UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

FABIANA AKIL

Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas

Ribeirão Preto

2018

FABIANA AKIL

Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.

Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientador: Prof. Dr. Gil Cunha De Santis

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Akil, Fabiana

Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas - Ribeirão Preto, 2018.

73 f.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia.

Área de concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Orientador: De Santis, Gil Cunha

1. Transplante autólogo 2. Células tronco 3. Recrutamento 4. Coeficiente de eficiência
5. Eficácia

Nome: AKIL, Fabiana

Título: Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia, Área de Concentração: Hemoterapia e Medicina Transfusional.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

*Aos meus pais que me deram a vida e o
amor ao estudo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela luz de amor que envolve a minha vida.

Certa vez, li que a missão de um pai para com os filhos é: conduzir o seu protegido pelo bom caminho, ajudá-lo com os seus conselhos, consolá-lo nas suas aflições, sustentar sua coragem nas provas da vida. Obrigada aos meus pais, Pedro Paulo e Vera Lúcia por seguirem com exatidão a missão de vocês. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês.

Ao meu amor, Márcio Rodrigo de Lucia, que caminha ao meu lado sempre me impulsionando a ser uma pessoa melhor. Obrigada pela imensa paz que me traz.

Ao vovô Benedito, que entrou em minha vida no momento em que mais estava confusa, iluminou meu caminho e se ajudou a seguir em frente.

Ao meu mestre, Dr. Benedito Prado Junior pelo apoio, paciência e ânimo quando tudo parecia perdido.

Ao meu orientador, Dr. Gil por ter confiado em mim.

Aos meus queridos amigos e companheiros da Hemoterapia que fazem parte da minha jornada e participam ativamente da construção do meu conhecimento sempre me contemplando com seus ensinamentos e torcendo pelo meu crescimento profissional e pessoal.

Fabiana Akil

*O amor fraternal, sublime e puro,
representando o objetivo supremo do
esforço de compreensão, é a luz
imperecível que sobreviverá no caminho
eterno.*

Emmanuel

RESUMO

AKIL, Fabiana. **Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas.** 2018. 73 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), Ribeirão Preto, 2018.

Trata-se de proposta para avaliar a estratégia utilizada na coleta de células progenitoras hematopoéticas, por aférese, em dias subsequentes, no Hemorio compreendendo o período de julho de 2004 a julho de 2015 com o objetivo de verificar se a eficiência ou a eficácia de coleta se deterioram nos dias subsequentes. Os resultados desse estudo podem indicar se há um dia mais favorável para a coleta, no qual o processamento de maiores volumes de sangue poderá aumentar a chance de sucesso, reservando os dias subsequentes como exceção e não como regra, reduzindo os riscos e os custos associados às coletas múltiplas. MATERIAL E MÉTODOS: Foram estudados 109 procedimentos de aférese em 47 pacientes mobilizados apenas com G-CSF e com coleta iniciada no D5 de mobilização. Analisamos a eficiência e a eficácia dos procedimentos em sujeitos de pesquisa submetidos a até 3 procedimentos subsequentes, comparando pareadamente os resultados entre os dias 1 e 2 e, entre os dias 2 e 3. Também foram avaliadas as variáveis células CD34⁺ pré coleta e volemias processadas. RESULTADOS: Encontramos diferenças estatisticamente significantes e decrescentes entre as eficácias diárias de coleta. Não encontramos diferença significativa entre as contagens pré-aférese de CD34⁺/μL entre os dias 1 e 2, mas encontramos redução desta no dia 3 em relação ao dia 2. Quanto às volemias processadas, não houve diferença entre os dias 1 e 2 ou entre os dias 2 e 3. A média institucional do coeficiente de eficiência foi de 50.51 %. DISCUSSÃO: A eficácia do procedimento de aférese depende de fatores físicos e biológicos. A manutenção da eficiência do processo entre os diferentes dias de coleta parece estar associada aos fatores físicos envolvidos, como o gradiente de densidades, o equipamento, o protocolo de coleta e as volemias processadas, que permaneceram estáveis. Entretanto, a despeito da manutenção da eficiência do processo, a verificação de uma eficácia decrescente entre os dias 1 e 2, mesmo com a estabilidade das contagens pré-coleta de CD34⁺, sugere deterioração do recrutamento intra coleta, enquanto a queda ainda maior da eficácia entre os dias 2 e 3, entre os quais verificamos redução das contagens de CD34⁺ pré-coleta, indica deterioração da mobilização em andamento, não se podendo descartar também a piora do recrutamento intra coleta. Nossos resultados sugerem que o planejamento da coleta de CPHSP por aférese seja feito de modo a atingir a meta em um dia de coleta, no dia 5, biologicamente mais favorável à coleta, utilizando excepcionalmente a coleta subsequente no dia 6 para complementação. Esse planejamento inclui o uso do CE2 do serviço para estimar, para cada indivíduo, o volume de sangue a ser processado e o manejo adequado da toxicidade ao anticoagulante, visando quando possível, a coleta em um único procedimento.

Palavras-chave: 1. Transplante autólogo 2. Células tronco 3. Recrutamento 4. Coeficiente de eficiência 5. Eficácia

ABSTRACT

AKIL, Fabiana. **Evaluation of the strategy of collection of hematopoietic progenitor cells on subsequent days for autologous transplantation in patients with hematological pathologies.** 2018. 73f. Dissertation (Professional Master's Degree in Hemotherapy and Biotechnology) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

This is a proposal to evaluate the strategy used in the collection of hematopoietic progenitor cells by apheresis on subsequent days in Hemorio, from July 2004 to July 2015, in order to verify if the efficiency or efficacy of collection deteriorate on subsequent days. The results of this study may indicate if there is a more favorable day for collection, in which the processing of larger volumes of blood may increase the chance of success, reserving the subsequent days as an exception and not as a rule, reducing the risks and associated costs collection. MATERIALS AND METHODS: A total of 109 apheresis procedures were studied in 47 patients mobilized with G-CSF alone and with collection initiated in D5 mobilization. We analyzed the efficiency and efficacy of procedures in subjects submitted to up to 3 subsequent procedures, comparing the results between days 1 and 2 and between days 2 and 3. We also evaluated the CD34⁺ pre-collection and processed blood volume. RESULTS: We found statistically significant and decreasing differences between daily efficacies of collection. We did not find a significant difference between the pre-apheresis CD34⁺/μL counts between days 1 and 2, but we found a reduction in CD34⁺/μL counts in day 3 in relation to day 2. About the blood volume processed, there are no differences between days 1 and 2, or between days 2 and 3. The institutional average of the coefficient of efficiency was 50.51%. DISCUSSION: The efficacy of the apheresis procedure depends on physical and biological factors. The maintenance of the efficiency of the process between the different days of collection seems to be associated to the physical factors involved, such as the density gradient, the equipment, the collection protocol and the processed blood volumes, which remained stable. However, in spite of the maintenance of the efficiency of the process, the verification of a decreasing efficacy between days 1 and 2, even with the stability of the pre-collection CD34⁺ counts, suggests deterioration of the intra-collection recruitment, while the even efficacy between days 2 and 3, among which we observed a reduction in pre-collection CD34⁺ counts, indicating deterioration of mobilization in progress, and the worsening of intra-collection recruitment cannot be ruled out. Our results suggest that the planning of CPHS collection should be done in order to reach the target on a day of collection, at day 5, that is biologically more favorable to collection, using exceptionally subsequent collection at day 6 for completeness. This planning includes the use of the CE2 of the service to estimate, for each individual, the volume of blood to be processed and the appropriate management of the anticoagulant toxicity, aiming when possible, the collection in a single procedure.

Keywords: 1. Autologous transplantation 2. Stem cells 3. Recruitment 4. Coefficient of efficiency 5. Efficacy

TABELA DE FIGURAS

Figura 1 Auto renovação e diferenciação das células progenitoras hematopoéticas.....	18
Figura 2 Hematopoese.....	20
Figura 3 Esquematização simplificada do microambiente da medula óssea	22
Figura 4 Densidade dos elementos sanguíneos.....	25
Figura 5 Modelo de movimentação das CPH entre o intra e extravascular durante a leucaférese.....	31
Figura 6 Esquematização da amostra	44
Figura 7 Boxplot da eficácia (%) no primeiro dia em relação ao número de coletas...	48
Figura 8 Boxplot da eficácia (%) no segundo dia em relação ao número de coletas...	49
Figura 9 Gráfico de correlação entre CD34 ⁺ pré coleta e CD34 ⁺ do produto	50
Figura 10 Gráfico de dispersão da variável eficácia (%) no 1° e 2° dia de coleta	51
Figura 11 Boxplot da variável eficácia (%) no 1° e 2° dia de coleta.....	51
Figura 12 Boxplot da variável eficiência (%) no 1° e 2° dia de coleta.....	52
Figura 13 Gráfico de dispersão da variável eficiência (%) no 1° e 2° dia de coleta	52
Figura 14 Gráfico de dispersão da variável volemias processadas no 1° e 2° dia de coleta	53
Figura 15 Bloxpot da viaríavel volemias processadas no 1° e 2° dia de coleta.....	53
Figura 16 Gráfico de dispersão da variável CD34 ⁺ pré no 1° e 2° dia de coleta.....	54
Figura 17 Bloxplot da variável CD34 ⁺ pré no 1° e 2° dia de coleta.....	54
Figura 18 Boxplot da variável eficácia no 2° e 3° dia de coleta	55
Figura 19 Gráfico de dispersão da variável eficácia no 2° e 3° dia de coleta.....	55
Figura 20 Bloxplot da variável eficiência no 2° e 3° dia de coleta.....	55
Figura 21 Gráfico de dispersão da variável eficiência no 2° e 3° dia de coleta.....	56
Figura 22 Boxplot da variável volemias processadas no 2° e 3° dia de coleta	57
Figura 23Gráfico de dispersão da variável volemias processadas no 2° e 3° dia de coleta	57
Figura 24 Bloxplot da variável CD34 ⁺ pré no 2° e 3° dia de coleta.....	57
Figura 25 Gráfico de dispersão da variável CD34 ⁺ pré no 2° e 3° dia de coleta	58
Figura 26 Boxplot da eficiência (%) no primeiro dia em relação ao número de coletas	59
Figura 27 Boxplot da eficiência (%) no segundo dia em relação ao número de coletas.	59

Figura 28 Gráfico em barras do CE2 (%).....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características das células tronco	19
Tabela 2 Fatores associados à mobilização ruim de CPH.....	23
Tabela 3 Vantagens e desvantagens do uso da CPH do cordão no TMO	24
Tabela 4 Projeção de procedimentos necessários em relação ao dia do processo	36
Tabela 5 Características dos pacientes de acordo com o sexo	46
Tabela 6 Características dos procedimentos de aférese	47
Tabela 7 Eficácia global e relativa no 1 º, 2 º e 3 º dia de coleta.....	48
Tabela 8 Características do CD34+ pré e coletado	49
Tabela 9 CE2 >100%	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
ABNT	Associação brasileira de Normas Técnicas
ACD-A	Citrato dextrose fórmula A
CE	Coeficiente de eficiência
CIBMTR	Center for International Blood and Marrow Transplant Research
CPH	Célula progenitora hematopoiética
Coef	Coeficiente
D	Dia
DMSO	Dimetilsulfóxido
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GVHD	Doença do enxerto contra hospedeiro
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
Kg	Quilograma
L	Litros
Min	Minutos
S1F	Esfingosina 1 fosfato
SDF -1	Fator 1 derivado da célula estromal
Sg	Sanguíneo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMO	Transplante de medula óssea
Vol	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	BREVE HISTÓRIA DO TRANSPLANTE DE MEDULA OSSÉA.....	17
1.2	O CONCEITO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	18
1.3	MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA.....	21
1.4	A COLETA DA CÉLULA PROGENITORA HEMATOPOÉTICA.....	23
1.5	EFICÁCIA.....	27
1.6	EFICIÊNCIA.....	28
1.7	RECRUTAMENTO.....	30
1.8	RISCOS E COMPLICAÇÕES.....	33
1.9	CUSTO.....	35
2	JUSTIFICATIVA.....	38
3	OBJETIVOS.....	39
4	HIPÓTESE.....	40
5	METODOLOGIA.....	41
5.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	41
5.2	MÉTODOS.....	41
5.2.1	DESENHO.....	41
5.2.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	42
5.2.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	42
5.2.4	AMOSTRA.....	42
5.3	EFICÁCIA E EFICIÊNCIA.....	44
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
6	RESULTADOS.....	46
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	46
6.2	EFICÁCIA.....	47

6.3	COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA	58
7	DISCUSSÃO	61
8	CONCLUSÕES	65
8.1.1.1	REFERÊNCIAS.....	66
8.1.1.2	ANEXOS	72
ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) em seres humanos do Hemorio.		72

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRIA DO TRANSPLANTE DE MEDULA OSSÉA

O transplante de medula óssea (TMO) remonta do final do século XIX, quando Brown-Sequard e D'Arsonaval utilizaram preparados orais de medula óssea para tratar distúrbios hematológicos, todavia sem sucesso (FOLEY, 1993). Em 1939, OSGOOD realiza a primeira infusão intravenosa de medula óssea como parte do tratamento de uma paciente com anemia aplástica (1939 apud HENIG; ZUCKERMAN, 2014). Com a explosão das bombas atômicas em Hiroshima e Nagasaki no ano de 1945, observou-se o efeito nocivo da irradiação sobre o sistema hematopoiético favorecendo a falência do mesmo. Em paralelo, temos em 1949, JACOBSON et al. demonstrando que quando protegemos o baço e fêmur de uma dose de irradiação letal, conseguimos reduzir esse efeito deletério aplásico. Em 1951, LORENZ, demonstra que o mesmo desfecho protetor surge quando, após a irradiação letal advém a infusão intravenosa de medula óssea sugerindo que, o último, resulta em um repovoamento das células com retorno da função hematopoiética (1951, apud THOMAS et al., 1999).

Em 1957, THOMAS et al descreve 6 casos de utilização de medula óssea após exposição a quimioterapia ou irradiação como parte do tratamento de desordens hematológicas e neoplásicas e, que apresentaram resultados promissores, contudo passageiros (THOMAS et al., 1957). Em 1970, BORTIN faz a revisão de mais de 200 transplantes alogênicos, demonstrando resultados insatisfatórios, o que desestimulou a realização do TMO, todavia impulsionou a busca do conhecimento científico (BORTIN, 1970).

No decorrer das décadas seguintes, diversos pontos cruciais para o sucesso do TMO foram estudados e desenvolvidos como, por exemplo, a via de aplicação da medula óssea, a fisiopatologia da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD), o sistema de histocompatibilidade maior e menor, o uso de quimioterápicos e imunossupressores no processo de transplante, aplicação de antibióticos e antifúngicos no combate de infecções, transfusão seletiva de plaquetas com a redução dos sangramentos graves e letais entre outros avanços que culminaram na realização de transplantes autológicos e alogênicos bem sucedidos

a partir da década de 80 (THOMAS et al., 1999); (HANSEN et al., 1980); (WINGARD; WIRK; BROWN, 2010).

1.2 O CONCEITO DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

No cenário da Medicina contemporânea, o TMO é o esteio da terapêutica de distintas patologias hematológicas e não hematológicas. Segundo dados extraídos do reporte/2017 do *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (CIBMTR), nos Estados Unidos, o número de transplantes de medula óssea vem crescendo desde a década de 80 atingindo em 2015 a marca de 8000/ano (D'SOUZA; FRETHAM, 2017). O princípio deste tratamento consiste na destruição das células doentes através de altas doses de quimioterapia resultando em uma aplasia grave (MOOG, 2006). Geralmente o grau de escassez celular é tão significativo que a recuperação da hematopoese se torna improvável, tornando o indivíduo vulnerável a infecções bacterianas e fúngicas graves que normalmente teriam como desfecho a sepse e o óbito. O TMO interfere nesse percurso natural promovendo o repovoamento da medula óssea com o breve retorno da função produtora celular (KOEPSSELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014).

A aplicabilidade das células tronco vem sendo explorada em diversas frentes desde a reconstituição de tecidos desvitalizados até regeneração de órgãos inteiros, reparando danos antes considerados irremediáveis. O TMO é bastante fundamentado e difundido em todo mundo, fazendo parte do tratamento de leucemias agudas e crônicas, linfomas, síndromes mielodisplásicas, mieloma múltiplo, anemia aplástica grave, anemia falciforme, neuroblastoma, algumas doenças autoimunes como a diabetes mellitus tipo I e até neoplasias sólidas (JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009).

Figura 1 Auto renovação e diferenciação das células progenitoras hematopoéticas. Fonte: própria.

As células comprometidas com a regeneração da medula óssea no TMO são as células progenitoras hematopoiéticas (CPH) (CARVALHO; GOLDENBERG, 2012). Elas são utilizadas com esse propósito por serem células precursoras primitivas com a característica de realizar divisões celulares assimétricas de forma ilimitada, assim as células-filhas podem tanto se manter indiferenciadas repondo o pool de células tronco, processo conhecido como auto renovação, quanto podem se diferenciar em qualquer linhagem celular hematopoiética como linfócito, monócito, granulócito, eritrócito e plaqueta estabelecendo a produção de todas células sanguíneas (KOESELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014); (CARVALHO; GOLDENBERG, 2012). A figura 1 apresenta uma esquematização desse processo.

Didaticamente as células tronco podem ser classificadas em categorias de acordo com sua potência de diferenciação, conforme tabela 1.

Tabela 1 Características das células tronco

Nomeclatura	Capacidade de diferenciação
Totipotentes	diferenciam-se em todos os tecidos do corpo humano, incluindo placenta e anexos embrionários
Pluripotentes	diferenciam-se em todos os tecidos do corpo humano, exceto placenta e anexos embrionários
Multipotentes	diferenciam-se em vários tipos de células de uma única linhagem
Unipotentes	diferenciam-se apenas em células do tecido ao qual pertencem

Fonte: adaptado de WAGER; WEISSMAN, 2004.

As CPH são consideradas multipotentes apresentando a capacidade de se diferenciar nas células de todas as linhagens sanguíneas em um processo conhecido como hematopoese (KOESELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014). Esse processo está esquematizado na figura 2. Fenotipicamente são caracterizadas por serem CD34⁺ e CD38⁻, que são glicoproteínas de superfície.

O sítio principal das CPH é a medula óssea, sendo normalmente raras no sangue periférico com concentrações que variam de 0,01 a 0,05% das células nucleadas. Utilizando medicações como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e/ou determinados quimioterápicos como a ciclosporina, podemos motivar o trânsito de CPH da medula óssea para o sangue periférico, o que chamamos de mobilização. Esse aumento de disponibilidade de CPH na periferia favorece a extração de parte dessas células por um processo de coleta seletiva automatizado conhecido como aférese (TIWARI et al., 2016); (MOOG, 2006).

Figura 2 Hematopoese. Diagrama mostrando a célula tronco multipotente da medula óssea e as linhagens celulares que dela se originam. Baso, basófilo; BFU, unidade formadora explosiva; CFU, unidade formadora de colônia; E, eritróide; Eo, eosinófilica; GEMM, granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica; GM, granulócito, monócito; Meg, megacariócito; NK, *natural killer*. Fonte: HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2013.

O primeiro evento de mobilização descrito na história ocorreu em 1977, no qual voluntários saudáveis apresentaram um aumento dos progenitores mielóides na circulação periférica após infusão intravenosa de endotoxinas (CLINE; GOLDE, 1977). Este é afetado por diversas variáveis como, por exemplo, sexo, idade, tipo de quimioterapia utilizada e sua associação ou não ao G-CSF, dose do G-CSF e doença de base. (MOOG, 2006).

Do ponto de vista imunológico, o TMO pode ser classificado em autólogo ou alogênico. No primeiro, a célula progenitora se origina do próprio paciente. Já no segundo, usamos um *pool* de células de doador aparentado ou não. Para que o transplante alogênico seja possível precisamos ter uma compatibilidade da maior parte dos antígenos leucocitários humanos (HLA) do complexo de histocompatibilidade maior (KOEPSSELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014).

Segundo o reporte de 2017 do CIBMTR, nos últimos anos, o transplante autólogo se destaca em relação ao alogênico. Várias são as razões como, por exemplo, não necessitar da disponibilidade de um doador, ser um procedimento menos agressivo para o doente com menor morbimortalidade, permitir a ampliação da faixa etária dos pacientes contemplados e apresentar desfechos satisfatórios. Pelos dados levantados pelo CIBMTR, em 2016, as principais indicações de TMO foram o mieloma múltiplo e o linfoma de Hodgkin. Quando essa análise é feita por tipo de transplante observamos que a leucemia mielóide aguda vem crescendo

nos alogênicos e, nos autólogos o mieloma múltiplo permanece o mais rotineiro. A principal causa de óbito nos pacientes submetidos ao TMO autólogo é a doença de base, mas outras intercorrências podem agravar o quadro clínico como, por exemplo, infecções, falência orgânica e hemorragia (D'SOUZA; FRETHER, 2017).

1.3 MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA

As CPH estão estabelecidas no microambiente da medula óssea em locais específicos denominados nichos. Este microambiente é composto por células estromais, matriz extracelular e rede microvascular. A combinação desses elementos favorece a liberação de fatores de crescimento, moléculas de adesão e citocinas que auxiliam na regulação da auto renovação, proliferação, diferenciação e tráfico de CPH entre o espaço intramedular e intravascular (THOMAS; FULU; LINK, 2002); (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT, 2013).

Acredita-se que existam 2 nichos com subpopulações diferentes de CPH. O primeiro nicho localiza-se próximo ao espaço endosteal e comporta as CPH dormentes responsáveis pela perpetuação da existência. O segundo nicho encontra-se adjacente aos vasos sinusoidais e é preenchido pelas CPH ativas, comprometidas com a proliferação e diferenciação (TO; LEVESQUE; HERBERT, 2011). Para atingir a circulação sanguínea as CPH migram pela barreira vascular através dos sinusóides (THOMAS; FULU; LINK, 2002).

Dentre as moléculas de adesão e fatores quimiotáticos implicados na regulação da cinética das CPH podemos destacar (TO; LEVESQUE; HERBERT, 2011).

- VCAM – 1/CD 106 que se liga ao receptor integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) nas CPH;
- SDF – 1/CXCL12 que se liga ao receptor CXCR4 nas CPH;
- SCF (ligante KIT) que se liga ao receptor c-KIT (CD117) nas CPH.

As CPH apresentam 2 tipos de movimentos no microambiente medular que são o *homing* e a mobilização. A mobilização já foi previamente citada como sendo a passagem de CPH da medula óssea para o sangue periférico e, o *homing* é o retorno dessas células para a medula óssea. Esse último depende de um gradiente quimiocínético em especial pela ação do fator 1 derivado da célula estromal (SDF-1) (HOFFBRAND; MOSS; PETTIT 2013).

Figura 3 Esquematização simplificada do microambiente da medula óssea – nicho vascular. Fonte: Própria.

O G-CSF e a quimioterapia agem em diversas frentes promovendo a mobilização. Dois mecanismos de ação do G-CSF se destacam, o primeiro envolve a liberação de enzimas proteolíticas que restringem a ação das moléculas de adesão e quimiocinas na medula óssea (FORD et al., 2006) através, por exemplo, da redução da expressão de VCAM-1, SDF-1 e SCF. Outro método de ação é a ativação do complemento com a liberação da esfingosina 1 fosfato (S1P) no plasma, que é um lipídio capaz de atrair as CPH para o espaço extravascular (TO; LEVESQUE; HERBERT, 2011).

Mesmo assim 5 -30% dos pacientes submetidos a mobilização com regimes baseados em G-CSF apresentam falhas. Esse percentual aumenta se o paciente apresenta critérios de alto risco como, por exemplo, exposição prévia à radioterapia extensa com abrangência da medula óssea, quimioterapia e lenalidomida (CHOW et al, 2013).

A principal ligação das CPH com o microambiente é feita pelo receptor CXCR4 das CPH e SDF – 1/CXCL12 das células estromais (LUCAS et al., 2008). Novas medicações estão sendo desenvolvidas a fim de melhorar a performance da coleta de CPH por incremento da mobilização. Nesse contexto, droga que se destaca é o plerifaxor (RUSSEL et al., 2013); (FOWLER et al., 2009). Essa medicação inibe a interação entre SDF-1 e o receptor CXCR4, facilitando o desprendimento da CPH do nicho vascular (YUAN, S; WANG, S., 2016); (LPLEVESQUE et al., 2011). O Plerixafor é administrado na dose de 240ug/kg/dia na noite do D4 da mobilização com G-CSF gerando um pico dessas células no sangue periférico em 6 – 9h (FOWLER et al., 2009). Pacientes sem sucesso na mobilização com G-CSF isoladamente ou

em conjunto a quimioterapia, ao fazerem uso de plerixafor com G-CSF em geral apresentam bons resultados (DI PERSIO et al., 2009).

Segundo TO et al, alterações que envolvem o microambiente da medula óssea e resultam em mobilização ruim das CPH ocorrem isoladamente ou se somam. São elas (TO; LEVESQUE; HERBERT, 2011).

- Fatores intrínsecos da medula óssea que resultam em número reduzido de CPH;
- Nichos defeituosos ou em número reduzido;
- Número inadequado ou resposta insatisfatória das células de suporte do microambiente.

Na tabela 2 listamos as causas clínicas que se associam a mobilização ruim e a explicação para esse desfecho.

Tabela 2 Fatores associados à mobilização ruim de CPH

Fatores	Explicação Clínica
Idade > 60 anos	Senilidade das CPH com menor reserva medular
	Alterações ósseas gerando menor atividade no nicho endosteal
Sexo Feminino	----
Doença de base	Quando envolve a medula óssea, reduz a produtividade da mesma
Quimioterapia Prévia	Efeito citotóxico gerando exaustão da auto renovação das CPH
Lenalidomina	Efeito negativo na angiogênese e na motilidade celular das CPH
Radioterapia	Quando a medula óssea se encontra no campo irradiado, este resulta em um efeito citotóxico em todas as células do microambiente

Fonte: adaptado de (JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009)

A etnia dos pacientes também parece se associar a capacidade de mobilização, com a raça caucasiana apresentando resultados piores, provavelmente por diferenças genéticas que causam desregulação no aspecto qualitativo e quantitativo das CPH, na integração destas com o estroma e células endoteliais do microambiente, na migração para o intravascular e, na cinética de reação dos nichos ao estímulo do G-CSF. Esses pacientes seriam considerados mal mobilizadores por constituição sem necessariamente terem sido expostos a fatores de risco. (VASU et al., 2008).

1.4 A COLETA DA CÉLULA PROGENITORA HEMATOPOÉTICA

A obtenção das CPH para realização do transplante ocorre através da punção aspirativa da medula óssea, principal sítio da célula progenitora; do aspirado de sangue do cordão umbilical no momento do parto e, por último, da coleta no sangue periférico após mobilização utilizando a técnica de aférese (KOEPSELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014). Pelo CIBMTR no reporte 2017, a principal fonte usada na atualidade para obtenção de CPH é o sangue periférico através do processo de aférese, exceto no caso de pacientes pediátricos nos quais o uso da punção de medula óssea ainda é significativo (D'SOUZA; FRETHER, 2017).

Quando a aquisição das CPH ocorre direto da medula óssea, método mais antigo, o procedimento é feito sob anestesia e consiste em múltiplas punções na crista ilíaca posterior com coleta de 5-10ml em cada sítio. O objetivo final é coletar de 10-15ml/Kg de peso do receptor, nunca ultrapassando 20ml/kg de peso do doador. Essa estratégia pode resultar em eventos adversos para o doador como crises de enxaqueca, intensa dor óssea e muscular e anemia. As complicações sérias incluem infecção e sangramento, porém não são frequentes ocorrendo em menos de 1,5% dos procedimentos. Também está associada a enxertia mais demorada. Atualmente, essa opção é escolhida para pacientes que não foram capazes de mobilizar células CD34⁺ de maneira eficaz, que apresentam restrições ao procedimento de aférese (MILLER, 2008) ou, quando se deseja a profilaxia da GVHD pós-TMO, devido ao seu menor teor de linfócitos.

Já o sangue de cordão apresenta uma forma de coleta fácil e que não traz riscos ao doador. Esse apresenta uma composição celular diferente quando comparado as células diretamente obtidas da medula óssea, com uma maior quantidade de células progenitoras imaturas. Isso permite uma melhor tolerância ao antígeno leucocitário humano (HLA) não totalmente compatível, mas por outro lado resulta em uma recomposição da medula óssea mais lenta. As principais desvantagens e vantagens do uso dessa fonte são expostos na tabela 3.

Tabela 3 Vantagens e desvantagens do uso da CPH do cordão no TMO

Vantagens	Desvantagens
Disponibilidade imediata do produto	Volume baixo dificultando uso em adulto
Maior tolerância as diferenças de HLA sem risco aumentado de rejeição	Enxertia mais lenta com risco de sangramento e infecção
Menor frequência GVHD	Impossibilidade de realizar um segundo transplante
Menor transmissão de vírus	
Processo de coleta simples sem desconforto ou risco para o doador	

Fonte: adaptado de (JUNIOR; ODONGO; DULLEY, 2009).

Aférese consiste em um método de separação dos elementos do sangue que utiliza como princípio a diferença de densidade entre esses, descrita na figura 4, e a força gravitacional. Durante o procedimento trabalhamos com uma circulação extracorpórea e utilizamos anticoagulação. Por meio do processo de centrifugação, removemos um ou mais constituintes do sangue conforme programação ajustada. No caso em questão removemos o creme leucocitário, enriquecido de células mononucleares, característica das células progenitoras hematopoiéticas.

Figura 4 Densidade dos elementos sanguíneos. Fonte: MOOG, 2004.

A coleta de CPH do sangue periférico por aférese vem crescendo desde a década de 90 (MAYER; POSPÍSIL; KORISTEK, 2003). Essa técnica gera vantagens em relação a punção aspirativa de medula óssea, por exemplo, por não necessitar de anestesia, requerer menor tempo para o restabelecimento da hematopoese e do sistema imune e possibilitar menor risco de eventos adversos ao doador.

Os casos de TMO realizados com CPH coletadas por aférese apresentam resultados positivos e similares aos que são realizados com CPH provenientes de punção aspirativa de medula óssea (KANTENTI, 1999).

Em geral, os grandes centros transplantadores utilizam como dose mínima a quantidade de 2×10^6 células CD34⁺/Kg de peso (LB et al., 1997); (GIRALD et al., 2009); (YOON et al., 2009); (KOEPSSELL; JACOB; MCKENNA JR, 2014); (ZIMMERMANN, 1995); (BENDER, 1992). Transplantes com menos de 1×10^6 células CD34⁺/Kg de peso do receptor estão associados a falha ou recuperação hematopoiética/plaquetária tardia agregando maior

morbimortalidade ao procedimento (KESSINGER; SHARP, 2003). Quanto mais células CD34⁺ são infundidas mais rápido ocorre a recuperação celular com menor tempo de internação, taxa de infecção e necessidade transfusional. Essa coleta em maior quantidade possibilita, ao médico transplantador, optar pela aliquotagem do produto final permitindo ao paciente mais de um ciclo de transplante autólogo que se associa a maior tempo livre de doença no mieloma múltiplo (DRUBOVSKY et al., 2011); (YOON, 2009); (LONG et al., 2015).

Os regimes de mobilização para transplante autólogo e alogênico compreendem o uso de G-CSF com ou sem a associação de quimioterapia mieloablativa. O G-CSF é dado na dose de 10ug/kg/dia e, quando usado isoladamente gera um pico celular no 5º dia. Por isso iniciamos a coleta de CD34⁺ entre o quarto e sexto dia. (TO et al., 1997). Podem ser necessários mais dias subsequentes de coleta até a obtenção da dose mínima aceitável para o transplante.

VASU et al, realizou um estudo envolvendo 639 doadores para transplante autólogo, tendo feito 10ug/kg/dia ou 16ug/kg/dia de G-CSF durante 5 dias com coleta na manhã do D5 com um único procedimento de leucaférese de grande volume, ao final do estudo foi possível concluir que os pacientes que receberam maior dose obtiveram melhores coletas de células CD34⁺ (VASU et al., 2008), porém mais efeitos colaterais eram esperados.

Quando a mobilização não é efetiva outras drogas podem ser usadas como o plerixafor que é um antagonista CXCR4. Um estudo multicêntrico envolvendo 302 pacientes mediu a eficácia do plerixafor comparando o mesmo com o uso de placebo. Neste, 148 pacientes fizeram uso do plerixafor no D4 e, 154 mantiveram apenas o uso do G-CSF. No primeiro dia de aférese ou 10-11h após uso do antagonista do CXCR4, apenas 1,6% dos pacientes com plerixafor não conseguiram obter a marca de 20×10^6 células CD34⁺ /kg de peso no sangue periférico, contra 24,6% dos pacientes que fizeram uso apenas de G-CSF. Portanto, pode-se inferir que o plerixafor é capaz de aumentar, em média, 4,8 vezes a quantidade de CPH no sangue periférico comparado com o uso de G-CSF isoladamente que aumenta apenas 1,7 vezes (DIPERSIO et al, 2009). Em outro trabalho desenvolvido por, RUSSEL et al descreve que após a primeira dose do plerixafor junto ao G-CSF o aumento das células CD34⁺ foi na ordem de 2,6 (RUSSEL et al., 2013). Seu uso resulta em sucesso de coleta em 60-85% dos pacientes com linfoma e mieloma que tiveram falha prévia (FOWLER et al., 2009).

Com o objetivo de quantificar as CPH, seja no produto coletado ou no sangue periférico, utilizamos o marcador de superfície celular CD34⁺ que, embora não esteja presente apenas nas

CPH, é bastante específico para elas (CERILI; WICK, 2006). A técnica empregada nessa identificação é a citometria de fluxo.

O quantitativo de células CD34⁺ é usado para guiar o início da coleta de CPH por aférese, e como preditor do sucesso da coleta. Em geral, o consenso para iniciar a leucaférese é um quantitativo de células CD34⁺ maior que 10-20 células/ μ L no sangue periférico.

1.5 EFICÁCIA

Eficácia é a capacidade de se produzir determinado efeito esperado. Buscar a eficácia, é almejar sucesso. No caso do processo de coleta de células CD34⁺ por aférese dizemos que esse foi eficaz quando conseguimos coletar a dose mínima necessária para a realização de um transplante. Essa quantidade pode variar conforme a Instituição e conforme o protocolo proposto para o tratamento com 1 ou mais transplantes. (ZIMMERMAN,1995); (BENDER,1992). Podemos calculamos a eficácia através da seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia Global} = \frac{\text{Total de células CD34}^+ \text{ coletadas} \times 100}{\text{mínimo de células CD34}^+ \text{ Institucional necessário para transplante}}$$

Segundo HEQUET a eficácia da coleta de CPH é alterada pelos fatores físicos do processo e comportamentais que se relacionam a natureza biológica do indivíduo. Os primeiros se relacionam a limitações técnicas que impedem o processamento de grandes volumes sanguíneos, acesso venoso ruim ocasionando fluxo baixo, interação sub-ótima entre operador e o sistema de coleta e alteração da densidade eritrocitária (HEQUET, 2015).

Quando consideramos os fatores comportamentais do paciente citamos o CD34⁺ pré coleta resultante da mobilização e o recrutamento intra aférese.

Algumas estratégias visam melhorar a eficácia do processo dentre eles podemos citar:

- Associação do G-CSF com quimioterapia ou plerixafor a fim de aumentar a mobilização;

- Aumento do volume de creme leucocitário coletado no caso de pacientes com microcitose, como os com talassemia e anemia ferropriva. O fato dessas hemácias serem leves interfere na mecânica de coleta da máquina. Esse acréscimo gera maior contaminação de hemácias no produto final (WANG et al., 2013);
- Aumento do volume sanguíneo processado na ordem de 3 a 6 volemias configurando as chamadas aférese de grande volume. Esse acréscimo está associado a um maior uso de anticoagulantes e maior espoliação de plaquetas (ROWLEY et al., 2001); (SHADE et al., 2014); (HUMPE et al., 1999). Portanto, devem ser implementadas estratégias para o manejo da toxicidade do citrato.

1.6 EFICIÊNCIA

Eficiência se associa a ideia de executar uma tarefa do jeito certo, de forma a otimizar o resultado com o menor custo de pessoas, recursos e tempo.

Ser eficiente implica também em regularidade na execução dos trabalhos.

No âmbito da coleta de células $CD34^+$ por aférese, a eficiência seria a capacidade do sistema de coleta, que envolve o equipamento, seus protocolos e o modo otimizado de execução das tarefas pelas pessoas, em remover as CPH que passaram através do circuito, ou seja, o percentual coletado em relação ao que foi processado (VERLINDEN et al., 2013).

Conhecer o histórico de eficiência de seu sistema de coleta e as contagens de CPH no sangue periférico do dador permitem estimar o volume de sangue a ser processado para atingir a meta de coleta.

Existem diversas fórmulas propostas para o cálculo do coeficiente de eficiência (CE) e podemos destacar (NEYRINCK; VRIELINK, 2015):

$$CE1 = \frac{CD34^{+} \times 10^6 \text{ do produto} \times 100}{CD34^{+} \text{ médio} \times 10^6 / L \times \text{Volume de sangue processado}}$$

Sendo:

$CD34 \text{ médio} = \text{pré} + \text{pós} / 2$

Volume sanguíneo processado = Volume total processado - Volume anticoagulante usado)

$$CE2 = \frac{CD34^{+} \times 10^6 \text{ do produto} \times 100}{CD34^{+} \text{ pré} \times 10^6 / L \times \text{Volume de sangue processado}}$$

Sendo:

Volume sanguíneo processado = Volume total processado - Volume anticoagulante usado

A CE 1 tende a ser mais fidedigna na avaliação do sistema de coleta, pois reconhece, mesmo que parcialmente, a interferência do comportamento biológico das células $CD34^{+}$ durante a coleta, o recrutamento intra coleta. Estudos que mediram a contagem de células $CD34^{+}$ no sangue periférico antes, durante e ao término do processo descrevem que a cinética dessas não é constante. Em um primeiro momento, logo após o início do procedimento, ocorre uma queda brusca e depois essa redução permanece, porém, mais discreta e estável. Supõe-se que esse comportamento é explicado pelo fenômeno do recrutamento. A quantificação de células $CD34^{+}$ através da citometria de fluxo é um exame oneroso o que impossibilita o cálculo rotineiro do CE pela fórmula 1. Em contrate, os dados necessários para o CE2 fazem parte dos protocolos para coleta de CPH, possibilitando seu cálculo em praticamente todos os procedimentos.

A partir do histórico de CE2 as instituições envolvidas na coleta de CPH podem conhecer como se comporta o sistema de coleta e escolher os parâmetros mais aptos para planejar coletas futuras. (média, menor valor do intervalo de confiança 95% para a média, mediana, percentil 25%). A partir disso, pode-se planejar com melhor acurácia o volume de sangue a ser processado a fim de se obter maior eficácia com menor desperdício de tempo e material, conforme descrito na fórmula abaixo (NEYRINCK; VRIELINK, 2015).

$$\text{Volume sanguíneo a ser processado} = \frac{\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{Kg desejada}}{\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{L pré} \times \text{CE}}$$

VERLINDEN et al, avaliou de forma retrospectiva 206 procedimentos de aférese autólogos e alogênicos para coleta de CPH com n de 128 de pacientes e doadores, o CE2 médio encontrado foi de 46%, variando de 7 a 138%. O autor correlacionou o CE2 com diversos fatores, sendo encontrada associação com o tipo de mobilização, volume sanguíneo processado, contagem de plaquetas e leucócitos pré. Não foi encontrada correlação estatística com sexo, idade, peso, tipo de coleta autóloga ou halogênica, acesso venoso, hematócrito pré ou células CD34⁺ pré. Outro achado importante desse estudo foi que CE2 reduz progressivamente a medida que aumentamos o volume sanguíneo processado (VERLINDEN et al., 2013).

No CE1, como o CD34⁺ médio corrige distorções associadas à flutuação do CD34⁺ durante a coleta, uma vez que essa é uma variável biológica, sujeita a comportamentos individuais. Logo no CE1 essa interferência é menos importante e este é mais estável e mais próximo da realidade física.

1.7 RECRUTAMENTO

Todo procedimento de aférese tem como princípio a retirada de um elemento do sangue. Os compartimentos envolvidos são intravascular, extravascular e máquina de aférese.

WEINSTEIN em 2010, descreve um modelo unicameral para interação entre os compartimentos intra e extravascular durante a plasmaférese. Embora exista uma influência mútua, a todo o tempo, entre o intravascular e o extravascular, o modelo considera apenas o intravascular para as avaliações e cálculos. Esse conceito é possível pois a remoção da substância do intravascular ocorre muito mais rápido do que sua reposição. (WEINSTEIN, 2010).

Esse modelo pode ser adaptado para a melhor compreensão do processo de coleta da CPH. As CPH são sintetizadas na medula óssea, compartimento extravascular e, normalmente

uma pequena fração delas ganha o intravascular. Estas sofrerão uma destruição natural por senilidade, mantendo um equilíbrio entre síntese e depuração. O processo de mobilização induz um desequilíbrio dinâmico nesse processo que, se eficaz, leva a um aumento transitório das CPH no compartimento intravascular, tornando possível a coleta por aférese em uma janela de tempo para coleta(s).

Durante a leucaférese, o creme leucocitário, rico em CPH é coletado e a quantidade de CPH no compartimento intravascular tende a se reduzir, enquanto a mobilização de CPH do extravascular para o intravascular durante a coleta, denominada recrutamento, causa tendência contrária. Enquanto a coleta pelo sistema de aférese respeita princípios físicos (fluxo, rotação, raio, gradiente de densidades) esse movimento das CPH entre os compartimentos, o recrutamento intra coleta, é um componente biológico sujeito a múltiplas interferências subjetivas e sua magnitude afeta positivamente os resultados da coleta.

Figura 5 Modelo de movimentação das CPH entre o intra e extravascular durante a leucaférese. ST: sangue total; CL: creme leucocitário. Fonte: adaptado de WEINSTEIN;2010.

A medida que foram desenvolvidos trabalhos que mediam o $CD34^+$ antes e após o procedimento de aférese, pode-se perceber que o $CD34^+$ pós não era igual diferença entre $CD34^+$ pré e o coletado. Ao contrário, em determinados casos o $CD34^+$ pós era maior do que a soma desses, existindo pacientes que saíam da coleta de CPH com uma quantidade maior do que a encontrada na pré coleta mesmo tendo sido coletada quantidade razoável. Isso gerou a hipótese de que, durante a aférese, há aumento da disponibilidade de CPH no sangue periférico.

A cinética do recrutamento foi descrita por HUMPE et al. Ele estudou 18 pacientes submetidos a aférese com processamento de 4,5 volemias para coleta autóloga. O CD34⁺ do paciente e na bolsa de coleta foi medido no início e, a cada volemia processada tendo ao final 5 medidas. A partir da análise desses dados, ele descreveu um modelo de cinética das células CD34⁺ durante a leucaférese. Este é composto por 4 compartimentos: medula óssea (A), sangue periférico (B), máquina de aférese (C) e bolsa de coleta (D). O estudo do comportamento demonstra que na fase inicial do procedimento há uma queda rápida no quantitativo dessas células no sangue periférico, porém nos $\frac{3}{4}$ restantes esse declínio é lentificado. Já o aumento das células CD34⁺ na bolsa de coleta ocorre de forma gradual e constante em todos os momentos. Essa queda abrupta inicial nas células do sangue periférico com compensação posterior nos leva a crer que existe um recrutamento de células da medula para o sangue periférico durante o processo de aférese estimulado pelo *feedback* negativo (HUMPE et al., 2000).

Posteriormente, em 2001, KNUDSEN et al. selecionou 91 pacientes submetidos a leucaférese com processamento fixo de 10L, o que equivalia, em média, a 2 volemias do paciente. Também quantificou o CD34⁺ pré e pós aférese. Através dessa ferramenta ele demonstrou que o número de células coletadas somada ao número de células disponível no sangue após a leucaférese foi, em média, 1,5 maior do que a quantidade de células presentes no início do procedimento. A explicação dada para esses achados foi a existência do fenômeno de recrutamento intra aférese, que poderia ser calculado pela fórmula descrita logo abaixo. A cinética responsável por essa movimentação seria novamente o *feedback* negativo, ou seja, a redução brusca no número celular no início da aférese, estimula a mobilização da mesma no sangue periférico. Nesse trabalho ele não encontrou diferença estatística no fator de recrutamento dos pacientes entre o primeiro, segundo e terceiro dia aférese e, nem de acordo com a mobilização utilizada, somente o G-CSF ou este associado a quimioterapia. Ele também demonstrou que o recrutamento ocorre apenas para os tipos de células que estão sendo retirados no caso CD34⁺ e células mononucleares. A explicação seria que, como a maioria das plaquetas e granulócitos são reinfundidos durante o procedimento, não atingem o ponto para ativar o *feedback*. (KNUDSEN et al., 2001).

$$\text{Fator de recrutamento} = \frac{\text{CD34}^+ \text{ pós aférese no sangue periférico} + \text{CD34}^+ \text{ coletado}}{\text{CD34}^+ \text{ pré aférese no sangue periférico}}$$

Outros autores também foram capazes de descrever o fenômeno de recrutamento demonstrando que este varia de paciente para paciente e também de acordo com o tipo celular (MAYER ; POSPÍSIL; KORISTEK, 2003); (HILLYER et al., 1993); (FONTANA et al.,2006); (PONCHIO et al, 1997).

SHADE et al, estudou o recrutamento de acordo com o medicamento envolvido na mobilização. Foram selecionados 20 pacientes sendo que 9 receberam apenas G-CSF e 11 receberam o G-CSF associado ao Plerixafor. Para calcular o CD34⁺ recrutado ele usou a fórmula descrita abaixo. Ao final, foi observado que não houve diferença no recrutamento. A cinética do recrutamento parece estar mais associada a quantidade de CD34⁺ encontrado no sangue periférico, logo se o paciente conseguiu a mesma quantidade com G-CSF ou G-CSF e plerixafor, não há importância. Dessa forma o plerixafor se associa positivamente ao processo de mobilização, mas não ao recrutamento como variável independente (SHADE et al.,2014).

$$\text{CD34}^+ \text{ recrutado} = (\text{CD34}^+ \text{ pós aférese no sangue periférico} + \text{CD34}^+ \text{ coletado}) - \text{CD34}^+ \text{ pré aférese no sangue periférico}$$

Por fim HUMPE et al, definiu que mesmo quando grandes volemias são processadas o recrutamento se mantém. Ele compara o recrutamento entre 2 grupos sendo que um foi submetido a grandes volumes de aférese e outro não. Em ambos ele observou que houve recrutamento de células CD34⁺ durante o procedimento de aférese, porém esse foi maior no grupo submetido a grande volume de aférese. Logo esse recurso deve ser usado como forma de atingir a eficácia do processo (HUMPE et al.,1999).

1.8 RISCOS E COMPLICAÇÕES

O processo de coleta de CPH apresenta riscos para o paciente. Esses riscos podem estar associados a 3 etapas importantes do procedimento, são eles (HEQUET, 2015):

- a) Mobilização

Nesse período, a principal causa de efeitos adversos se relaciona com as drogas usadas. O principal medicamento é o G-CSF. A indução com G-CSF rotineiramente resulta em cefaléia, dor óssea, fadiga, náuseas, mialgia e febre. Essas sequelas são dose dependente e, se resolvem 2-3 dias após a suspensão da medicação (MILLER, 2008); (PULSIPHER, 2009). Laboratorialmente o seu uso gera alterações como: aumento de neutrófilos, linfócitos, LDH, fosfatase alcalina, ácido úrico e queda das plaquetas (ANDERLINI et al, 1996). Os efeitos colaterais mais temidos são raros ocorrendo em menos de 1% dos casos, são eles a ruptura esplênica e complicações vasculares pela leucoestase (MILLER, 2008); (PULSIPHER, 2009).

Visando entender melhor a ruptura esplênica, STRONCEK et al, avaliou o aumento do baço em 18 doadores saudáveis submetidos ao G-CSF na dose de 10 µg/kg/dia por 5 dias com início da coleta no 5º dia. Foi realizada ultrassonografia antes da administração da 1ª dose de G-CSF, no dia da aférese e 10 – 11 dias após. O aumento foi, em média, de 12%, exceto em 2 sujeitos que apresentaram respectivamente 18,3% e 26,3%. Não houve diferença estatística entre sexos, caucasiano e não caucasiano ou idade. Mesmo 10-11 dias após da suspensão da droga órgão permanecia um pouco aumentado. O fato de ocorrer aumento do baço, não implica dizer que haverá ruptura. Portanto o paciente/doador deve evitar atividades com risco de trauma abdominal e uso de anti-inflamatórios não esteroidais até 2-3 semanas após (STRONCEK et al., 2004).

A quimioterapia quando usada pode causar principalmente neutropenia febril com risco de sepse e mucosite.

Já o plerixafor está associado a sintomas gastro intestinais como náuseas, flatulências e diarreia; reações no local da injeção como hiperemia e dor; cefaléia, parestesias e tonteira.

b) Acesso venoso

Para a realização da aférese preferimos o acesso periférico, porém quando não é possível puncionamos um profundo, sendo esta a escolha final em 20% nas mulheres e 10% nos homens. O cateter usado deve ser o de Shiley por ser de rígido e de duplo lúmen. Os possíveis sítios são as veias: femoral, subclávia e jugular interna. A femoral apresenta maior risco de infecção e compromete a mobilidade do paciente, porém deve ser a de escolha quando há risco de sangramento. As complicações mais sérias associadas à punção da jugular interna e subclávia são: pneumotórax, hemotórax, perfuração cardíaca e tamponamento. As complicações gerais de qualquer punção venosa profunda são: possibilidade de puncionar artéria, dificuldade de

inserção, sangramento, trombose do cateter com oclusão, trombose venosa, dor local e flebite. (SCHONERMARCK; BOSCH, 2003).

c) Aférese

Durante o procedimento de aférese o efeito colateral mais comum se relaciona a anticoagulação do sistema. O anticoagulante de escolha é o citrato dextrose fórmula A (ACD-A) que é metabolizado no fígado e, age como quelante de cálcio e magnésio gerando a redução destes no intravascular. Os sintomas associados a hipocalcemia são parestesias, náuseas, cefaléia e até arritmias. A fim de evitar esses efeitos indesejáveis podemos instituir a reposição profilática de cálcio, controlar a taxa de infusão de ACD-A ao paciente (ml/min/litro de volemia corporal, boa tolerância vai de 0,8 a 1,2) ou associar heparina se o paciente não apresentar restrições. Atualmente essa associação é usada no processamento de grandes volemias (KINDWALL-KELLER, 2014).

Outra complicação associada a aférese se relaciona ao volume sanguíneo extracorpóreo. Nesse caso o paciente apresenta hipotensão, reação vaso vagal, síncope e movimentos tipo convulsão (KINDWALL-KELLER, 2014).

Os problemas técnicos associados ao procedimento em si são pouco comuns, mas os possíveis são: oclusão do cateter, vazamentos no circuito, hemólise, dificuldade de retorno e embolismo pela entrada de ar no sistema.

d) Espoliação dos elementos sanguíneos

A principal citopenia é a plaquetopenia ocasionando hematomas, petéquias e sangramentos. Como tratamento clínico devemos proceder a transfusão e, então o paciente estará sujeito aos riscos da transfusão (KINDWALL-KELLER, 2014).

1.9 CUSTO

Na gestão dos serviços de saúde é de extrema importância alcançar resultados desejáveis para o maior número de pessoas e com menor custo (AZEVEDO, 1991). Nos últimos tempos o custo dos serviços de saúde vem aumentando (JUNIOR; VIEIRA, 2002) e os principais fatores responsáveis por esse aumento são o desenvolvimento tecnológico e o envelhecimento

da população. O avanço tecnológico pode ser sentido no progresso substancial dos métodos diagnósticos e terapêuticos agregando valores aos procedimentos na saúde, agora mais complexos e caros, e também favorecendo o fenômeno de envelhecimento da população. Como os recursos são limitados, a variável custo ganha um lugar de destaque nas decisões dos gestores da saúde. O uso racional das verbas permite que o mesmo serviço seja disponibilizado, com qualidade, para um número maior de pessoas (BITTAR, 2000).

O custo de um procedimento de coleta de CPH por aférese envolve 3 etapas do processo. Na fase pré aférese há mobilização, exames laboratoriais como hemograma e bioquímica básica com eletrólitos, sorologias, citometria de fluxo para quantificação do CD34⁺ no sangue periférico do paciente, internação e acesso venoso profundo se necessário. Na fase de aférese temos a máquina de aférese com seu kit e anticoagulante, reposição de eletrólitos de forma profilática e terapêutica, profissionais especializados e treinados, análise do produto em relação a cultura e CD34⁺, criopreservação e armazenamento. O pós aférese imediato envolve transfusão de hemácias e plaquetas se espoliação, não sendo contabilizado o processo de infusão.

A partir dessas informações podemos projetar os custos associados ao procedimento de aférese por dia, conforme tabela descrito na tabela 4.

Tabela 4 Projeção de procedimentos necessários em relação ao dia do processo

	D1-D3	D4	D5	D6	D7
G-CSF	X	X	X	X	X
Sorologia	X				
Hemograma/Bioquímica		X	X	X	X
Citometria de fluxo – CD34 ⁺		X	X	X	X
Internação		X	X	X	X
Acesso venoso		X			
Máquina de aférese			X		
Kit aférese			X	X	X
Anticoagulante			X	X	X
Reposição de eletrólitos			X	X	X
Profissional capacitado			X	X	X
Análise do produto final			X	X	X

Criopreservação	X	X	X
Armazenamento	X	X	X
Transfusão	Depende do paciente		

Fonte: Própria

MEEHAN, et al em 200 analisou os custos de 3 centros transplantadores e calculou a média para cada componentes do processo. O custo encontrado foi pré aférese \$2711, aférese, \$2990 e pós aférese, compreendendo apenas infusão \$754. Percebe-se que o custo mais alto foi associado a aférese, provavelmente pela necessidade de múltiplas coletas. Dessa forma, concluímos que existem etapas do processo que não se modificam em relação ao número de dias de coleta, mas a maioria associada a aférese sim. Portanto o custo tende a ser menor se conseguirmos eficácia do procedimento com menos dias de coleta.

2 JUSTIFICATIVA

O processo de mobilização e coleta de CPH está classificado como procedimento de alto custo no SUS e, o paciente está sujeito aos riscos do uso do medicamento G-CSF, do acesso vascular e os inerentes à circulação extra-corpórea, como a toxicidade do anticoagulante, embolia gasosa, hemólise, distúrbios da volemia, entre outros.

A coleta de dose adequada de células progenitoras hematopoiéticas é essencial para a viabilização do transplante autólogo de medula óssea no tratamento de diversas patologias hematológicas e não hematológicas.

Demonstrar que o primeiro dia de coleta é aquele que apresenta o conjunto de condições mais favoráveis para uma coleta eficaz (maior número de CPH circulantes e o melhor recrutamento intra coleta) permitirá adotar estratégias de processamento de maior volume de sangue neste primeiro dia, tornando desnecessárias novas coletas.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral é avaliar a eficácia do procedimento no primeiro dia de coleta de CPH nos pacientes mobilizados com G-CSF e, que iniciam a coleta no D5 de preparo.

Os objetivos específicos são:

1. Determinar o coeficiente de eficiência da coleta de CPH por aférese do Hemorio nos pacientes selecionados nos dias 1º, 2º e 3º de coleta;
2. Verificar a eficácia relativa de coleta em cada dia de coleta subsequente equivalente ao 1º, 2º e 3º de coleta;
3. Determinar a eficácia global do procedimento de coleta de CPH.

4 HIPÓTESE

O resultado da coleta de células progenitoras hematopoiéticas depende das contagens periféricas de células CD34⁺, do volume de sangue processado e da qualidade do recrutamento intra coleta, que podem ser variáveis nos diferentes dias subsequentes do processo.

Nossa hipótese é que nos pacientes mobilizados apenas com fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), o dia do pico dessas células no sangue periférico é o dia mais favorável à coleta, tendo eficácia superior aos dias subsequentes.

Nossa proposta consiste em analisar a eficiência e eficácia dos procedimentos comparando os três dias de coleta.

Se for possível demonstrar que o primeiro dia de coleta é mais eficaz, a estratégia futura de coletas poderia ser fundamentada no aumento do volume processado na primeira coleta, reduzindo a necessidade de coletas subsequentes, com seus custos e riscos envolvidos.

5 METODOLOGIA

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HEMORIO e encontra-se registrado sobre o processo nº 384/15(Anexo I).

Obtenção dos dados foi através de prontuário, ficha de aférese e sistema informatizado.

Considerando que em nenhum momento haveria a necessidade de contato pessoal direto ou indireto com os participantes e, que a coleta do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) implicaria em um processo trabalhoso, pelos dados incertos como endereço e telefone dos pacientes e, muitas vezes infrutífero pois muitos pacientes já foram a óbito pela doença de base, foi solicitada e aprovada a dispensa do mesmo.

Não há nenhuma expectativa de benefícios aos participantes. O risco relacionado à privacidade dos doadores foi minimizado pela identificação dos mesmos através de números sequenciais dados pelo pesquisador.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 DESENHO

Trata-se de um estudo observacional, analítico e retrospectivo com análise dos dados das coletas por aférese realizadas no Hemorio no período de 01 de julho de 2004 até 30 de julho de 2015. A seleção dos pacientes foi feita de forma sequencial, sendo incluídos todos os que preenchiam os critérios de seleção.

5.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão empregados foram:

- Ter realizado coleta de células CD34⁺ para uso autólogo de 01 de julho de 2004 até 30 de julho de 2015 no serviço de Hemoterapia do Hemorio com a finalidade de tratar neoplasias hematológicas;
- Ter realizado a mobilização apenas com fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF);
- Ter realizado no mínimo 2 processos de aférese subsequentes.

5.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão aplicados foram:

- Apresentar falha na mobilização caracterizada por uma contagem de células CD34⁺ < 10 x 10⁶ por Kg de peso no D5;
- Falta de dados mínimos para análise.

5.2.4 AMOSTRA

Desde 1990, o Serviço de Hemoterapia do Hemorio efetua a coleta de CPH para transplante autólogo de medula óssea. O registro é feito em ficha própria do setor de aférese na qual constam os identificadores dos pacientes, seus dados clínicos e as informações inerentes ao procedimento.

Para a coleta de dados desse trabalho foram analisadas as fichas de aférese e, quando necessário os prontuários físicos e sistema informatizado “SASH” presente em nosso nosocômio.

A indicação clínica e elegibilidade do paciente para o procedimento de aférese foi determinada pelo médico assistente e o transplantador.

Os métodos de mobilização empregados em nossa instituição são o G-CSF usado isoladamente ou em conjunto com a quimioterapia.

A mobilização com o G-CSF foi realizada na dose de 10 µg/kg/dia e o primeiro dia foi chamado de D1, sendo a droga continuada até o final das sessões de aférese. A contagem de CD34⁺ começou no D4, através de citometria de fluxo e, quando >10 x 10⁶ células/Kg foi iniciada a coleta de CPH.

No período estabelecido foram realizados 345 procedimentos de aférese em 167 pacientes sendo que 15 foram excluídos por falta de dados. Dos 152 restantes, 81(53%) foram submetidos a mobilização envolvendo quimioterapia e 71(47%) utilizaram apenas o G-CSF.

O primeiro dia de aférese variou entre o D4 e D9 na seguinte proporção: D4 18,5% (13), D5 66% (47), D6 7% (5), D7 7% (5), D9 1,5% (1). Sabidamente o melhor pico de células CD34⁺ ocorre no 5º dia de mobilização com G-CSF, portanto em nossa análise restringimos a amostra para esse grupo.

Quando a meta de células não era atingida no primeiro dia de aférese, o procedimento era estendido para os dias subsequentes até alcançar a dose ou determinar a falha. O número máximo de aféreses foi 4. Idealmente a dose mínima era de 2,0 x 10⁶ CD34⁺/ kg, porém em pacientes com dificuldade para alcançar este valor, foi considerado o limite inferior de 1,5 x 10⁶ CD34⁺/ kg de peso do paciente para a concretização do transplante. A figura 6 representa a esquematização do desenho de nossa amostra.

No Hemorio, a obtenção de CPH por aférese é realizada através do equipamento de fluxo intermitente Haemonetics Mobile Collection System – MCS®+9000 conforme técnicas recomendadas pelo fabricante através de manual técnico. É empregado conjunto descartável composto por linhas de fluxo sanguíneo e anticoagulante, centrífuga e bolsas de coleta temporária e definitiva. O processo é realizado em ciclos que compreendem uma fase de extração e, outra de retorno. Os procedimentos foram executados por profissionais treinados.

Figura 6 Esquematização da amostra. Fonte: própria.

5.3 EFICÁCIA E EFICIÊNCIA

Com o objetivo de estudar a eficácia do procedimento de aférese foi calculada a eficácia global e relativa, através das fórmulas :

$$\text{Eficácia Global} = \frac{(\text{Total de células CD34}^+ \text{ coletadas} \times 10^6/\text{kg}) \times 100}{1,5 \times 10^6 \text{ Células CD34}^+ \times 10^6/\text{kg}}$$

$$\text{Eficácia Relativa} = \frac{(\text{Total de células CD34}^+ \text{ coletadas} \times 10^6/\text{kg}) \text{ por sessão} \times 100}{1,5 \times 10^6 \text{ Células CD34}^+ \times 10^6/\text{kg}}$$

A relativa se refere a eficácia em separado de cada dia de procedimento e a global compreende a soma dessas.

A fórmula usada para cálculo do coeficiente eficiência foi o CE2.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados coletados foi realizada utilizando o software R Core Team (2018) disponível em <https://www.R-project.org/>. A comparação das variáveis foi feita através do teste de mediana Wilcoxon. O nível de significância adotado foi de p menor ou igual a 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As características epidemiológicas dos participantes são descritas na tabela 5. A frequência do sexo dos participantes foi de 53,19% mulheres e 46,81% homens. A idade média, em anos, das mulheres foi 55,88 e dos homens 52,5. O peso médio, em Kg, das mulheres foi de 65,8 e dos homens 69,41. A volemia média, em Litros, do sexo feminino foi 3,95 e do masculino foi 4,89. O diagnóstico mais frequente foi o mieloma múltiplo 44/47, e os outros foram linfomas. Em relação a quantidade de aféreses, as mulheres foram submetidas a 2,28 procedimentos e homens a 2,36.

Em relação as aféreses, a média de volume sanguíneo processado em Litros foi de 6,35 e de volemias foi 1,48. A média do $CD34^+$ pré x $10^6/L$ pré aférese foi 25,38. O volume médio de anticoagulante, do produto final e a quantidade de ciclos foi respectivamente 619,09 ml; 141,87 ml e 24,97. O tempo médio do procedimento foi de 246,81 min. Na tabela 6 estão listadas as características dos procedimentos de aférese realizados.

Tabela 5 Características dos pacientes de acordo com o sexo

	Total	Sexo Feminino	Sexo Masculino	p *
Número de pacientes	47 (100%)	25 (53,19%)	22 (46,81%)	0,7709
Idade Média $\pm$ DP	54,3 $\pm$ 9,67	55,88 $\pm$ 7,93	52,5 $\pm$ 11,25	
(anos) Mediana (min; máx)	57 (22; 69)	59 (38; 69)	54 (22; 69)	0,2444
Peso Média $\pm$ DP	67,49 $\pm$ 12,74	65,8 $\pm$ 13,27	69,41 $\pm$ 12,12	
(Kg) Mediana (min;máx)	66 (45; 92)	64 (45; 92)	69 (51; 89)	0,3589
Volemia Média $\pm$ DP	4,39 $\pm$ 0,69	3,95 $\pm$ 0,45	4,89 $\pm$ 0,56	
(L) Mediana (min; máx)	4,3 (3,11; 5,84)	3,87 (3,11; 4,9)	4,86 (3,57; 5,84)	<0,0001
Aféreses Média $\pm$ DP	2,32 $\pm$ 1	2,28 $\pm$ 0,94	2,36 $\pm$ 1,09	
Mediana (min; máx)	2 (1; 4)	2 (1; 4)	2 (1; 4)	0,8155
Diagnóstico				
Mieloma múltiplo	44 (100%)	24 (54,55%)	20 (45,45%)	0,6516
Linfoma de Hodgkin	1 (100%)	0 (0,00%)	1 (100,00%)	1,0000
Linfoma não Hodgkin	2 (100%)	1 (50,00%)	1 (50,00%)	1,0000

* P-valores calculados através do Wilcoxon rank sum test (para variáveis contínuas); e Teste Binomial Exato Binomial (para variáveis categóricas).

Tabela 6 Características dos procedimentos de aférese

Total	
Vol sg processado L	
Média $\pm$ DP	6,35 $\pm$ 0,9
Mediana (min; máx)	6,26 (4,13; 9,93)
Volemias Processadas	
Média $\pm$ DP	1,48 $\pm$ 0,32
Mediana (min; máx)	1,48 (0,9; 2,42)
CD34+ pré $\times 10^6/L$	
Média $\pm$ DP	25,38 $\pm$ 18,07
Mediana (min; máx)	18,67 (3,8; 90)
Coef. Eficiência Coleta, %	
Média $\pm$ DP	50,51 $\pm$ 36,3
Mediana (min; máx)	42,21 (1,2; 236,24)
Vol ACD-A mL	
Média $\pm$ DP	619,09 $\pm$ 655,05
Mediana (min; máx)	536 (378; 7042)
Vol Produto ml	
Média $\pm$ DP	141,87 $\pm$ 32,95
Mediana (min; máx)	136 (92; 315)
Nº de ciclos	
Média $\pm$ DP	24,97 $\pm$ 2,02
Mediana (min; máx)	25 (20; 32)
Tempo min	
Média $\pm$ DP	246,81 $\pm$ 32,1
Mediana (min; máx)	242 (176; 363)

Vol: volume Sg: sanguíneo DP: desvio padrão .

Não há diferença na distribuição da amostra entre sexo, peso, idade, CD34⁺ pré, número de aféreses realizadas e doença de base. A única diferença foi na volemia o que pode ser explicado pelas mulheres apresentarem constituição física menor. A amostra foi pareada.

6.2 EFICÁCIA

A avaliação da eficácia foi feita através do cálculo das eficácias relativa e global. As médias da relativa no 1º($n=47$), 2º($n=36$) e 3º($n=19$) dia de coleta foram respectivamente

97,12%, 65,17%, 32,88%. A média da global foi 177,89% .Na tabela 7 são demonstrados os valores.

Apenas um grupo restrito de 23,40% (11/47) atingiu a meta de células CD34⁺ com apenas 1 dia de coleta, enquanto os 76,60% (36/47) restantes necessitaram de mais de 1 dia de coleta.

Tabela 7 Eficácia global e relativa no 1º, 2º e 3º dia de coleta

	Total
Eficácia Global % (n=47)	
Média ± DP	177,89 ± 120,71
Mediana (min; máx)	158,67 (18,67; 873,33)
Eficácia Relativa 1º dia de coleta % (n=47)	
Média ± DP	97,12 ± 66,31
Mediana (min; máx)	80 (6,67; 360)
Eficácia Relativa 2º dia de coleta % (n=36)	
Média ± DP	65,15 ± 38,57
Mediana (min; máx)	55,67 (12; 166,67)
Eficácia Relativa 3º dia de coleta % (n=19)	
Média ± DP	32,88 ± 15,57
Mediana (min; máx)	31,33 (13,33; 80)

DP: desvio padrão.

A comparação da eficácia entre os grupos com 1 coleta (n=11), 2 coletas (n=17) e 3 coletas (n=19) no 1º dia e, no 2º dia, entre 2 coletas (n=17) e 3 coletas (n=19) mostrou uma diferença significativa com $p < 0.001$. Figuras 7 e 8.

Figura 07 Boxplot da eficácia (%) no primeiro dia em relação ao número de coletas

Figura 08 Boxplot da eficácia (%) no segundo dia em relação ao número de coletas

A dosagem de CD34⁺ foi avaliada conforme quantidade pré e no produto. A média do CD34⁺pré x 10⁶/L foi respectivamente nos dias 1, 2 e 3 de coleta 30,42; 26,64 e 15,48. Já do produto foi 1,46; 0,98 e 0,49 x10⁶/Kg demonstrando uma redução paulatina nos dias subsequentes a coleta, conforme tabela 8. Porém na análise pareada, só houve significância entre as dosagens do 2º em relação ao 3º, conforme demonstrado na figura 24.

Tabela 8 Características do CD34⁺ pré e coletado

	1º dia de coleta	2º dia de coleta	3º dia de coleta
CD34 + pré	n = 47	n = 36	n = 18
Média ± DP	30,42 ± 20,03	26,64 ± 16,16	15,48 ± 12,38
Mediana (min; máx)	23,5 (10,8; 90)	21,32 (5,2; 60,1)	13,1 (3,8; 55)
CD34 + produto	n = 47	n = 36	n = 19
Média ± DP	1,46 ± 0,99	0,98 ± 0,58	0,49 ± 0,23
Mediana (min; máx)	1,2 (0,1; 5,4)	0,84 (0,18; 2,5)	0,47 (0,2; 1,2)

Foi avaliada correlação entre o CD34⁺ pré coleta e o coletado. Demonstrou-se que há na população estudada uma correlação positiva entre eles o que já foi amplamente encontrado em outras literaturas.

Figura 09 Gráfico de correlação entre CD34⁺pré coleta e CD34⁺ do produto. Correlação positiva de 0,564.

Foram pareados os pacientes com coletas no 1º dia e no 2º dia ($n=36$), e 2º dia e 3º dia ($n=19$) e analisadas as variáveis eficácia, eficiência, CD34⁺ pré e volemias processadas.

Na análise do 1º dia *versus* 2º dia, a eficácia apresentou um $p=0,03$, a eficiência $p=0,35$, a volemias processadas $p=0,24$ e CD34⁺pré $p=0,19$. Logo apenas a variável eficácia demonstrou diferença significativa sendo maior no 1º dia. As variáveis eficiência, CD34⁺ pré e volemias processadas não explicam o comportamento de eficácia maior no 1º dia. Figuras 11, 12, 15 e 17.

A análise de dispersão das variáveis eficácia, eficiência, volemias processadas e CD34⁺ pré no 1º dia *versus* 2º dia demonstrou as seguintes correlações: 0,58; -0,02; 0,79 e 0,49. Só houve correlação positiva moderada entre os dias 1º e 2º nas variáveis a eficácia e volemias processadas. Figuras 10, 13, 14 e 16.

Figura 10 Gráfico de dispersão da variável eficácia (%) no 1º e 2º dia de coleta

Figura 11 Boxplot da variável eficácia (%) no 1º e 2º dia de coleta

Figura 12 Boxplot da variável eficiência (%) no 1º e 2º dia de coleta

Figura 13 Gráfico de dispersão da variável eficiência (%) no 1º e 2º dia de coleta

Figura 14 Gráfico de dispersão da variável volemias processadas no 1º e 2º dia de coleta

Figura 15 Boxplot da variável volemias processadas no 1º e 2º dia de coleta

Figura 16 Gráfico de dispersão da variável CD34⁺ pré no 1º e 2º dia de coleta

Figura 17 Boxplot da variável CD34⁺ pré no 1º e 2º dia de coleta

Na análise do 2º dia *versus* 3º dia, a eficácia apresentou um $p = 0.0029$, a eficiência $p = 0.51$, a volemias processadas $p = 0.976$ e CD34⁺ pré $p = 0.029$. Logo as variáveis eficácia e CD34⁺ pré demonstraram diferença significativa sendo maior no 2º dia. Dessa forma, as variáveis eficiência e volemias processadas não explicam o comportamento de eficácia maior no 2º dia. Figuras 18, 20, 22 e 24.

A análise de dispersão das variáveis eficácia, eficiência, volemias processadas e CD34⁺ pré no 2º dia versus 3º dia demonstrou as seguintes correlações: 0.60, 0.36, 0.94 e 0.52. Logo há correlação positiva forte entre os dias 2º e 3º na variável volemias processadas. Figuras 19, 21, 23 e 25.

Figura 18 Boxplot da variável eficácia no 2º e 3º dia de coleta

Figura 19 Gráfico de dispersão da variável eficácia no 2º e 3º dia de coleta

Figura 20 Boxplot da variável eficiência no 2º e 3º dia de coleta

Figura 21 Gráfico de dispersão da variável eficiência no 2º e 3º dia de coleta

Figura 22 Boxplot da variável volemias processadas no 2º e 3º dia de coleta

Figura 23 Gráfico de dispersão da variável volemias processadas no 2º e 3º dia de coleta

Figura 24 Boxplot da variável CD34+ pré no 2º e 3º dia de coleta

Figura 25 Gráfico de dispersão da variável CD34+pré no 2º e 3º dia de coleta

6.3 COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA

A avaliação do CE2 não demonstrou diferença entre os pacientes que fizeram 1, 2 ou 3 coletas no 1º dia de coleta ($p=0.13$) ou entre os que fizeram 2 ou 3 coletas no 2º dia ($p=0.29$).

O que é aceitável visto que o sistema físico de aférese não sofreu mudanças no período. Figuras 26 e 27.

Figura 26 Boxplot da eficiência (%) no primeiro dia em relação ao número de coletas

Figura 27 Boxplot da eficiência (%) no segundo dia em relação ao número de coletas.

Foram examinados 109 procedimentos de aférese e calculados os coeficientes de eficiência em cada um desses e a média encontrada foi de 50.51%. Figura 28.

Figura 28 Gráfico em barras do CE2 (%)

Em 6 eventos encontramos um coeficiente de eficiência $> 100\%$ o que sugere que coletamos mais células $CD34^+$ do que a estimativa de células processadas baseada na contagem de células $CD34^+$ pré. Os dados desses pacientes são encontrados na tabela 8.

Tabela 9 CE2 $> 100\%$

Número	Dia coleta	Idade	Sexo	Volemias Processada	$CD34^+$ pré coleta	$CD34^+$ coletado/kg de peso	CE2 %
63	1°	52	M	1,40	13,4	3,2	228
66	1°	59	M	1,23	12	1,5	154,92
76	1°	42	F	1,19	14	2,2	236,24
96	2°	37	M	1,24	12	1,2	119,05
32	3°	43	M	1,19	4,3	0,54	154,16
72	3°	60	F	1,70	3,8	0,4	116,09

7 DISCUSSÃO

Sabidamente o pico das células CD34⁺ em pacientes com neoplasias hematológicas mobilizados apenas com G-CSF ocorre no D5, dessa forma as instituições tendem a planejar o início da coleta para esse dia (GRIGG et al., 1995).

Alguns serviços utilizam como estratégia de coleta o processamento de grandes volumes sanguíneos objetivando coletar o máximo de células para alcançar a meta em um único dia (GASOVA et al, 2005); (ALEGRE et al, 1996); (SMOLOWICZ; VILLMAN; TIDEFELT, 1997); (ZUBAIR et al, 2010); (ROWLEY et al, 2001) enquanto outros se utilizam de protocolos com menores volumes sanguíneos. Estes habitualmente necessitam de dias subsequentes.

O perfil de planejamento de aféreses em nossa unidade é a realização da coleta em mais de 1 dia, visto que 76.60% dos pacientes necessitaram de > 1 dia. Esse fato não se deve por má mobilização já que para ser iniciada a aférese no D5 eles precisavam ter CD34⁺ pré coleta > 10 x 10⁶ por Kg., mas sim pelo processamento de poucas volemias sanguíneas sendo a média de 1.48.

O processamento de pequenos volumes, embora tenha como vantagem a redução da toxicidade associada ao uso do citrato, ocasiona evidente aumento dos custos com internação, medicamentos e insumos de aférese. Não foi objeto deste estudo o cálculo desse custo, porém focando no insumo que mais tem peso na aférese, o circuito, podemos dizer que cada paciente utilizou, em média 2,20. Outros estudos calcularam os custos do procedimento de mobilização e aférese, e neles percebe-se que o momento da aférese é o mais oneroso (MEISENBERG, 1999); (GLASPY, 1999).

Em nosso estudo procuramos identificar se, nesses pacientes com múltiplas coleta, há uma gradual deterioração da eficácia nos dias subsequentes.

A eficácia da coleta de CPH por aférese depende de fatores físicos e biológicos (HEQUET, 2015). Os fatores físicos estão associados a particularidades do sistema de coleta como raio e rotação, gradiente de densidade dos elementos sanguíneos e, o volume de sangue processado. Já os fatores biológicos são a disponibilidade de células CD34⁺ pré aférese no sangue periférico e, o movimento das mesmas entre os espaços intra e extravascular.

Sabidamente o fator mais importante para sucesso da coleta é CD34⁺ pré (KUDSEM et al, 2001); (FONTAIO-WENDEL et al, 1999); (FORD et al, 2003). De forma similar a diversos estudos encontramos que a CD34⁺ pré aférese se relaciona de forma positiva com o CD34⁺ coletado.

Na população analisada eficácia demonstrou deterioração gradual sendo maior no 1º dia > 2º > 3º dia ($p < 0,05$). Quando pareadas as amostras, o achado se confirmou tendo o mesmo paciente apresentado uma eficácia gradualmente menor nos dias de coleta subsequentes.

A ausência de diferença na eficácia e na quantidade de volemias processadas também era esperada uma vez que, respectivamente durante todo o processo usamos o mesmo sistema de aférese e protocolos para coleta de CPH.

Portanto, considerando que os aspectos físicos não foram alterados, uma vez que o equipamento de aférese foi o mesmo e não houve variação importante nas volemias processadas, podemos sugerir que a deterioração da eficácia encontrada pode ser atribuída a fatores biológicos inerentes ao paciente. Dentre estes podemos citar a contagem de CD34⁺ pré coleta e o recrutamento.

A contagem de CD34⁺ pré varia com o tipo de mobilização aplicada (GIDRON et al, 2005); (GERTZ, 2010), fato anulado em nossa pesquisa pelo uso apenas do G-CSF. Em nosso estudo houve uma diferença na contagem pré dessas células apenas entre o 2º e o 3º de coleta com correlação positiva moderada de 0,569, não podendo ser atribuída a diferença de eficácia entre as coletas do 2º e o 3º exclusivamente a esse fator.

Outro constituinte do componente biológico é o recrutamento que já foi identificado por diversos autores (BENJAMIN et al, 1997); (FONTANA et al, 2006); (SMOLOWICZ et al, 1999); (HUMPE et al., 2000). Em nossa pesquisa não foi possível quantificar esse fenômeno de liberação de células CD34⁺ da medula óssea para o intravascular durante o procedimento de aférese uma vez que, não tínhamos a medida de células CD34⁺ do paciente durante/pós procedimento.

Pelo fato de anularmos outros fatores físicos e biológicos responsáveis pela eficácia do procedimento, acreditamos que a melhor eficácia no 1º dia de coleta em relação ao 2º se deve a um melhor recrutamento dessas células para sangue periférico. O mecanismo responsável por esse recrutamento ainda não foi elucidado (FORD et al, 2002), mas acredita-se que possa estar relacionado um feedback negativo gerado pela coleta brusca de células do intravascular num

curto espaço de tempo. O recrutamento parece estar associado a capacidade de mobilização das células CD34⁺ no sangue periférico, e estudos atuais tentam identificar o papel do plerixafor nessa cinética.

Um fator que, indiretamente, fala a favor da ocorrência do recrutamento foi a obtenção de CE2>100%. Como não é possível coletar 100% das células processadas, esse dado pode indicar que subestimamos a contagem de CD34⁺ processadas ou que de fato houve uma liberação destas durante o procedimento. Esse achado também foi relatado por SARKODEE-ADOO et al em 2003.

Assim sendo, acreditamos que os planejamentos de aférese devam ser feitos com o objetivo de realizar a melhor coleta de CPH possível com toxicidade tolerável e, em um único dia, deixando os dias subsequentes para eventuais complementações. É importante ressaltar que o fato de se obter a dose parcial no 1º dia não assegura sucesso nos dias subsequentes ou em nova mobilização. Portanto, quando há oportunidade favorável a coleta, todos os esforços devem ser concentrados para a obtenção da meta.

A estratégia mais utilizada para obter esse resultado é o aumento do volume sanguíneo processado durante a aférese. Esse acréscimo resulta em maior tempo de aférese e gasto de anticoagulante. A toxicidade relacionada ao citrato pode ser manejada com uso de heparina concomitante e consequente redução da taxa de infusão do ACD-A (ZUBAIR et al, 2010); (HUMPE et al, 2000)

A aplicação dessa proposta, com consequente redução dos dias de coleta necessários para atingir a meta da dose, está associada a diversos benefícios como a redução do custo total do processo, quer pela diminuição de uso de insumos na aférese, quer pela possibilidade de coletar maiores doses de CD34⁺ para realização do transplante com consequente melhor pega do enxerto (SCHULMAN et al., 1999); (VAN DER WALL et al., 1994). Ocorre também a redução das complicações associadas ao uso do G-CSF, ao tempo de permanência do acesso profundo e internação e ao procedimento de aférese devido a menor exposição. Outro ganho se associa a maior chance de se obter sucesso na coleta de CPH com redução da necessidade de coletas na bacia e menor risco de frustração do paciente. Quando reduzimos o número de aféreses também teremos um menor número de bolsas de produto coletadas e, portanto, redução do dimetilsulfóxido (DMSO) para preservação celular, da necessidade de ocupação do freezer para armazenamento e custo com criopreservação. Por fim, o serviço de aférese será capaz de

abrir novas vagas, propiciando a expansão da oferta de tratamento para pacientes hoje não contemplados.

Através do dados colhidos também calculamos o coeficiente de eficiência da instituição, que foi 50.51%. Esse valor está dentro da média encontrada em diversas estudos que variam entre 30 e 70% (KINDWALL-KELLER, 2014).

Essa ferramenta é amplamente utilizada na comparação de diferentes sistemas de aférese e na programação novos procedimentos através da estimativa de volume sanguíneo que deve ser processado (IKEDA et al, 2014); (BRAUNINGER , 2012); (ROSENBAUM; O'CONNELL; COTTLER-FOX , 2012). Outra utilização para o mesmo é seu uso como marcador da qualidade do processo, suscitando investigação quando o CE2 encontrado em determinado procedimento for consideravelmente menor do que a média da instituição.

8 CONCLUSÕES

1. Demonstramos que o primeiro dia de coleta, no D5, tem maior eficácia que nos dias subsequentes;
2. Visto que os fatores físicos que afetam a eficácia foram controlados, essa diferença de eficácia provavelmente se deve a fatores biológicos como a contagem de CD34 pré-aférese (D2>D3) ou o provável recrutamento de células CD34⁺ do espaço extravascular para o intravascular durante a coleta;
3. Portanto, nossos achados fundamentam a proposta de realizar coletas com processamento de maior número de volemias no primeiro dia de coleta, manejando adequadamente a toxicidade do citrato, quer fazendo a reposição simultânea de cálcio, quer estendendo o tempo de coleta, quer associando heparina ao citrato e reduzindo sua taxa de infusão.

8.1.1.1 REFERÊNCIAS

- ALEGRE, A. et al. Large-volume leukapheresis for peripheral blood stem cell collection in children: a simplified single-apheresis approach. **Bone Marrow Transplant.**, v. 17, p.923-7, 1996.
- ANDERLINI, P. et al. Clinical toxicity and laboratory effects of granulocyte colony stimulating factor (filgrastim) mobilization and blood stem cell apheresis from normal donors, and analysis of charges for the procedures. **Transfusion.**, v.36, p.590- 5, 1996.
- ARMITAGE, S. et al. CD34⁺ counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. **Bone Marrow Transplantation.**, v.20, p.587–591, 1997.
- AZEVEDO, A.C. Avaliação de desempenho de serviços de saúde. **Rev. de Saúde Pública.**, v.25, p.64-71, 1991.
- BENDER, J.G. et al. Defining a autologous recovery phase peripheral blood stem cell transplant therapeutic dose of peripheral blood stem cells. **J Hematotherapy plants, autologous bone marrow transplants and allogeneic.**, v.1, p.329–334, 1992.
- BENJAMIN, R.J. et al. Preapheresis peripheral blood CD34⁺ mononuclear cell counts as predictors of progenitor cell yield. **Transfusion.**, v.37, p.79–85, 1997.
- BITTAR, O.J.N.V. Gestão de processo e certificação para qualidade em saúde. **Rev. da Assoc. Médica Brasileira.**, v.46, 2000.
- BORTIN, M.M. A compendium of reported human bone marrow transplants. **Transplantation.**, v.9, p.571–587, 1970.
- BRAUNINGER, S. et al. Allogeneic donor peripheral blood “stem cell” apheresis: prospective comparison of two apheresis systems. **Transfusion.**, v.52, p.1137-45, 2012.
- CARVALHO, C. C. de; GOLDENBERG, R. C. dos S. **Células-tronco Mesenquimais**. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2012.
- CERILLI, L.A.; WICK, MR. Immunohistology of soft tissue and osseous neoplasms. In Dabbs DJ (editor). **Diagnostic Immunohistochemistry** 2hd. Ed. Churchill Livingstone Elsevier, p.65-120, 2006.
- CHOW, S. et al. Predictors of unsuccessful mobilization with granulocyte colony stimulating factor alone in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Apher.**, v.28, p.285-92, 2013.
- CLINE MJ, GOLDE DW. Mobilization of hematopoietic stem cells (CFU-C) into the peripheral blood of man by endotoxin. **Exp Hematol.**, v.5, p.186-190, 1977.
- D'SOUZA, A; FRETHAM, C. Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): **CIBMTR Summary Slides**, 2017. Disponível: <http://www.cibmtr.org>. Acesso em 12 de fevereiro de 2018.

- DI PERSIO, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. **Blood.**, v. 113, 2009.
- DRUBOVSKY, L. et al. CD34⁺ Collection Efficiency as function of blood volumes processed in pediatric autologous peripheral blood stem cell collection. **Journal of clinical apheresis.**, v. 26, p. 131-137, 2011.
- FOLEY, G. et al. **Nursing care of child with cancer.** 2 ed, 1993.
- FONTANA, S. et al. Progenitor cell recruitment during individualized high-flow, very-large-volume apheresis for autologous transplantation improves collection efficiency. **Transfusion.**, v.46, p.1408-16, 2006.
- FONTAO-WENDEL, R. et al. The absolute number of circulating CD34⁺ cells as the best predictor of peripheral hematopoietic stem cell yield. **J Hematother.**, v.8, p. 255-62, 1999.
- FORD, C.D. et al. An evaluation of predictive factors for CD34⁺ cell harvest yields from patients mobilized with chemotherapy and growth factors. **Transfusion.**, v. 43, p.622-5, 2003.
- FORD, C.D. et al. Comparison of CD34⁺ cell collection efficiency on the COBE Spectra and Fenwal CS-3000 plus. **J Clin Apher.**, v.17, p.17–20, 2002.
- FORD, CD. et al. CD34⁺ cell adhesion molecule profiles differ between patients mobilized with granulocyte- colony-stimulating factor alone and chemotherapy followed by granulocyte-colony-stimulating factor. **Transfusion.**, v.46, p.193-8, 2006.
- FOWLER, C.J. et al. Rescue from failed growth factor and/or chemotherapy hsc mobilization with g-csf and plerixafor (amd3100): an institutional experience. **Bone Marrow Transplantation.**, v. 43, p.909–917, 2009.
- GASÓVA, Z. et al. PBPC collection techniques: standard versus large volume leukapheresis (LVL) in donors and in patients. **Transfusion and Apheresis Science.**, v. 32, p.167-176, 2005
- GERTZ, M.A. Current status of stem cell mobilization. **British Journal of Haematology.**, v.150, p.647-662, 2010.
- GIDRON, A. et al. Can the stem cell mobilization technique influence CD34⁺ cell collection efficiency of procedures in patients with hematologic malignancies? **Bone Marrow Transplant.**, v.35, p.243-6, 2005.
- GIRALT, S. et al. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). **Leukemia.**, v.23, p.904-12, 2009.
- GLASPY, J.A. Economic considerations in the use of peripheral blood progenitor cells to support high-dose chemotherapy. **Bone Marrow Transplant.**, v.23, p.21–27, 1999.
- GRIGG, A. P. et al. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. **Blood.**, v.86, p.4437-4445, 1995.

- HANSEN, J. A. et al. Transplantation of marrow from an unrelated donor to a patient with acute leukemia. **New England Journal of Medicine.**, v.303, p.565-567, 1980.
- HENIG, I; ZUCKERMAN, T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. **Rambam Maimonides Medical Journal.**, v.28, 2014.
- HEQUET, O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. **Journal of Blood Medicine.**, v.6, p.55-67, 2015.
- HILLYER, C.D. Large volume leukapheresis to maximize peripheral blood stem cell collection. **J Hematother.**, v.2, p.29-32, 1993.
- HOFFBRAND, A. V; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. **Fundamentos da hematologia.** 6ed. Porto Alegre: Artmed, p.3, 2013.
- HUMPE, A. et al. A cell-kinetic model of CD34+ cell mobilization and harvest: development of a predictive algorithm for CD34+ cell yield in PBPC collections. **Transfusion.**, v.40, p. 1363-70, 2000.
- HUMPE, A. et al. A prospective, randomized, sequential, crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effect on serum electrolytes, platelet counts, and other coagulation measures. **Transfusion.**, v.40, p. 1120-1127, 2000.
- HUMPE, A. et al. A prospective, randomized, sequential, crossover trial of large-volume versus normal-volume leukapheresis procedures: effect on progenitor cells and engraftment. **Transfusion**, v.39, p.1120-1127, 1999.
- IKEDA, K. et al. Peripheral blood progenitor cell collection by two programs for autologous and allogeneic transplantation. **Transfusion.**, v.54, p.1235-1242, 2014.
- JACOBSON, L.O. et al. Effect of spleen protection on mortality following x-irradiation. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine.**, v. 34, p.1538 – 1543, 1949.
- JUNIOR, F.C.S; ODONGO, F.C.A; DULLEY, F.L.Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.**, v.31, p.53-58, 2009.
- JUNIOR, G. D. G; VIEIRA, M. M. F. Qualidade total e administração hospitalar: explorando disjunções conceituais. **Ciência &Saúde Coletiva.**, v.7, p.325-334,2002.
- KANTETI, R et al. Randomized trial of peripheral blood progenitor cell vs bone marrow as hematopoietic support for high-dose chemotherapy in patients with non Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease: A clinical and molecular analysis. **Bone Marrow Transplant.**, v.24, p.473-8, 1999.
- KESSINGER, A; SHARP, JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. **Bone Marrow Transplant.**, v.31, p.319- 29, 2003.
- KINDWALL-KELLER, T. Pheripheral stem cell collection: from leukocyte growth factor to removal of catheter. **J Clin Apher.**, v.29, p.199-205, 2014.
- KNUDSEN, L.M. et al. Kinetics studies during peripheral blood stem cell collection show CD34+ cell recruitment intra-apheresis. **Journal of Clinical Apheresis.**, v.16, p.114-119, 2001.

- KOEPSELL, S. A.; JACOB, E. K., MCKENNA JR, D.H. The collection and processing of hematopoietic stem cells. **Technical manual**, Bethesda, MD: AABB;18th, p.713-728, 2014.
- LONG, G. et al. Evaluation of the spectra optia mononuclear cell collection procedure in multiple myeloma patients. **Journal of clinical apheresis.**, v.30, p.1-7, 2015.
- LORENZ, E. et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **Journal of the National Cancer Institute.**, v.12, p.197-201, 1951.
- LUCAS, D. et al. Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing cell. **Stem Cell.**, v.3, p.364-6, 2008.
- MAYER, J; POSPÍSIL, Z; KORISTEK, Z. Mathematical model of peripheral blood stem cell harvest kinetics. **Bone marrow transplantation.**, v.32, p.749-757, 2003.
- MEEHAN, K.R. et al. Mobilization, collection, and processing of autologous peripheral blood stem cells: development of a clinical process with associated costs. **J Hematother Stem Cell Res.**, v.9, p.767-771, 2000.
- MEISENBERG, B. et al. A combination of low-dose cyclophosphamide and colony-stimulating factors is more cost-effective than granulocyte-colony-stimulating factors alone in mobilizing peripheral blood stem and progenitor cells. **Transfusion.**, v.38, p.209-215, 1999.
- MILLER, JP. et al. Recovery and safety profiles of marrow and PBSC donors: Experience of the National Marrow Donor Program. **Biol Blood Marrow Transplant.**, v.14, p.29-36, 2008.
- MOOG, R. Apheresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. **Transfusion and Apheresis Science.**, v.31, p.207-220, 2004.
- MOOG, R. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells. **Curr Stem Cell Res Ther.**, v.1, p.189-201, 2006.
- NEYRINCK, M.M; VRIELINK, H. Calculations in apheresis. **Journal of Clinical Apheresis.**, v.30, p.38-42, 2015.
- PONCHIO, L. et al. Both cycling and noncycling primitive progenitors continue to be mobilized into the circulation during the leukapheresis of patients pretreated with chemotherapy and G-CSF. **J Haematol.**, v.99, p.394-402, 1997.
- PULSIPHER, M.A et al. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. **Blood.**, v.113, p. 3604-3611, 2009.
- ROSENBAUM, E.R; O'CONNEL, B; COTTLER-FOX, M. Validation of a formula for predicting daily CD34⁺ cell collection by leukapheresis. **Cytotherapy.**, v.14, p.461-466, 2012.
- ROWLEY, SD. et al. Trafficking of CD34 cells into the peripheral circulation during collection of peripheral blood stem cells by apheresis. **Bone Marrow Transplantation.**, v.28, p.649-656, 2001.
- RUSSEL, N. et al. Plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor for first-line steady-state autologous peripheral blood stem cell mobilization in lymphoma and multiple myeloma: results of the prospective PREDICT trial. **Haematologica.**, v.2, 2013.

- SARKODEE-ADOO, C. et al. Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34+ cell collection by large-volume apheresis. **Bone Marrow Transplantation.**, v.31, p. 851–855, 2003.
- SCHÖNERMARCK, U; BOSCH, U.T. Vascular Access for Apheresis in Intensive Care Patients. **Therapeutic Apheresis and Dialysis.**, v.7, p. 215–220, 2003.
- SCHULMAN, K.A. et al. Effect of CD34 cell dose on resource utilization in patients after high-dose chemotherapy with peripheral blood stem-cell support. **J Clin Oncol.**, v.17, p.1227, 1999
- SHADE, R et al. Similar dynamics of intraapheresis autologous CD34+ recruitment and collection efficiency in patients undergoing mobilization with or without plerixafor. **Transfusion.**, v.54, p.3131-3137, 2014.
- SMOLOWICZ, A.G. et al. Kinetics of peripheral blood stem cell harvests during a single apheresis. **Transfusion.**, v.39, p.403-409, 1999.
- SMOLOWICZ, AG; VILLMAN, K; TIDEFELT, U. Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. **Transfusion.**, v. 37, p. 88-92, 1997.
- STRONCEK, D. F. et al. Transient spleen enlargement in peripheral blood progenitor cell donors given G-CSF. **Journal of Translation Medicine.**, v.2, 2004.
- THOMAS, E.D et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **N. Engl. J. Med.**, v. 257, p. 491, 1957.
- THOMAS, E.D. A history of haemopoietic cell transplantation. **British Journal of Haematology.**, v.105, p.330-339, 1999.
- THOMAS, J.; FULU, L.; LINK, D. C. Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. **Current Opinion in Hematology.**, v.9, p.183–189, 2002.
- TIWARI, A.K. et al. Autologous peripheral blood stem cell harvest: Collection efficiency and factors affecting it. **Asian Journal of Transfusion Science.**, v.10, p.93-97, 2016.
- TO, L.B. et al. The biology and clinical uses of blood stem cells. **Blood.**, v.89, p. 2233-2258, 1997.
- TO, L. BIK; LEVESQUE, JP.; HERBERT, K. E., 2011. How I treat patients who mobilize hematopoietic stem cells poorly. **Blood.**, v.118, 2011.
- VAN DER WALL, E. et al. Bone marrow reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: Effect of graft size. **Annals of oncology**, v.5, p.795-802, 1994.
- VASU, S. et al. Donor demographic and laboratory predictors of allogeneic peripheral blood stem cell mobilization in an ethnically diverse population. **Blood.**, v.112, p-2092-100, 2008.
- VERLINDEN, A. et al. Determining Factors Predictive of CD34⁺ Cell Collection Efficiency

in an Effort to Avoid Extended and Repeated Apheresis Sessions. **Journal of Clinical Apheresis.**, v.28, p.404–410, 2013.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell.**, v.116, p.639 - 648, 2004.

WANG, T-S. et al. Poor harvest of peripheral blood stem cell in donors with microcytic red blood cells. **Transfusion.**, v.53, p.91-95, 2013.

WEAVER, CH et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. **Blood.**, v. 86, p. 3961-9, 1995.

WEINSTEIN, R. Basic Principles of Therapeutic Blood Exchange. **Apheresis: Principles and Practice**, Bethesda, MD: AABB; 3th, p.269-293, 2010.

WINGARD, J.R; WIRK, B; BROWN, R. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: an overview. **Apheresis: Principles and Practice**, Bethesda, MD: AABB; 3th, p.465-481,2010.

YOON, DH. et al. Higher infused CD34+ hematopoietic stem cell dose correlates with earlier lymphocyte recovery and better clinical outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin's lymphoma. **Transfusion.**, v.49, p.1890-900, 2009.

YUAN, S; WANG, S. How do we mobilize and collect autologous peripheral blood stem cells? **Transfusion.**, v.0, p.1-11, 2016.

ZIMMERMAN, TM. et al. Quantitative CD34 227–284. analysis may be used to guide peripheral blood stem cell. **Bone Marrow Transplant.**, v. 15, p. 439–444, 1995

ZUBAIR, A.C. et al. Multiple Myeloma Patients Receiving Large Volume Leukapheresis Efficiently Yield Enough CD34+ Cells to Allow Double Transplants. **J Clin Apher.**, v.24, p.6-11, 2010.

8.1.1.2 ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) em seres humanos do Hemorio.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

HEMORIO
INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA
ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2015.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Prezada Pesquisadora,

O projeto, ***"Avaliação da estratégia de coleta de células progenitoras hematopoiéticas em dias subsequentes para transplante autólogo em pacientes com patologias hematológicas"***, registrado no CEP HEMORIO sob o número 384/15, Assim, após apresentação e análise dos documentos recebidos, o Comitê de Ética em Pesquisa HEMORIO considera o projeto **APROVADO**.

Ressaltamos abaixo, algumas orientações fundamentais, as quais o pesquisador deve estar muito atento:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado;
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeira ação imediata;
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificações ao CEP e à ANVISA, junto com seu posicionamento;
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente até 13/06/2016 e ao término do estudo.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Rua Frei Caneca, 8 – Centro – Rio de Janeiro – CEP 20211-030
Tel.: (21) 2299-9442 R. 2215 – Fax: 2242-4250 – www.hemorio.rj.gov.br – cep@hemorio.rj.gov.br

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE

HEMORIO
INSTITUTO ESTADUAL DE HEMATOLOGIA
ARTHUR DE SIQUEIRA CAVALCANTI

Sendo assim, por favor, contate a Coordenação do CEP HEMORIO (Sra. Marcia Villa Nova, Thaís Oliveira ou Joselaine Sousa) pelo telefone 2332-8612, ramal 2415, a fim de estabelecermos o fluxo de sua pesquisa e tomarmos outras providências pertinentes.

Atenciosamente,

Marcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO