA entre o doador e o receptor, maior é a resposta das células T. A terceira fase, ou fase efetora, é uma cascata complexa onde

as citocinas pró-inflamatórias e mediadores celulares agem em sinergia amplificando a lesão no tecido alvo [44, 46-48].

Como já referido, quando não houver disparidade HLA entre doador e receptor, as células T do doador provavelmente estão reconhecendo antígenos menores de histocompatibilidade [42].

Com o entendimento dos mecanismos causadores da DECH aguda, se estudou a possibilidade de preveni-la com a depleção de linfócitos da medula óssea antes de ser realizada a infusão, ficou demonstrado, contudo, que a depleção, embora acompanhada da redução na DECH, leva mais frequentemente à recidiva da doença maligna pois diminui o efeito enxerto versus leucemia (EVL). O efeito EVL é observado quando as células do sistema imune do doador reconhecem e matam clones malignos residuais na medula óssea do receptor, assim evitando a recidiva da doença [49].

Tradicionalmente, a DECH era classificada como aguda quando iniciada até 100 dias após o TCTH, mas essa definição não é mais utilizada, pois há situações em que, a DECH aguda pode ocorrer após este período particularmente em pacientes que receberam condicionamento de intensidade reduzida [50].

A DECH aguda envolve mais frequentemente tecidos como a pele, trato gastrintestinal, fígado e pulmão. O quadro clínico poderá variar desde formas benignas, como um *rash* cutâneo leve e alterações discretas da função hepática, até formas graves e fatais. Nesses casos, é frequente o aparecimento de lesões bolhosas na pele decorrentes da lise da epiderme, diarreia grave, associada a náuseas, vômitos, dor abdominal intensa e acometimento hepático com colestase grave [42].

2.5 TERAPÊUTICA PARA A DECH

O tratamento de primeira linha para a DECH aguda é baseado em corticosteróides. Indivíduos que responderam a doses altas da droga até o 5º dia após o início do tratamento, tiveram 27% de mortalidade, enquanto que, a mortalidade nos que necessitaram de tratamento prolongado com doses elevadas foi de 49% [51]. A taxa de resposta aos corticoesteróides oscila muito entre os diferentes estudos, a resposta completa pode variar de 25% à 70% e respostas parciais podem variar de 53% à 78%. Como já ressaltado, pacientes com DECH severa resistente a esteróides tem poucas alternativas terapêuticas e a sobrevida em dois anos após o TCTH é de 10% [11-19].

O longo período em que pacientes transplantados ficam imunossuprimidos torna-os mais vulneráveis a infecções. Essas infecções associadas a DECH aguda, parecem aumentar a imunodeficiência associada ao TCTH [47].

A intervenção na produção das citocinas parece ser uma abordagem óbvia para bloquear a indução da GVHD, visto que as citocinas tem efeitos desfavoráveis, mas estudo em animais que utilizaram anticorpos ou agentes antagonistas da função de TNF- α reduzindo a injúria do sistema gastrointestinal apresentaram menos efeito enxerto versus leucemia efeito (EVL), talvez por ter menor ativação celular [46].

No início da década de 2000 alguns estudos começaram a mostrar que as células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam capacidade *in vitro* de inibir linfócitos alorreativos [52, 53].

2.6 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAL (CTM)

As CTM foram descritas pela primeira vez em 1970 por Friedenstein como sendo células não hematopoéticas da MO que formam colônias fibroblastóides (CFU-F) aderentes ao plástico [54]. Posteriormente foram denominadas como “Células-Tronco Mesenquimais”, pois ficou claro que elas possuem a capacidade de se auto-renovar e diferenciar em células derivadas do mesoderma embrionário: adipócitos, condrócitos e osteócitos (figura 2) [55-58].

As CTM expandidas, além de terem aderência ao plástico e serem morfológicamente parecidas aos fibroblastos (figura 3), devem expressar antígenos CD29, CD73, CD90, CD105 em suas membranas quando analisadas por citometria de fluxo. Já os antígenos CD03, CD14, CD34, CD45, e HLA-DR devem aparecer em no máximo 2% das células cultivadas para ser considerado um cultivo puro [59, 60].

Provavelmente as CTM cultivadas são derivadas do nicho perivascular, portanto a característica dessas células de se diferenciar em vários tipos celulares, reflete a capacidade desse nicho na manutenção tecidual. A CTM pode ser isolada da MO, tecido adiposo, [58] tecido muscular esquelético, derme, [61] membrana sinovial, [62] endotélio da veia umbilical, [63] rim, [64] ligamento periodontal, [65] e pulmão [66]. Há evidências de que as células estão nas paredes dos vasos sanguíneos, independente do órgão que se encontram, por isso elas são chamadas de pericitos [58].

Na MO as CTM dão suporte a hematopoese, especialmente na produção do microambiente hematopoético, que regula a manutenção e a diferenciação das CTH [3].

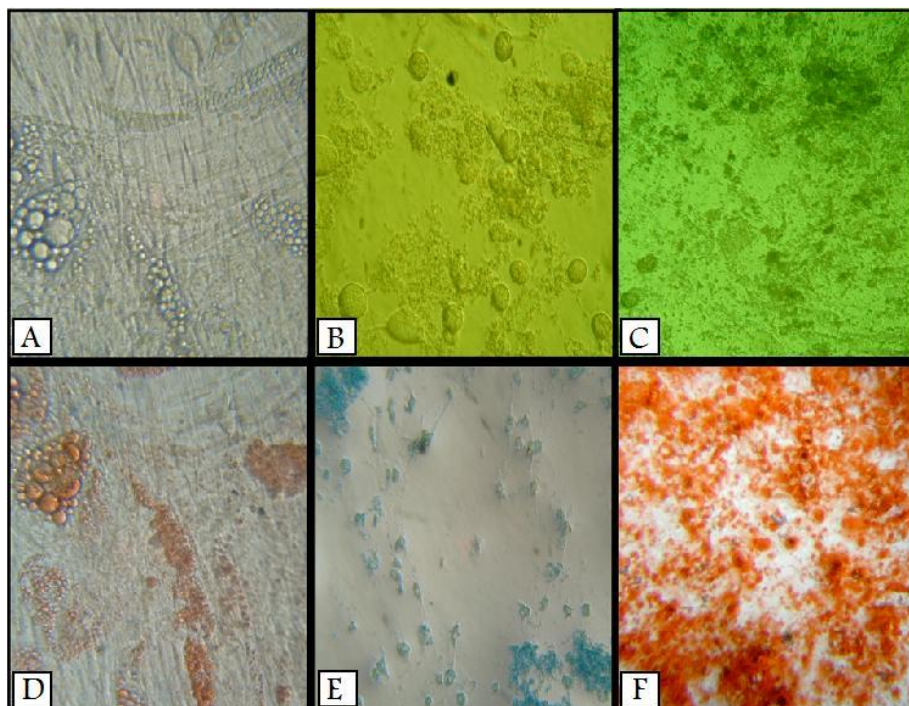


Figura 2: Diferenciação de CTM *in vitro*; A. Adipogênica sem coloração; B. Condrogênica sem coloração; C. Osteogênica sem coloração; D. Adipogênica com coloração (Oil Red); E. Condrogênica com coloração (Alcian Blue); F. Osteogênica com coloração (Alizarin Red) .

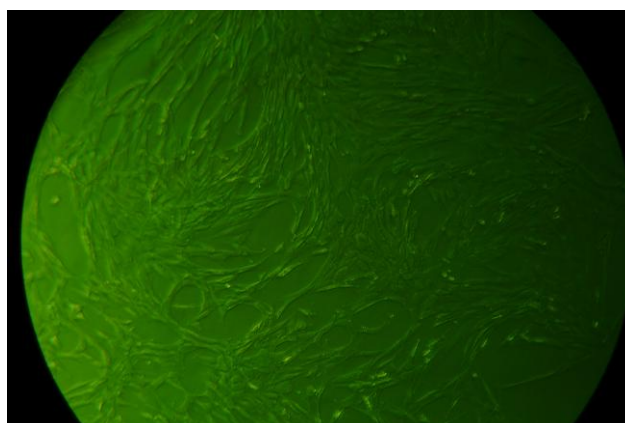


Figura 3: Cultura de CTM, células crescem aderidas e apresentam formato fibroblastóide.

2.7.0 USO DE CTM PARA O TRATAMENTO DA DECH

Por inibir a proliferação e a atividade citotóxica das células alorreativas, as CTM têm sido clinicamente aplicadas para tratar a DECH aguda resistente a esteróides. Vários ensaios clínicos fase I e II sobre a utilização de CTM no tratamento da DECH esteróide resistente tem sido relatados [22-24].

Em 2004 foi descrito o primeiro uso de CTM para DECH aguda grau IV, em um menino de nove anos. As mesenquimais eram haploidenticas, sendo doadas pela mãe do paciente. Com duas infusões de CTM o menino permanecia vivo após um ano do TCTH [67]. Em estudo realizado por Le Blanc e col. foram descritos 55 pacientes com DECH aguda grau II a IV, resistente aos esteróides tratados em diferentes países da Europa. A resposta terapêutica ocorreu em 52% dos pacientes de forma independente da compatibilidade HLA, já que das 92 infusões realizadas 69 foram preparadas a partir de doadores saudáveis, não relacionados e não HLA idênticos [22].

Destes ensaios clínicos foi evidenciado que as CTM interagem e influenciam outras células, embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente compreendidos. Acredita-se que as CTM podem imunomodular, principalmente, com as células Natural Killer, os monócitos e as T Regulatórias [20, 21].

Estudos mais recentes mostram que as CTM estão intimamente ligadas ao sistema imune inato modulando a atividade de diferentes tipos celulares com o envolvimento de inúmeras citocinas a eles relacionadas.[3] Diferentes estímulos podem influenciar a CTM a ser recrutada ao foco inflamatório, como por exemplo a citocina pró-inflamatória interferon γ (INF- γ), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a Interleucina-1 α (IL-1 α) e a Interleucina1 β (IL-1 β). Proteínas pertencentes ao sistema do Complemento, também parece ser ativadas para recrutar CTM [68]. A CTM exerce um efeito parácrino no tecido lesado inibindo a produção das citocinas pró-inflamatórias como por exemplo o INF- γ [69].

Recentemente tem-se demonstrado que as CTM interferem na diferenciação, maturação e na função de células dendríticas, pela produção de fatores solúveis como a Interleucina-6 (IL-6) e o Fator Estimulador de Colônia – Macrófagos (CSF-M). [70] Em modelos animais, as CTM também podem inibir a proliferação, ativação e secreção de moléculas IgG por células B.[71] Além disso, parecem alterar o perfil de secreção de células natural killer e modifica o perfil TH1 pró-inflamatórias para o perfil anti-inflamatório TH2 das células T.[72] Finalmente, as CTMs, *in vitro*, inibem fortemente a proliferação de linfócitos T deixando-as em G0/G1 do ciclo celular e induzem a expansão de célula T regulatórias [73].

2.8 CULTIVO DE CTM PARA USO CLÍNICO

2.8.1 Fatores de Crescimento utilizados no cultivo de células Mesenquimais

Na maioria dos estudos *in vivo*, as CTM são cultivadas em meio suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) [74]. Em 1997, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um memorando aconselhando que, quando possível, não seja utilizado insumos de origem bovina na prática farmacêutica, ou em qualquer produto que seja administrado em pacientes, devido ao risco de xenorreação [26]. Nesta mesma época foi publicado um estudo onde pacientes com HIV foram tratados com linfócitos cultivados com 5% de SFB, onde dos doze pacientes tratados, oito apresentaram anticorpos antiproteína bovina [75].

Foram relatados casos adicionais de xenorreação, com a infusão de células dendríticas cultivadas em meio suplementado com 10% de SFB em

pacientes com melanoma. Seis dos sete pacientes apresentaram anticorpos IgG e IgM anti-SFB e anti-albumina de soro bovino e um deles apresentou aumento de IgE que foi acompanhada de reação anafilática de hipersensibilidade tipo I.[76] Em dois pacientes que receberam células T geneticamente modificadas, cultivadas na presença de SFB, observou-se que no que desenvolveu resposta imune contra o SFB as células geneticamente modificadas praticamente desapareceram (1%) enquanto que, 10 anos após, o paciente sem resposta imune ao SFB apresentava ainda 20% destas células modificadas circulantes, de acordo com estes dados, é possível que a utilização de SFB no cultivo celular, comprometa o sucesso da terapia gênica [77].

A presença de anticorpos anti-proteína bovina foi também detectada em pacientes tratados com CTM cultivadas. Dos 12 pacientes tratados para DECH ou cistite hemorrágica, três foram positivos, sem que compromettesse a resposta ao tratamento [25].

Baseados nos resultados acima, alguns estudos vem sendo realizados no intuito de substituir o SFB nas culturas de CTM, podemos citar como alternativas o soro humano, plasma ativado por trombina e o lisado de plaquetas (LP), [78-82] sendo que o LP parece ser o mais favorável de se usar [82].

É importante salientar que na maioria dos ensaios clínicos sobre a utilização de CTM cultivadas, ainda se utiliza suplemento de origem animal [22-24].

2.8.2. Doador de CTM para uso clínico na DECH

Como já relatado anteriormente, as CTM expressam poucos antígenos HLA, podendo ser transfundidas sem compatibilidade entre o receptor e doador, isso torna fácil a doação, visto que um familiar pode doar para o paciente [22, 53, 67]. Foi mostrado, no entanto, que CTM podem transmitir vírus como os parvovírus B19 e herpesvirus [83, 84] sugerindo que a infusão pode expor o paciente a riscos adicionais.

Recentemente foi descrita a obtenção de CTM de MO, a partir do lavado de bolsas e filtros (figura 4) utilizados no TCTH,[78] permitindo que se utilize CTM do próprio doador de MO, abolindo riscos adicionais de transmissão de doenças. Capelli e col. em seu primeiro estudo conseguiu um número expressivo de células, mas frequentemente necessitando um longo tempo de cultura, o que não apenas torna inviável o preparo a tempo de tratar a eventual DECH aguda resistente a esteróides, como também sugerindo a infusão de células em passagens mais tardias [78]. Segundo Le blanc e col. [85], o melhor efeito imunossupressor é obtido com a infusão de células obtidas na segunda passagem. Finalmente, Sundin e col. [80], estudando a obtenção de CTM a partir de células residuais de bolsas e filtros, e cultivadas em presença de SFB, concluiu pela inviabilidade para estudos clínicos pelo reduzido número de células que obtiveram.



Figura 4: Bolsa e filtro utilizados no TCTH

2.8.3. Plaqueamento

A cinética da expansão das CTM pode ser dividida em três fases: 1) inicial, com duração de 3 a 4 dias, ocorre logo após o plaqueamento das células mononucleares da MO e o crescimento celular é muito lento; 2) logarítmica, durante as primeiras passagens em que apresenta um crescimento acelerado; 3) plateau, inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão [86, 87].

Para a terapia da DECH é necessário um grande número de células, visto que a quantidade de células utilizadas é proporcional ao peso do paciente, havendo um consenso, embora empírico, de se utilizar $2 \times 10^6/\text{Kg}$ do receptor [22, 23]. Desta forma, é necessário que a cultura tenha uma grande expansão em pouco tempo, visto que como mencionado anteriormente, quanto menor o número de passagens, melhor a resposta obtida no tratamento da DECH [85].

Como descrito por Friedenstein as CTM crescem aderidas ao plástico.[54] Diferentes autores, quando compararam a densidade de plaqueamento das CTMs, notaram que quanto menos células foram colocadas por frasco, maior foi o rendimento. Isso talvez, porque o contato célula-célula pode influenciar negativamente nos estímulos de auto-renovação da CTM. Com isso, quando visamos um número elevado de células devemos pensar em diminuir a densidade de plaqueamento, deixando-as mais distantes umas das outras [74, 87].

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Expandir células-tronco mesenquimais obtidas da bolsa e filtro utilizados no transplante de células-tronco hematopoéticas, livre de suplemento animal e em grau clínico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Expandir CTM a partir de células obtidas do filtro e bolsa utilizados no transplante de células-tronco hematopoéticas;

3.2.2. Comparar a expansão de culturas de CTM expandidas com 10% de LP e com 10% SFB;

3.2.3. Comparar quantos dias a cultura leva para atingir 80% de confluência em diferentes densidades de plaqueamento com os diferentes suplementos;

3.2.4. Verificar se o crescimento das células-tronco mesenquimais obtidas do filtro e bolsa e cultivadas com 10% de lisado de plaquetas é satisfatório para o uso clínico;

4. REFERÊNCIAS

1. Mendez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-34.
2. Heissig, B., et al., *A role for niches in hematopoietic cell development*. Hematology, 2005. **10**(3): p. 247-53.
3. Le Blanc, K. and D. Mougiakakos, *Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 383-96.
4. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends Mol Med, 2001. **7**(6): p. 259-64.
5. Sisler, I.Y., et al., *Impact of conditioning regimen in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for children with acute myelogenous leukemia beyond first complete remission: a pediatric blood and marrow transplant consortium (PBMTTC) study*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p. 1620-7.
6. Stenger, E.O., et al., *Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity*. Blood, 2012. **119**(22): p. 5088-103.
7. Yesilipek, M.A., et al., *Posttransplant oral iron-chelating therapy in patients with beta-thalassemia major*. Pediatr Hematol Oncol, 2010. **27**(5): p. 374-9.
8. Talmadge, J.E., *Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(8): p. 1121-43.

9. Baron, F., et al., *Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning*. Blood, 2004. **104**(8): p. 2254-62.
10. Tabbara, I.A., et al., *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results*. Arch Intern Med, 2002. **162**(14): p. 1558-66.
11. Deeg, H.J., *How I treat refractory acute GVHD*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4119-26.
12. Cahn, J.Y., et al., *Treatment of acute graft-versus-host disease with methylprednisolone and cyclosporine with or without an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. A multicenter phase III study*. Transplantation, 1995. **60**(9): p. 939-42.
13. Lee, S.J., et al., *Effect of up-front daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1559-64.
14. Levine, J.E., et al., *Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease*. Blood, 2008. **111**(4): p. 2470-5.
15. Couriel, D.R., et al., *A phase III study of infliximab and corticosteroids for the initial treatment of acute graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(12): p. 1555-62.
16. Martin, P.J., et al., *Evaluation of a CD5-specific immunotoxin for treatment of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation*. Blood, 1996. **88**(3): p. 824-30.
17. MacMillan, M.L., T.E. DeFor, and D.J. Weisdorf, *The best endpoint for acute GVHD treatment trials*. Blood, 2010. **115**(26): p. 5412-7.

18. Alousi, A.M., et al., *Etanercept, mycophenolate, denileukin, or pentostatin plus corticosteroids for acute graft-versus-host disease: a randomized phase 2 trial from the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network*. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 511-7.
19. MacMillan, M.L., et al., *Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002. **8**(7): p. 387-94.
20. Di Ianni, M., et al., *Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells*. *Exp Hematol*, 2008. **36**(3): p. 309-18.
21. Grazia, M.S., et al., *Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2 induced NK-cell proliferation*. *Blood*, 2011. **107**(4): p. 7.
22. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study*. *Lancet*, 2008. **371**(9624): p. 1579-86.
23. Muller, I., et al., *Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation*. *Blood Cells Mol Dis*, 2008. **40**(1): p. 25-32.
24. Kebriaei, P., et al., *Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(7): p. 804-11.
25. Sundin, M., et al., *No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in*

- allogeneic hematopoietic stem cell recipients*. Haematologica, 2007. **92**(9): p. 1208-15.
26. *Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting*. Bull World Health Organ, 1997. **75**(6): p. 505-13.
27. Lord, B.I., N.G. Testa, and J.H. Hendry, *The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur*. Blood, 1975. **46**(1): p. 65-72.
28. Gong, J.K., *Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells*. Science, 1978. **199**(4336): p. 1443-5.
29. Wilson, A. and A. Trumpp, *Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(2): p. 93-106.
30. Matsumoto, A. and K.I. Nakayama, *Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells*. Biochim Biophys Acta, 2012.
31. Lo Celso, C., J.W. Wu, and C.P. Lin, *In vivo imaging of hematopoietic stem cells and their microenvironment*. J Biophotonics, 2009. **2**(11): p. 619-31.
32. Shen, Y. and S.K. Nilsson, *Bone, microenvironment and hematopoiesis*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(4): p. 250-5.
33. A.V. Hoffbrand , P.A.H.M., J.E. Pettit, *Fundamentos em hematologia*. 5 edição ed, São Paulo: Artmed.
34. Voltarelli, J.C., *Transplante de células-tronco hematopoéticas*. 2010, São Paulo: Atheneu.

35. Thomas, E.D., et al., *Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy*. N Engl J Med, 1957. **257**(11): p. 491-6.
36. Eflenbein, G.J., E.M. Shevach, and I. Green, *Demonstration of thymus-derived cell surface antigens on various guinea-pig lymphoid cell populations by a micro-immune adherence technique*. Immunology, 1972. **23**(4): p. 523-35.
37. Shevach, E.M., W.E. Paul, and I. Green, *Histocompatibility-linked immune response gene function in guinea pigs. Specific inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by alloantisera*. J Exp Med, 1972. **136**(5): p. 1207-21.
38. Appelbaum, F.R., *Hematopoietic-cell transplantation at 50*. N Engl J Med, 2007. **357**(15): p. 1472-5.
39. Sohn, S.K., et al., *GM-CSF-based mobilization effect in normal healthy donors for allogeneic peripheral blood stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2002. **30**(2): p. 81-6.
40. Ljungman, P., et al., *Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009*. Bone Marrow Transplant, 2010. **45**(2): p. 219-34.
41. van der Zouwen, B., et al., *Alloreactive effector T-cells require the local formation of a proinflammatory environment to allow crosstalk and high avidity interaction with non-hematopoietic tissues to induce GvHD reactivity*. Biol Blood Marrow Transplant, 2012.

42. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
43. Hahn, T., et al., *Risk factors for acute graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplants for adults with leukemia*. J Clin Oncol, 2008. **26**(35): p. 5728-34.
44. Bacigalupo, A., *Management of acute graft-versus-host disease*. Br J Haematol, 2007. **137**(2): p. 87-98.
45. Silla, L., et al., *Patient socioeconomic status as a prognostic factor for allo-SCT*. Bone Marrow Transplant, 2009. **43**(7): p. 571-7.
46. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy, *Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 29-52.
47. Reddy, P., et al., *GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(1 Suppl): p. 162-8.
48. Wolf, D., et al., *Novel treatment concepts for graft-versus-host disease*. Blood, 2012. **119**(1): p. 16-25.
49. Fowler, D.H., *Shared biology of GVHD and GVT effects: potential methods of separation*. Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **57**(3): p. 225-44.
50. Filipovich, A.H., et al., *National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report*. Biol Blood Marrow Transplant, 2005. **11**(12): p. 945-56.
51. Voltarelli, J.C., *Transplante de células-tronco hematopoéticas*: Atheneu.

52. Di Nicola, M., et al., *Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3838-43.
53. Le Blanc, K., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex*. Scand J Immunol, 2003. **57**(1): p. 11-20.
54. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, and N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Exp Hematol, 1976. **4**(5): p. 267-74.
55. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. J Orthop Res, 1991. **9**(5): p. 641-50.
56. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
57. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. Science, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
58. da Silva Meirelles, L., A.I. Caplan, and N.B. Nardi, *In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2287-99.
59. Harichandan, A. and H.J. Buhring, *Prospective isolation of human MSC*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 25-36.
60. Ben Azouna, N., et al., *Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum*. Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(1): p. 6.
61. Young, H.E., et al., *Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis*

- derived from fetal, adult, and geriatric donors. Anat Rec, 2001. 264(1): p. 51-62.*
62. De Bari, C., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum, 2001. 44(8): p. 1928-42.*
63. Covas, D.T., et al., *Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res, 2003. 36(9): p. 1179-83.*
64. Almeida-Porada, G., et al., *Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. Exp Hematol, 2002. 30(12): p. 1454-62.*
65. Seo, B.M., et al., *Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet, 2004. 364(9429): p. 149-55.*
66. Sabatini, F., et al., *Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. Lab Invest, 2005. 85(8): p. 962-71.*
67. Le Blanc, K., et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet, 2004. 363(9419): p. 1439-41.*
68. Doorn, J., et al., *Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. Tissue Eng Part B Rev, 2011. 18(2): p. 101-15.*
69. Dazzi, F., et al., *The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev, 2006. 20(3): p. 161-71.*
70. Nauta, A.J., et al., *Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. J Immunol, 2006. 177(4): p. 2080-7.*

71. Deng, W., et al., *Effects of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells on T and B lymphocytes from BXSB mice*. DNA Cell Biol, 2005. **24**(7): p. 458-63.
72. Nasef, A., et al., *Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G*. Transplantation, 2007. **84**(2): p. 231-7.
73. Siegel, G., R. Schafer, and F. Dazzi, *The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells*. Transplantation, 2009. **87**(9 Suppl): p. S45-9.
74. Sotiropoulou, P.A., et al., *Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2006. **24**(2): p. 462-71.
75. Selvaggi, T.A., R.E. Walker, and T.A. Fleisher, *Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions*. Blood, 1997. **89**(3): p. 776-9.
76. Mackensen, A., et al., *Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells*. Cancer Immunol Immunother, 2000. **49**(3): p. 152-6.
77. Tuschong, L., et al., *Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(13): p. 1605-10.
78. Capelli, C., et al., *Human platelet lysate allows expansion and clinical grade production of mesenchymal stromal cells from small samples of*

- bone marrow aspirates or marrow filter washouts. Bone Marrow Transplant, 2007. 40(8): p. 785-91.*
79. Crespo-Diaz, R., et al., *Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. Cell Transplant, 2010. 20 (15): p. 797-811.*
80. Schallmoser, K., et al., *Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion, 2007. 47(8): p. 1436-46.*
81. Blande, I.S., et al., *Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. Transfusion, 2009. 49(12): p. 2680-5.*
82. Bieback, K., et al., *Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. Stem Cells, 2009. 27(9): p. 2331-41.*
83. Sundin, M., et al., *Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. Bone Marrow Transplant, 2006. 37(11): p. 1051-9.*
84. Sundin, M., et al., *Persistence of human parvovirus B19 in multipotent mesenchymal stromal cells expressing the erythrocyte P antigen: implications for transplantation. Biol Blood Marrow Transplant, 2008. 14(10): p. 1172-9.*
85. von Bahr, L., et al., *Long-term complications, immunologic effects, and role of passage for outcome in mesenchymal stromal cell therapy. Biol Blood Marrow Transplant, 2012. 18(4): p. 557-64.*

86. Bruder, S.P., N. Jaiswal, and S.E. Haynesworth, *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 278-94.
87. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(7): p. 3213-8.

5. ARTIGO EM INGLÊS

Optimization of the cultivation of donor mesenchymal stromal cells for clinical use in hematopoietic stem cell transplantation

Vanessa Valim^{1,2}, Bruna Amorin^{1,2}, Annelise Pezzi^{1,2}, Maria Aparecida Lima da
Silva^{1,2}, Lucia Silla^{1,2,3}

¹Cellular Therapy Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Center for
Experimental Research, Porto Alegre - Rio Grande do Sul – Postal Code: 90035-903
Brazil.

²Post-graduation in Medicine: Medical Sciences – Federal University of Rio Grande do
Sul, Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Postal Code: 90035-903 Brazil.

³Hematology and Bone Marrow Transplantation of Hospital de Clinicas de Porto
Alegre, Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Postal Code: 90035-903 Brazil.

Running title: Cultivation of MSC for clinical use.

Correspondence to:

Professor Lucia Silla, MD, PhD

Laboratório de Cultura Celular e Análise Molecular de Células Hematopoéticas

Centro de Pesquisa Experimental/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350

Postal Code: 90035-903- Porto Alegre/RS, Brazil

Telephone: 55 (51) 3359-8317

E-mail: lsilla@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSC) have shown their benefits in graft-versus-host disease (GVHD), with three unsettled matters:(1) MSCs expansion in medium with Fetal Calf Serum (FCS) and its risk of xenoreaction; (2) The number of cells indicated for therapy is 2×10^6 cells/Kg with the need to optimize expansion, number and time wise; and (3) the utilization of third party donors. This study was designed to determine the superiority of the Platelet Lysates (PL) over FCS on the expansion of MSC, the optimal cell plating density and days between each pass, and to investigate if donor total nucleated cells (TNC) obtained from the washouts of hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) explants can be expanded to be used at clinical grade. TNC were removed, plated and after the first passage were cultivated in different concentrations with FCS or PL and the number of days reach 80% of confluence was observed. Next, cultures with the same plating density were fed either with PL or FCS and after seven days counted to analyze how much they have grown in that period. The proliferation of mesenchymal stromal cells in the presence of PL and SFB was averaged 11.88 and 2.5 times, respectively, in a period of 7 days. The highest concentration of plating cells using PL, took less time to reach confluence as compared with the three lower ones. This study suggests that the PL is the best choice as a supplement to expand MSC, and allows the proliferation of a sufficient number of donors MSC at P2 for clinical use.

KEYWORDS: Platelet lysate, MSC, optimization, cell therapy.

INTRODUCTION

Human mesenchymal stromal/stem cells (MSC), first identified by their plastic adherence (1) are also characterized by the expression of several specific antigens such as CD90, CD73, CD105, CD146 and GD2, associated to the lack of the expression of hematopoietic markers (2-4), and by its ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts. Despite a suggested role in regenerative medicine as a broadly applicable stem cell source (5) there are mounting evidences of a predominantly paracrine activity particularly in the setting of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation where their beneficial effects have been shown in steroid resistant acute graft versus host disease (aGVHD) (6-8), in enhancing HSC engraftment (9-11), in conditioning regimen damaged tissue repair (12), and in bone marrow stromal repair (13).

MSC can be readily expanded and purified *ex vivo* from adipose and bone marrow mononuclear cells obtained from animals and humans (14-17). Clinical grade MSC expansion is usually obtained in fetal calf serum (FCS) supplemented medium (18) with its potential safety hazards. There has been shown the presence of FCS antibodies in humans after lymphocyte infusions (19, 20) and the World Health Organization (WHO) has published its concerns about xenoreactions following the infusion of bovine products in clinical practice (21). Based on this, several groups are exploiting the expansion potential of human derived products obtained from platelets lysates (PL) (14, 22-25). As for the optimal number of cells to be infused, although still a not settled matter, it has been empirically defined that for clinical efficacy it is necessary to deliver to the recipient 2×10^6 MSC/Kg (7), making it necessary to find a safe method to

obtain enough cells in the shortest period of time. We describe here our experience in *ex vivo* expansion of PL supplemented MSC, comparing its expanding potential to that obtained with FCS supplementation, and testing different culture cell densities to obtain in clinical grade MSC cultures the shorter period of time.

MATERIALS AND METHODS

PL PREPARATION

PL preparation was based on the method described elsewhere (23). In short, platelets concentrate bags from 6 donors were obtained from the Hospital de Clinicas de Porto Alegre Blood Bank immediately before their discharge time. The bags were frozen at -80°C overnight and thawed at 37°C in the next day. This procedure was repeated for five times. Next, the lysed product was centrifuged at 3220g, for 30 minutes, four times and the supernatant filtered through a $0.22\ \mu\text{m}$ filter and heparinized. The final product was stored at -20°C for up to 3 months.

PL AND FCS MEDIUM

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen corp., Carlsbad, CA, USA) was prepared with 1% penicillin G (100U/ml) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Gibco) and supplemented with 10% of either FCS or PL.

CELLS AND MSC CULTURES

Total nucleated cells (TNC) were isolated from the washouts of discharged bags and filters left over after the filtration (200 μm filters) of whole

Bone Marrow (BM) explants infusion utilized for Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) (26).

TNC were directly plated in duplicates with FCS or PL medium, at the concentration of 300.000 cell/cm². The adherent cells were trypsinized and counted at seven days of culture, irrespective of the confluence percentage. In another set of experiments, the first adherent cells layer, either expanded in the presence of PL or FCS, was detached with trypsin/EDTA (Invitrogen, USA) after obtaining 80% of confluence. After the first passage, the eluted cells were plated in the same medium as before, at a concentration of 2000 (1x10⁴/ml), 3000 (1.5x10⁴/ml), 4000 (2x10⁴/ml), 5000 (2.5x10⁴/ml), 6000 (3x10⁴/ml) and 7000 (3.5x10⁴/ml) cells/cm², and the number of days to reach 80% of confluence was recorded. MSC viability was evaluated by trypan blue staining. In an additional set of experiments the cultures were allowed to grow up to the third passage (P3) to test the ability to get a clinical grade cell number.

FLOW CYTOMETRY ANALYSIS

The MSC obtained in both sets of experiments were incubated with the following mesenchymal antibodies: HLA-DR, CD3, CD14, CD29, CD34, CD45 e CD90 (Becton, Dickinson and Company, USA). Cells were then acquired using a FASCSalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences - BD, USA) with CellQuest 3.1 software and analyzed with the Paint-A-Gate program.

DIFFERENTIATION ASSAY

At culture termination the cells obtained from all sets of experiments were used for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. Osteogenic differentiation was induced in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (DMEN Low) (Gibco, Invitrogen Corp., USA), FCS (Gibco, Invitrogen Corp.,

USA), ascorbic acid (0.2 mmol/L) (Acros Organics, Belgium), β -glycerophosphate (10mmol/L) (Sigma, Germany) and dexamethasone (0.1 μ mol/L), (Hypofarma, Brasil) for 30 days. Adipogenic differentiations were induced in Iscove's Modified Dulbecco's IMDM (Gibco, Invitrogen, USA) supplemented with 20% platelets poor human plasma, heparin (5.000UI/ml) (Eurofarma, Brasil), indomethacin (0.2mmol/L) (Merck Sharp & Dohme, USA) dexamethasone (0.1 μ mol/L), and insulin (10 μ mol/L) (Eli Lilly, Mexico). Chondrogenic differentiation was induced in DMEM Low supplemented with insulin (Cellofarm, Brazil), ascorbic acid and TGF- β (Invitrogen, USA). Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation was stained by Alizarin Red staining (Sigma, Germany), Oil Red (Sigma, Germany)), and Alcian Blue (Sigma, Germany)), respectively, as previously described (27).

STATISTICAL ANALYSIS

Results are presented as arithmetic mean and standard error. Differences between PL and FCS cultures were analyzed by *t* test and the time to obtain 80% of adherence in each cell concentration was tested by Generalized Estimating Equations. Differences were considered significant for $p < 0.05$. Statistical analysis was performed with computer software SPSS 18.0.

The study was approved by the ethics committee at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and done at the Cell Culture Laboratory of the Experimental Research Center at the same hospital, under Good Manufactory Practices conditions.

RESULTS

EXPANSION OF MSC IN PL AND FCS MEDIUM

The minimum number of platelets from which PL was obtained was 5.5×10^{10} . As showed in Table 1, in PL supplemented medium the cell expansion was 11.88-fold higher than the expansion observed in FCS medium ($p=0.005$).

Table 1 - Comparison of cell expansion in PL and FCS supplemented medium in seven days of culture*

Supplement	Mean expansion	Standard error
PL	11.88**	4.08
FCS	2.5**	1.06

* plating cell density of 5.000 cells/cm² (2.5×10^4 /ml)

** $p=0.005$

PLATING CELL DENSITY

A higher plating concentration (3.5×10^4 /mL) was more efficient to obtain 80% of confluence in the shorter period of time (6 days), when compared to 1.0, 1.5 or 2.0×10^4 /mL (7.55 to 8.55 days) $p=0.005$ (Table 2). As expected, in FCS supplemented medium the time to 80% of confluence was longer when compared to PL medium ($p=0.005$). Interestingly, with FCS there was no significant difference in plating density of 2.0×10^4 cell/ml or more, only a density lower than that was significantly less efficient ($p=0.005$) (Table 2).

Table 2 - Number of days to obtain 80% of confluence and cell plating density in 10% PL or FCS supplemented medium.

cell/ml	median days to confluence		median days to confluence	
	PL	SD	FCS	SD
1x10 ⁴	8.55	2.07	13.91	3.30
1.5x10 ⁴	8.00	2.10	13.00	3.63
2x10 ⁴	7.55	1.97	12.45*	3.45
2.5x10 ⁴	7.09*	1.97	12.27*	3.55
3x10 ⁴	6.55*	1.29	11.55*	3.45
3.5x10 ⁴	6.00*	1.41	11.27*	2.90

PL: 10% PL supplemented DMEM medium; FCS: 10% FCS supplemented DMEN medium; *p=0.005.

CLINICAL GRADE MCS EXPANSION FROM THE WASHOUTS OF DISCHARGED BAGS AND FILTERS LEFT OVER FROM BM INFUSION UTILIZED FOR HSCT

Total nucleated cells (TNC) were isolated from the washouts of discharged bags and filters of whole BM explants infusion utilized for HSCT from 6 different donors. The Table 3 summarizes information from these donors.

In the presence of 10% PL, with plating density of 5000 nucleated cells/cm² (2.5 x 10⁴/ml) it was able to consistently obtain clinical grade number of cells at the third passage (figure 1), with at least two logs of expansion (10x10⁹ or 10x10¹¹ cells) more than enough for the treatment of a 70kg patient. The mean time from mononuclear cells plating to P3 was 35 days.

Table 3 – Main characteristics from donors of filter and bags of whole BM explants infusion

Donor	Sex	Age
MSC01BF	Male	26
MSC02BF	Female	20
MSC03BF	Female	14
MSC04BF	Male	44
MSC05BF	Male	57
MSC06BF	Female	21

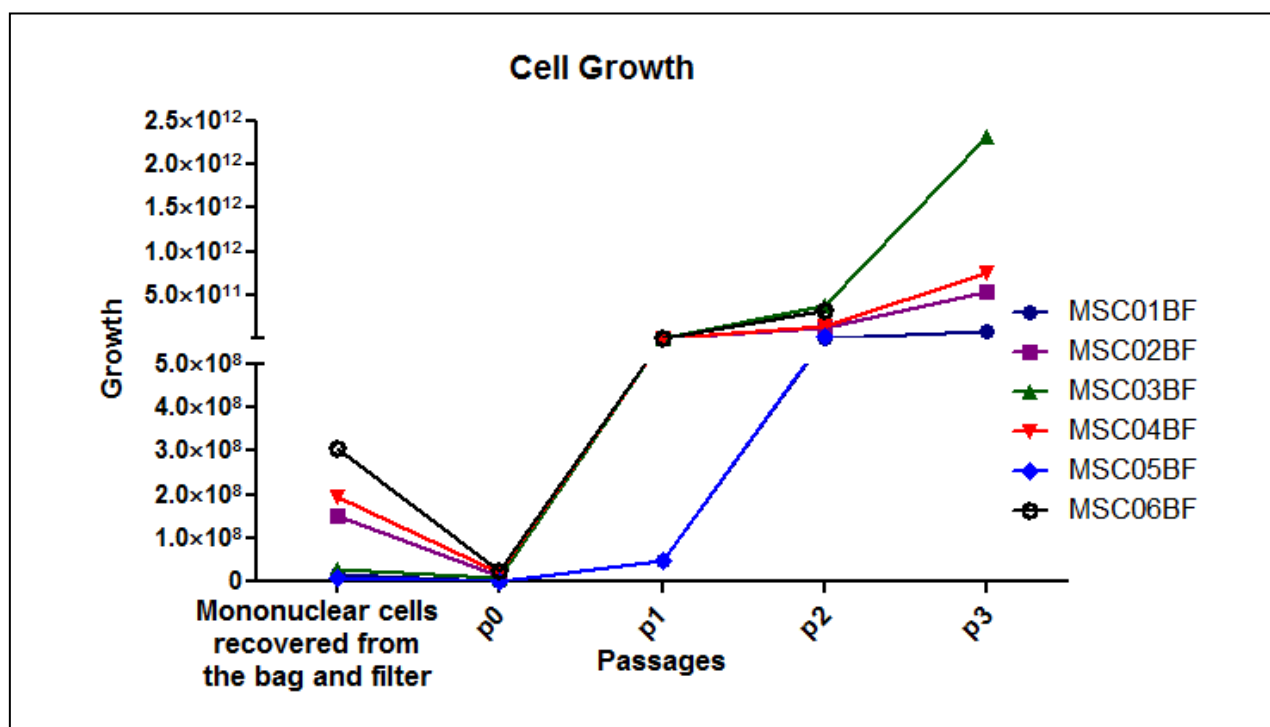
FIGURE 1 – Cell growth according to the culture passages.

Figure 1: Cell growth according to the culture passages: Expansion of cell culture removed from filter and bag until P3, when a total of cells obtained ranged from 10×10^9 to 10×10^{11} cells. This value is sufficient for the treatment of an adult.

QUALITY CONTROL OF EXPANDED MSC

All cell products irrespective of the culture medium were > 90% CD 29 and CD90 positive and negative for HLA-DR, CD3, CD14, CD34 and CD45 (Figure 2). Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation was obtained in all cultured conditions (Figure 3) at the end of the third passage.

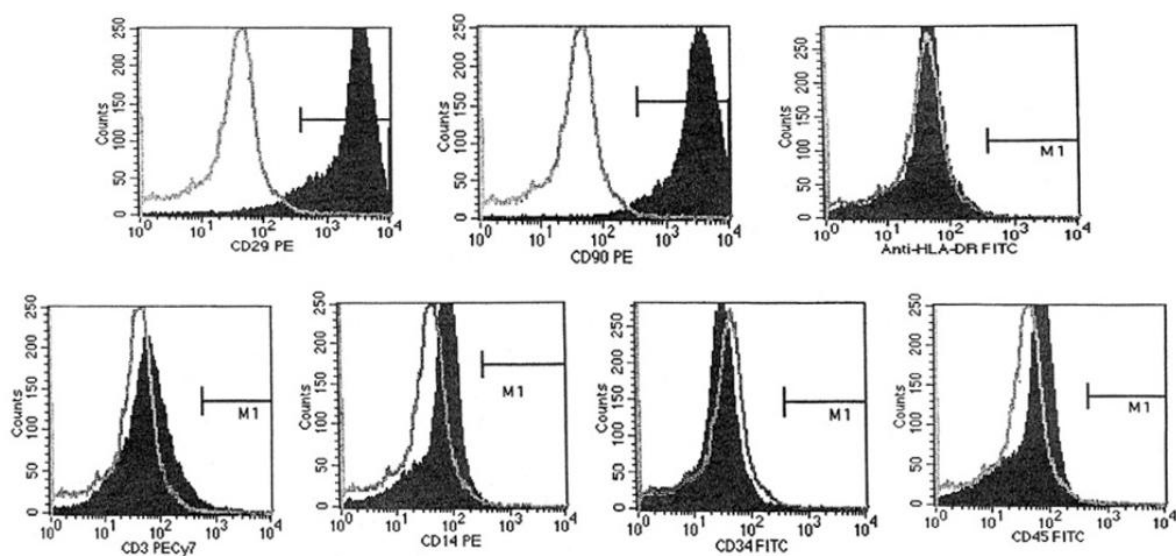


Figure 2: Cells positive for CD29 and CD90 and negative for HLA-DR, CD3, CD14, CD34 and CD45.

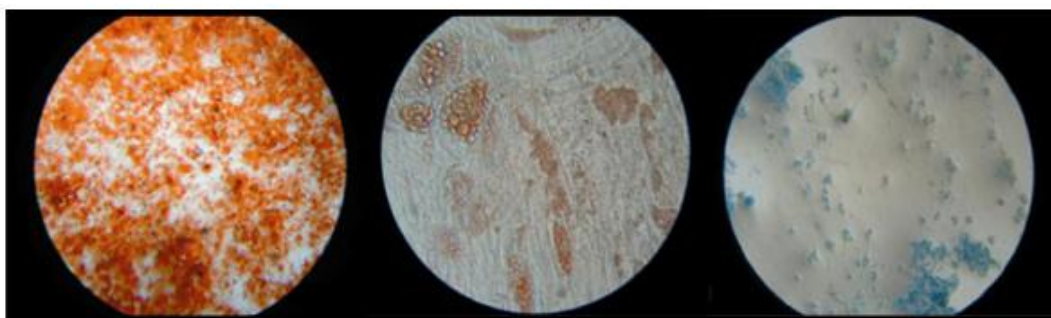


Figure 3: Osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation

DISCUSSION

Here we show that PL is significantly more efficient ($p=0.005$) than FCS supplemented medium for the *ex vivo* expansion of BM MSC. Our results are in

accordance to Blande et al (23), for adipocyte derived MSC, and Schallmoser et al for BM derived MSC. The latter group suggested that the utilization of platelets bags from 10 donors yielded more consistent results than the utilization of individual donors (28). Yet, another study exploited further this issue showing that there is a variability amongst different platelet donors and that PL expansion potential is correlated with the concentration of platelet derived growth factor and to a lesser extent to the number platelets from which the PL was prepared (29). Both studies pointed to the importance of the amount of protein and growth factors in the PL preparation. Perez-Illarbe and col., on the other hand, failed to show a significant difference on expansion potential between FCS and PL enriched or not with basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (30). In our study PL from 6 different donors, which is the average number of donors utilized in pool platelets concentrates for clinical application, was significantly superior to FCS ($p=0.005$) for BM MSC expansion. Our results were reproducible irrespectively of the PL lot utilized (data not shown).

Third party MSC infusion for cellular therapy is acceptable and it has been shown *in vitro* that pooling of MSC from several donors generate higher and more stable immune suppression (31). However, MSC have shown to be permissive to viruses (32, 33), although recipients of those cells, albeit under intense immune suppression, did not develop clinical signs of infection or had detectable virus DNA or anti-virus Ab after MSC infusion indicating the absence of infection. In the HSCT setting, the receptor is already subjected to unknown infections or to a possible chromosomal abnormality carried by the HSC donor (34, 35) since HSCT is a life saving procedure these are considered unavoidable collateral risks. The ideal scenario for *in vitro* expanded MSC

therapy would be to obtain MSC from the same HSC donor, thus minimizing additional risks. There are, however, practical implications for that. The main obstacle is to obtain BM MSC from unrelated donors particularly when the HSC comes from a different institution, city or country. Washouts of discarded bone marrow collection and filters can be an alternative as it has been shown by us and others (26) to yield a high number of MSC, particularly when expanded in a PL enriched medium. A second obstacle is to be able to obtain enough number of cells in a short period of time. Here we showed that plating 2.5 to 3.5×10^4 cell/ml in a PL supplemented medium can diminish the time to obtain 80% of confluence and hence speed up the passages. This culture could be utilized for the first infusion for the treatment of aGVHD, while a concomitant initiation of a second culture with a lower cell concentration, which has been shown to yield a higher number of cells (31), would allow the preparation of the following infusions, even though it remains to be defined how many infusions and/or the ideal number of cells to be infused. Finally, in a recent study, the utilization of a PL has shown to have a protective effect on MSCs chromosomal instability, when compared to FCS supplemented medium (36), further favoring human products to prepare culture cell for therapy.

In conclusion, here we showed that we were able to obtain in a consistent way the GMP expansion of clinical grade donor MSC grown in the presence of PL to be utilized for therapy in the HSCT setting.

REFERENCES

1. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Experimental hematology*. 1974;2(2):83-92.
2. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
3. Martinez C, Hofmann TJ, Marino R, Dominici M, Horwitz EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4245-8.
4. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Experimental hematology*. 2008 Aug;36(8):1035-46.
5. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*. 2001 Jun;7(6):259-64.
6. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, et al. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Jul;15(7):804-11.

7. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008 May 10;371(9624):1579-86.
8. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best practice & research*. 2011 Mar;24(1):65-72.
9. Fouillard L, Chapel A, Bories D, Bouchet S, Costa JM, Rouard H, et al. Infusion of allogeneic-related HLA mismatched mesenchymal stem cells for the treatment of incomplete engraftment following autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):568-70.
10. Le Blanc K, Samuelsson H, Gustafsson B, Remberger M, Sundberg B, Arvidson J, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*. 2007 Aug;21(8):1733-8.
11. Macmillan ML, Blazar BR, DeFor TE, Wagner JE. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone marrow transplantation*. 2009 Mar;43(6):447-54.
12. Ringdén O, Uzunel M, Sundberg B, Lönnies L, Nava S, Gustafsson J, et al. Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia* (08876924). 2007 11;21(11):2271-6.
13. Fouillard L, Bensidhoum M, Bories D, Bonte H, Lopez M, Moseley AM, et al. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a

patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia*. 2003 Feb;17(2):474-6.

14. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*. 1997 Feb;64(2):278-94.

15. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of cellular physiology*. 2007 Nov;213(2):341-7.

16. Owen M. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science*. 1988;10:63-76.

17. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001 Apr;7(2):211-28.

18. Grisendi G, Anneren C, Cafarelli L, Sternieri R, Veronesi E, Cervo GL, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy*. Jul;12(4):466-77.

19. Selvaggi TA, Walker RE, Fleisher TA. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*. 1997 Feb 1;89(3):776-9.

20. Sundin M, Ringden O, Sundberg B, Nava S, Gotherstrom C, Le Blanc K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica*. 2007 Sep;92(9):1208-15.

21. WHO. Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. . Bulletin of the World Health Organization. 1997;75(6):9.
22. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. J Cell Physiol. 2007 Apr;211(1):121-30.
23. Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, et al. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. Transfusion. 2009 Dec;49(12):2680-5.
24. Carrancio S, Lopez-Holgado N, Sanchez-Guijo FM, Villaron E, Barbado V, Tabera S, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. Experimental hematology. 2008 Aug;36(8):1014-21.
25. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Spano C, Isensee G, Staiber A, et al. Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. Cytotherapy. 2006;8(5):437-44.
26. Capelli C, Salvade A, Pedrini O, Barbui V, Gotti E, Borleri G, et al. The washouts of discarded bone marrow collection bags and filters are a very abundant source of hMSCs. Cytotherapy. 2009;11(4):403-13.
27. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handbook of experimental pharmacology. 2006(174):249-82.

28. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2007 Aug;47(8):1436-46.
29. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2010 Nov;12(7):888-98.
30. Perez-Illzarbe M, Diez-Campelo M, Aranda P, Tabera S, Lopez T, del Canizo C, et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. *Transfusion*. 2009 Sep;49(9):1901-10.
31. Samuelsson H, Ringden O, Lonnie H, Le Blanc K. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2009;11(2):129-36.
32. Sundin M, Lindblom A, Orvell C, Barrett AJ, Sundberg B, Watz E, et al. Persistence of human parvovirus B19 in multipotent mesenchymal stromal cells expressing the erythrocyte P antigen: implications for transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008 Oct;14(10):1172-9.
33. Sundin M, Orvell C, Rasmusson I, Sundberg B, Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone marrow transplantation*. 2006 Jun;37(11):1051-9.
34. Hertenstein B, Hambach L, Bacigalupo A, Schmitz N, McCann S, Slavin S, et al. Development of leukemia in donor cells after allogeneic stem cell

transplantation--a survey of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica*. 2005 Jul;90(7):969-75.

35. Reichard KK, Zhang QY, Sanchez L, Hozier J, Viswanatha D, Foucar K. Acute myeloid leukemia of donor origin after allogeneic bone marrow transplantation for precursor T-cell acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 2006 Mar;81(3):178-85.

36. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell transplantation*. 2010 Nov 19.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As terapias com células-tronco mesenquimais estão em uma fase de grande expansão, e são de grande contribuição trabalhos que visam a segurança para pacientes e otimização de expansão dessas células.

Considerando a expansão das células mesenquimais com lisado de plaquetas, obtidas do filtro e da bolsa utilizados no Transplante de células-tronco hematopoéticas, após 28 dias ao transplante já teremos células na segunda passagem para a infusão. Nossos resultados mostraram que nessa passagem nossas culturas já tinham atingido mais que 10^{10} células, sendo suficiente para congelarmos doses separadas e realizar inúmeras infusões no mesmo paciente, utilizando o mesmo doador. O tempo necessário para a obtenção de células permite inclusive que se realize todos os testes de qualidade para a liberação de um produto celular para uso clínico, seguro, livre de bactérias, endotoxinas e de xenoproteínas.