Alfredo Mendrone Junior

Coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico após administração de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): uma análise de 307 pacientes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley

São Paulo

2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mendrone Junior, Alfredo

Coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico após administração de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) : uma análise de 307 pacientes / Alfredo Mendrone Junior. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientador: Frederico Luiz Dulley.

Descritores: 1.Mobilização de células-tronco hematopoéticas 2. Transplante autólogo 3. Medula óssea 4. Fator estimulador de colônias de granulócito recombinante

USP/FM/SBD-439/07

Para ser grande, sê inteiro;

Nada teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa.

Põe quanto és no mínimo que fazes.

Assim, em cada lago a lua toda brilha,

Porque alta vive.

Fernando Pessoa

*À Valéria, minha mulher e companheira, por todo o apoio,
ajuda, paciência, compreensão e incentivo.*

*Aos meus filhos queridos, Natália e Henrique, razões da
minha vida, pela alegria e entusiasmo contagiantes.*

*Aos meus pais, por tudo que me ensinaram,
minha gratidão eterna.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao **Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley**, por ter me conduzido neste trabalho e pela amizade durante todos estes anos.

Ao **Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone**, professor titular da disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP, por todas as oportunidades e confiança depositada.

Ao **Prof. Dr. Pedro Enrique Dorliac Llacer**, Diretor Técnico-Científico da FPS/HSP, pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos **Drs. José Mauro Kutner, Israel Bendit e Juliana Pereira**, pelas valiosíssimas contribuições na fase de qualificação deste trabalho.

À **Dra. Cyntia Arrais**, médica do Departamento de Aférese da FPS/HSP, pela amizade, companheirismo, profissionalismo e ajuda .

Aos **Drs. Nelson Tatsui e Luciana Sampaio** do Departamento de Aférese da FPS/HSP, pela contribuição diária com os dados contidos neste trabalho.

Às enfermeiras **Adriana Maria Cagiano, Ana Paula de Jesus Geraldo e Ana Maria Arrifano**, e auxiliares de enfermagem **Edilene Rigueira, Geane Viana e Arnaldo da Silva**, do Departamento de Aférese da FPS/HSP, pela dedicação, amizade, ajuda e brilhante trabalho exercido ao longo destes anos.

Aos funcionários do setor Criopreservação Celular da FPS/HSP, **Katsue Yasumura, Maria Luiza Silva Alves de Paula, Paulo César Pereira e MSc. Sueli Melende**, pela amizade e por todos os anos de trabalho conjunto.

À equipe da FPS/HSP participante do REDS: **Prof. Dra. Ester Sabino, Dr. César de Almeida, Nanci Salles e Ligia Capuani**, pela acolhida e oportunidade de um novo horizonte.

A **Dra. Genny Barna**, responsável pela Área de Fracionamento e Estoque da FPS/HSP, pela amizade, incentivo e confiança.

Ao funcionário **Paulo Roberto Villa**, do TMO do HC, pela exaustiva ajuda no levantamento dos prontuários.

À **Claudinete Pinto dos Anjos**, em especial, pela amizade, lealdade e inestimável contribuição neste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Transplante de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico .	28
3.2 Identificação e quantificação das CPH	35
3.3 Mobilização de CPH	39
3.3.1 Quimioterapia mielossupressora	40
3.3.2 Citocinas	42
3.3.3 Citocinas e quimioterapia mielossupressora	48
3.3.4 Mecanismos de mobilização	51
3.4 Não resposta à mobilização	53
3.5 Coleta de CPH de sangue periférico	65
3.6 Vantagens das CPH mobilizadas de sangue periférico	71
3.6.1 Número de CPH coletadas do sangue periférico após mobilização	72
3.6.2 Tempo de recuperação hematopoética com CPH de sangue periférico ..	73
3.6.3 Contaminação tumoral do produto coletado de sangue periférico	76
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	78
4.1 Pacientes	79
4.2 Mobilização de CPH	79
4.3 Análise do número de CPH no sangue periférico	80
4.4 Coleta de CPH de sangue periférico por leucaférese	81
4.5 Quantificação do número de células CD34+	82
4.5.1 Quantificação de células CD34+ no sangue periférico	85
4.5.2 Quantificação de células CD34+ no produto coletado	85
4.6 Critérios de resposta ao regime de mobilização	85
4.7 Coleta de células da medula óssea	86
4.8 Quantificação do número de células nucleadas no produto medular	87
4.9 Criopreservação das CPH coletadas	89
4.10 Análise retrospectiva dos prontuários	90
4.11 Análise de sobrevida	92

4.12 Análise estatística	92
5 RESULTADOS	94
5.1 Características gerais dos pacientes	95
5.2 Variáveis pré-regime de mobilização	98
5.2.1 Tempo de doença e tratamento prévio administrado	98
5.2.2 Situação clínica da doença no início da mobilização	100
5.2.3 Contagem de plaquetas ao início da mobilização	100
5.3 Regime de Mobilização Utilizado	101
5.4 Resposta ao regime de mobilização	102
5.5 Coleta de CPH do sangue periférico por leucaférese	103
5.6 Análise univariada das variáveis pré-mobilização	104
5.6.1 Sexo e Idade com relação ao sucesso na resposta à mobilização	106
5.6.2 Diagnóstico com relação ao sucesso na resposta à mobilização	106
5.6.3 Número prévio de ciclos de quimioterapia com relação ao sucesso na resposta à mobilização	108
5.6.4 Tipo de tratamento administrado previamente em relação ao sucesso na resposta à mobilização	110
5.6.5 Contagem de plaquetas pré-mobilização em relação ao sucesso na resposta à mobilização	111
5.6.6 Atividade da Doença e Infiltração Medular com relação ao sucesso na resposta à mobilização	112
5.6.7 Tempo de Doença em relação ao sucesso na resposta à mobilização	113
5.6.8 Intervalo de tempo compreendido entre o início do regime de mobilização e pico no número de células CD34+ no sangue periférico em relação ao sucesso na resposta à mobilização	113
5.7 Análise Multivariada	115
5.8 Variáveis pós-regime de mobilização (pré-leucaférese) e correlação com o número de células CD34+ no produto coletado	117
5.9 Número total de células CD34+ infundidas	122
5.10 Sobrevida Global dos Pacientes	123
6 DISCUSSÃO	129
7 CONCLUSÕES	145
REFERÊNCIAS	148
APÊNDICE 1 - Relação de pacientes	164

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD-A	Adenina, Citrato e Dextrose – Fórmula A
BFU-E	<i>Burst Forming Units – Erythroid</i> Unidades formadores de <i>burst</i> eritróide
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD34+	Células que expressam na sua superfície a molécula CD34
CFU	<i>Colony-Forming Units</i> Unidades formadoras de colônias
CFU-E	<i>Colony Forming Units – Erythroid</i> Unidades formadoras de colônias eritróides
CFU-GEMM	<i>Colony-Forming Units – Granulocytes-Erythrocytes-Monocytes-Megacariocytes</i> Unidades formadoras de colônias de granulócitos-eritrócitos-monócitos-megacariócitos
CFU-GM	<i>Colony-Forming Units – Granulocytes-Monocytes</i> Unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos
CG	Catepsina G
CPH	Células Progenitoras Hematopoéticas
CXCR-4	<i>Chemokine receptor- 4</i> Receptor - 4 de quimiocinas
DMSO	Dimethilsulfóxido
FITC	Fluoresceína Isotil Cianato
G	<i>Gauge</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	<i>Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor</i> Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos
HA	<i>Hyaluronic Acid</i> Ácido hialurônico
HIV	<i>Human Immunodeficient Virus</i> Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i> Antígenos leucocitários humanos
IL	Interleucina
ISHAGE	<i>International Society of Hematotherapy and Graft Engineering</i>

IV	Intravenoso(a)
KL	<i>Kit-Ligand</i> Kit-Ligante
LH	Linfoma de Hodgkin
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MM	Mieloma Múltiplo
MMP9	<i>Matrix Metalloproteinase-9</i> Metaloproteinase-9 da matriz celular
n ^o	Número
NE	<i>Neutrophyl Elastase</i> Elastase de neutrófilos
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PE	Ficoeritrina
PSGL	<i>P-Selectin Glycoprotein ligand-1</i> Glicoproteína ligante-1 da P-Selectina
rHuTPO	<i>Recombinant human Thrombopoietin</i> Trombopoietina recombinante humana
rHuSCF	<i>Recombinant human Stem cell factor</i> Fator recombinante humano
SC	Subcutâneo(a)
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i> Fator -1 derivado da célula estromal
TBI	<i>Total Body Irradiation</i> Irradiação corporal total
TMO	Transplante de Medula Óssea
VAD	Esquema quimioterápico baseado na associação de Vincristina, Doxorrubicina e Dexametasona
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> Molécula de adesão - 1 da célula vascular
VLA-4	<i>Very Late Antigen - 4</i>
VO	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

a	ano(s)
C	Celsius
kg	quilograma
L	litro
m ²	metro quadrado
μL	microlitro
mL	mililitro
mm ³	milímetro cúbico
nm	nanômetro
rpm	rotações por minuto
+	mais
>	maior
<	menor
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
Σ	somatória

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas	36
Figura 2	Esquema simplificado do mecanismo de mobilização da CPH ...	53
Figura 3	Quantificação do número de células CD34+	84
Figura 4	Diagnóstico (MM x LH x LNH x LMA x Outros) em relação ao sucesso na resposta à mobilização	107
Figura 5	Diagnóstico (MM x LH, LNH, LMA) em relação ao sucesso na resposta à mobilização	108
Figura 6	Número prévio de ciclos de quimioterapia em relação ao sucesso na resposta à mobilização	109
Figura 7	Contagem de plaquetas pré-mobilização em relação ao sucesso na resposta à mobilização	
Figura 8	Intervalo de tempo (em dias) entre o início da mobilização e pico de células CD34+ no sangue periférico (/mm ³) em relação ao sucesso na resposta à mobilização	115
Figura 9	Correlação entre o número de leucócitos no sangue periférico pré-leucaférese (/mm ³) e o número de células CD34+ no produto coletado (x 10 ⁶ células/kg)	119
Figura 10	Correlação entre o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese (/mm ³) e o número de células CD34+ no produto coletado (x 10 ⁶ células/kg)	119
Figura 11	Correlação entre a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese (/mm ³) e o número de células CD34+ no produto coletado (x 10 ⁶ células/kg)	120
Figura 12	Correlação entre o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico (/mm ³) e a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese	121
Figura 13	Sobrevida global dos pacientes elegíveis para esta análise	126

Figura 14 Sobrevida de acordo com resposta à mobilização de células progenitoras	126
Figura 15 Sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LH, LNH e LMA, de acordo com resposta à mobilização de células progenitoras ...	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Indicações de transplante de medula óssea	29
Tabela 2	Tempo de recuperação hematopoética (em dias) em transplantes autólogos	76
Tabela 3	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes e dados referentes aos procedimentos de leucaférese	95
Tabela 4	Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico	97
Tabela 5	Tratamento administrado previamente	98
Tabela 6	Tipo de droga quimioterápica administrada previamente em relação ao diagnóstico	99
Tabela 7	Atividade da doença ao início da mobilização de CPH	100
Tabela 8	Regime de mobilização: dose de ciclofosfamida e de G-CSF administrada	101
Tabela 9	Número de procedimentos de leucaférese / paciente	103
Tabela 10	Análise univariada entre variáveis pré-mobilização e coleta em relação à resposta à mobilização	104
Tabela 11	Intervalo de tempo entre o início da mobilização e o pico de células CD34+ no sangue periférico (/mm ³) em relação à resposta à mobilização	114
Tabela 12	Regressão logística das variáveis associadas com resposta à mobilização	116
Tabela 13	Medidas descritivas das variáveis pré-leucaférese: número de leucócitos (/mm ³), número de células CD34+ (/mm ³), porcentagem de células CD34+ no sangue periférico e número de células CD34+ no produto coletado	117
Tabela 14	Correlações de Spearman entre as variáveis número de leucócitos (/mm ³), número absoluto de células CD34+ (/mm ³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico e a variável número de células CD34+ no produto coletado	118

Tabela 15	Correlação de Spearman entre relações das variáveis: número absoluto de células CD34+ (/mm ³) no sangue periférico, porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese com o número de células CD34+ no produto coletado	121
Tabela 16	Medidas descritivas do número de leucaféreses realizado, número de volemias processadas/procedimento, número total de células CD34+ coletado e número de células nucleadas coletado nos pacientes submetidos à punção medular	122
Tabela 17	Características dos pacientes de acordo com a elegibilidade para análise de sobrevida	124

RESUMO

MENDRONE JUNIOR A. *Coleta de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico após administração de ciclofosfamida e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF): uma análise de 307 pacientes*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Mobilização inadequada de células progenitoras hematopoéticas (CPH) tem sido observada em 10 - 30% dos pacientes submetidos a transplante de medula óssea (TMO) autogênico para tratamento de doenças onco-hematológicas. Os fatores relacionados com má resposta à mobilização ainda não estão totalmente estabelecidos. Apresentamos uma análise retrospectiva de pacientes submetidos à TMO autogênico com o objetivo de identificar variáveis associadas com resposta ruim ao regime de mobilização utilizado. **Casuística e Métodos:** Fizeram parte desta análise 307 pacientes com diferentes diagnósticos, tratados com TMO autogênico em uma única Instituição, no período de Abril de 2001 a Abril de 2007. Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a um único regime de mobilização baseado na administração de ciclofosfamida (dose total de 60-120 mg/kg de peso IV) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (dose diária de 6 – 17 µg/(kg de peso)/dia SC). O sucesso na resposta ao regime de mobilização foi definido quando um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34 + /(kg de peso) foi coletado do sangue periférico com até três procedimentos de leucaférese. **Resultados:** Dos pacientes analisados, 260 apresentaram sucesso na mobilização (84,7%). Nestes pacientes, um número mediano de 3,67 (2,0 – 46,0) células CD34+ /(kg de peso) foi coletado por paciente com um número mediano de 1 (1-3) procedimento de leucaférese. O insucesso na mobilização foi observado em 47 pacientes (15,3%): 24 (7,8%) que foram submetidos à coleta de CPH de sangue periférico, porém não coletaram número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) com pelo menos três procedimentos de leucaférese; e, 23 (7,5%) foram submetidos à coleta de CPH por punção da medula óssea, por não terem atingido número mínimo de 10 células CD34+/mm³ no sangue periférico para realização de leucaférese. De acordo com

análise univariada, os fatores associados com o insucesso foram: diagnóstico ($P < 0,0001$), tempo de doença ($P < 0,0001$), número prévio de ciclos de quimioterapia ($P = 0,0001$), exposição prévia a agentes alquilantes ($P = 0,0003$) e a mitoxantrone ($P = 0,0006$), contagem de plaquetas pré-mobilização $< 150.000/\text{mm}^3$ ($P = 0,0006$) e intervalo entre o início da mobilização e o pico de células CD 34+ no sangue periférico ($P < 0,0001$). Idade, sexo, atividade da doença e envolvimento medular ao início da mobilização, tratamento prévio com radioterapia e exposição a análogos da platina não mostraram correlação significativa na resposta à mobilização. Após análise multivariada, as variáveis que permaneceram associadas com insucesso na mobilização foram: diagnóstico ($P = 0,0232$), número prévio de ciclos da quimioterapia ($P = 0,0167$), tratamento prévio com mitoxantrone ($P = 0,0285$) e contagem de plaquetas pré-mobilização $< 150.000/\text{mm}^3$ ($P = 0,0423$). **Conclusão:** A carga cumulativa de quimioterapia administrada, exposição prévia à mitoxantrone, contagem de plaquetas pré-mobilização e diagnóstico foram os fatores independentes relacionados com a falha na resposta à mobilização. Os achados obtidos podem auxiliar no reconhecimento de pacientes de risco para resposta ruim à mobilização e permitir um planejamento alternativo ou mais agressivo no regime de mobilização para este grupo de pacientes.

Descritores: 1. Mobilização de células-tronco hematopoéticas 2. Transplante autólogo 3. Medula óssea 4. Fator estimulador de colônias de granulócito recombinante

ABSTRACT

Mendrone Junior A. *Collection of peripheral blood progenitor cell after administration of cyclophosphamide and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF): an analysis of 307 patients*. [Thesis] “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007”.

Inadequate stem cells mobilization is seen in 10-30% of patients undergoing autotransplantation for hematologic malignancies. Factors affecting peripheral blood progenitor cell (PBSC) mobilization have not been clearly established. We retrospectively reviewed the data of patients treated by autologous bone marrow transplantation (BMT) with the aim to identify factors associated with poor PBSC mobilization. **Design and Methods:** We evaluated 307 patients with different diagnoses, submitted to autologous BMT between April 2001 and April 2007. PBSC were collected following mobilization with cyclophosphamide (60-120 mg/kg of weight IV) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) (dose of 6-17 µg/kg of weight/day SC). Success in mobilization was defined when $\geq 2,0 \times 10^6$ CD34+ cells/(kg weight) could be collected from the peripheral blood with a maximum of three leukapheresis procedures. Clinical and laboratory parameters at the time of mobilization were analyzed for correlations with the number of CD34+ cells collected. **Results:** Two hundred and sixty patients (84.7%) presented success in mobilization. In this group, a median of 3.67 (2.0–46.0) CD34+ cells/(kg weight) was collected per patient in a median of 1(1-3) leukapheresis procedure. Poor response to mobilization was observed in 47 patients (15.3%): 24 (7.8%) were submitted to PBSC collection but didn't collected at least 2.0×10^6 CD34+ cells/(kg weight) with three leukapheresis procedures and 23 (7.5%) didn't reach an absolute number count of $10 \text{ CD34+ cells/mm}^3$ in the peripheral blood to start collection by leukapheresis. In univariate analysis poorer PBSC mobilization was associated with diagnosis ($P_p < 0.0001$), time interval from the diagnosis to mobilization ($P < 0.0001$), number of cycles of previous chemotherapy ($P = 0.0001$), previous

treatment with alkylating agents ($P = 0.0003$) and mitoxantrone ($P = 0.0006$), platelet count $<150.000/\text{mm}^3$ before mobilization ($P = 0.0006$) and interval between mobilization and peak of CD34+ cells in peripheral blood ($P < 0.0001$). No significant correlation was found with age, gender, disease status, marrow involvement at mobilization, prior radiation therapy and exposition to platin analogues. In the stepwise regression model, diagnosis ($P = 0.0232$), number of cycles of previous chemotherapy ($P = 0.0167$), previous treatment with mitoxantrone ($P = 0.0285$) and platelet count $<150.000/\text{mm}^3$ before mobilization ($P = 0.0423$) were found to be independent negative predictive factors for CD34+ cells mobilization.

Conclusion: Cumulative load of chemotherapy, exposition to Mitoxantrone, platelet count just prior to mobilization and diagnosis were independent factors related to poor progenitor cells mobilization. These results could help in the previously recognition of patients at risk for poor or no response to mobilization and allow to plan an alternative or more aggressive regimen for this group of patients.

Key-words: 1.Hematopoietic stem cell mobilization 2. Autologous transplantation
3. Bone marrow 4. Granulocyte colony stimulating factor recombinant

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A infusão de células progenitoras hematopoéticas (CPH) autógenas tem sido amplamente utilizada para resgate da função hematopoética após administração de altas doses de quimioterapia mieloablativa (Stiff et al., 2000). Em decorrência da facilidade para sua obtenção e do menor tempo para reconstituição hematopoética observada com CPH circulantes, nos últimos anos, o sangue periférico tem progressivamente substituído a medula óssea como fonte de progenitores hematopoéticos para o transplante autogênico de medula óssea (To et al., 1997; Gratwohl et al., 2002; Arai, Kingemann, 2003).

As células progenitoras hematopoéticas são clinicamente caracterizadas por meio da expressão do antígeno CD34, uma glicofosfoproteína transmembrana cuja função parece estar relacionada com adesão/localização celular. Em transplantes autogênicos, o tempo para enxertia hematopoética, após terapia mieloablativa, está diretamente relacionado com o número de células CD34⁺ infundidas (To et al., 1997). Na maioria desses transplantes, a infusão de um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34⁺/(kg de peso) é suficiente para que a enxertia hematológica ocorra em 10-12 dias (Siena et al., 2000). A administração de doses superiores a $5,0 \times 10^6$ células CD34⁺/(kg de peso) proporciona um incremento ainda maior na velocidade de recuperação hematológica, especialmente de plaquetas (Sola et al., 1999). Inversamente, doses inferiores a $1,0 \times 10^6$ células CD34⁺/(kg de peso) geralmente resultam em retardo na recuperação de neutrófilos e, em alguns pacientes,

a recuperação hematopoética completa poderá não ocorrer (Weaver et al., 1997a). Por esta razão, o número de CPH coletadas tem importância fundamental no resultado do transplante autogênico.

Em condições basais, a quase totalidade das CPH se encontra na medula óssea. Apenas duas, em cada 100.000 células mononucleares do sangue periférico, são CPH (Kanz, Brugger, 1999). Para coletar um número suficiente de células do sangue periférico para a realização de um transplante autogênico, as CPH devem ser recrutadas da medula óssea para a circulação. Este processo, habitualmente denominado ‘mobilização’, pode ser clinicamente induzido em humanos mediante administração de agentes quimioterápicos mielossupressores como a ciclofosfamida e o etoposide, da administração de fatores de crescimento hematopoéticos como o G-CSF e o GM-CSF ou com a administração combinada de ambos (Kessinger et al., 1986; To et al., 1990; Reddy, 2005). Em transplantes autogênicos, a administração conjunta de quimioterapia mielossupressora e fatores de crescimento hematopoéticos tem sido a abordagem mais comumente utilizada para mobilização de CPH (Fruehauf, Seggewiss, 2003). Esta abordagem é capaz de promover um incremento de CPH no sangue periférico maior do que a administração isolada de ambos (Lane, 1995) e ainda reduzir o risco de contaminação do produto coletado por células tumorais.

De acordo com estudos prévios, no entanto, 10-30% dos pacientes com doenças onco-hematológicas, candidatos a transplante autogênico de células progenitoras hematopoéticas submetidos à mobilização de CPH com administração

seqüencial de quimioterapia mielossupressora e citocinas, não apresentam resposta adequada ao regime mobilizador (Hui, To, 1999; Kuittinen et al., 2004), e resulta em coleta de um número insuficiente de células do sangue periférico para a realização do transplante.

A identificação prévia de pacientes de risco para resposta ruim ao regime de mobilização, tem grande importância clínica para que se possa estabelecer uma estratégia individual mais agressiva ou alternativa de mobilização neste grupo de pacientes. Vários relatos da literatura têm sido publicados com o objetivo de identificar variáveis que influenciam a resposta à mobilização (Bensinger et al., 1995; Ketterer et al., 1998; Morris et al., 2003). Das variáveis analisadas, a única que tem convergido opinião dos autores quanto à sua influência negativa na mobilização de CPH, é a carga de drogas citotóxicas administrada previamente ao regime mobilizador. Outros fatores analisados como sexo, idade, classes específicas de drogas, radioterapia, etc., apresentaram resultados discordantes. A não concordância nesses resultados decorre, principalmente, de diferenças nas características dos pacientes incluídos nas análises, da utilização de múltiplos regimes de mobilização em um mesmo estudo, de variações na definição de falência ou resposta à mobilização e/ou do pequeno número de pacientes analisados (Ford et al., 2004a; Pastore et al., 2004; Pavone et al., 2006).

Este é um estudo observacional que permitiu analisar, retrospectivamente, a resposta à mobilização de CPH após a administração seqüencial de ciclofosfamida e doses convencionais do fator estimulador de colônias de granulócitos, em 307

pacientes submetidos a transplante autogênico de células progenitoras hematopoéticas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1. Identificar os fatores preditivos relacionados com resposta ruim ao regime de mobilização de células progenitoras hematopoéticas, em pacientes submetidos a transplante autogênico de medula óssea.
2. Avaliar se a resposta ao regime de mobilização de células progenitoras hematopoéticas pode ser um fator prognóstico independente em pacientes submetidos a transplante autogênico de medula óssea.
3. Avaliar as correlações entre os parâmetros do sangue periférico pré-leucaférese: número absoluto de células CD34+ (/mm³), porcentagem de células CD34+ e número de leucócitos (/mm³) com o número de células CD34+ x 10⁶/(kg de peso) no produto coletado por leucaférese.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Transplante de células progenitoras hematopoéticas de sangue periférico

O transplante de medula óssea (TMO) baseia-se na infusão intravenosa (IV) de células progenitoras hematopoéticas com o objetivo de corrigir um defeito qualitativo ou quantitativo da medula óssea. Pode ser classificado em singênico, alogênico ou autogênico. No TMO singênico, o doador das células progenitoras e o paciente são gêmeos univitelinos. No alogênico, as CPH são coletadas, preferencialmente, de um doador que apresente compatibilidade com os antígenos leucocitários humanos (HLA) do paciente. O transplante autogênico, autógeno ou autoplástico envolve a infusão de células progenitoras do próprio paciente, coletadas em uma etapa anterior. A fonte das células progenitoras hematopoéticas para o transplante pode ser a própria medula óssea, o sangue periférico ou o sangue de cordão umbilical. Ocasionalmente, a combinação das duas primeiras tem sido utilizada.

O transplante de medula óssea representa uma terapia eficaz para grande variedade de doenças hematológicas, oncológicas e imunológicas (Tabela 1) (Jansen et al., 2005). Para muitas destas doenças, é considerado o tratamento de escolha (primeira linha); em outras, é utilizado como terapia de segunda linha quando não existe resposta à terapia convencional.

Tabela 1 - Indicações para transplante de medula óssea. (Jansen et al., 2005)

	Alogênico	Autogênico
Leucemias		
Mielóide aguda	+	+
Linfóide aguda	+	+
Mielóide crônica	+	±
Linfóide crônica	+	±
Linfomas		
Não Hodgkin	+	+
Doença de Hodgkin	±	+
Neoplasias de células plasmáticas		
Mieloma	+	+
Amiloidose	–	+
Tumores Sólidos		
Câncer de mama	±	+
Câncer de ovário	–	+
Câncer de testículo	–	+
Câncer renal	+	–
Câncer de cérebro	–	±
Neuroblastoma	±	+
Sarcoma de Ewing	–	+
Doenças da medula óssea		
Aplasia de Medula	+	–
Síndrome Mielodisplásica	+	±
Síndrome Mieloproliferativa	+	–
Doenças Congênitas		
Imunodeficiência	+	–
Wiskott Aldrich	+	–
Anemia de Fanconi	+	–

Continua

Continuação Tabela 1

Talassemia	+	—
Anemia Falciforme	±	—
Osteopetrose	+	—
Doença de depósito	±	—
Doenças Auto-Imunes		
Esclerodermia	+	+
Artrite Reumatóide	—	+
Lupus Eritematoso Sistêmico	±	+
Esclerose Múltipla	—	+

+ : indicações estabelecidas; ± : utilizado em pequeno número de pacientes; — : não indicado

Uma das primeiras publicações clínicas relacionadas com o transplante de medula óssea ocorreu em 1939, com o relato de um caso de anemia aplástica severa tratada com transfusões sanguíneas diárias e a infusão intravenosa de 18mL de medula óssea alogênica (Osgood et al., 1939). No entanto, a possibilidade de realização de transplante de medula, para recuperar a função hematopoética após a administração de terapia mieloablativa, começou realmente a ser cogitada e desenvolvida no final da década de 40. Naquele tempo, experimentos realizados em camundongos revelaram que animais expostos a doses letais de radiação gama podem recuperar a função hematopoética se houver proteção esplênica durante a irradiação, ou se células esplênicas forem injetadas na sequência por via intravenosa (Jacobson et al., 1949).

Em 1957, um grupo de pesquisadores liderado por E. Donnall Thomas, descreveu uma técnica para coleta e infusão de células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, e reportou seus resultados pioneiros sobre a infusão intravenosa de medula óssea alogênica em pacientes tratados com radioterapia e quimioterapia mieloablativas.

Em 1963, Mathé et al., reportaram pela primeira vez o caso de um paciente adulto portador de leucemia aguda, com longa sobrevida, após ter sido submetido a transplante alogênico de medula óssea.

A partir dos anos 70, com a evolução no conhecimento da técnica para obtenção e infusão de CPH, e na seleção do doador alogênico de medula, o TMO se expandiu gradualmente e se firmou como terapia para controle de várias doenças oncológicas e não oncológicas (Armitage, 1994). Até aquele momento, contudo, virtualmente todos os transplantes realizados em humanos utilizavam a medula óssea como fonte de CPH (Micklem et al., 1975).

A presença de células progenitoras no sangue periférico foi pioneiramente postulada por Maximow¹, em 1909, o qual referiu que um pequeno número de células dentro da população de linfócitos do sangue apresenta capacidade de originar outras células maduras do sistema hematopoético; ou, pelo menos, é capaz de readquirir esta característica. Ele chamou estas células de “gemeinsame Stamzellen”

¹ Maximow A. Der lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedene Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematol.* (Leipzig) 8:125-41, 1909 (isto veio do final da página anterior) Não sei como retornar.

(Jansen et al., 2002). Durante as décadas seguintes, no entanto, pouca atenção foi dada para confirmar ou explicar este conceito (Santos, 1983).

Em 1962, Joan Goodman e George Hodgson apresentaram evidências definitivas da presença de CPH no sangue periférico, ao obter recuperação hematopoética completa com a infusão de células coletadas da circulação periférica em camundongos submetidos à quimioterapia mieloablativa.

Em 1964, Cavins et al. obtiveram os mesmos resultados com cães. Após irradiação corporal total (TBI), 09 cães receberam infusões IV de leucócitos autogênicos coletados previamente e estocados sob temperatura de 80 graus Celsius negativos. Dos animais estudados, três apresentaram regeneração medular. Os autores concluíram que o sangue periférico de cães contém células capazes de restaurar a função medular.

Em 1971, McCredie et al. relataram que o sangue periférico de humanos apresenta células formadoras de colônias com capacidade proliferativa *in vitro* e que estas células podem ser coletadas por meio de separadores celulares.

Calvo et al. (1976) ao utilizar um modelo experimental, documentaram que as células progenitoras obtidas de sangue periférico, poderiam reconstituir a função hematopoética em longo prazo em animais previamente irradiados, exatamente como as CPH obtidas da medula óssea. Paralelamente com a publicação destes relatos, foi alcançado um grande progresso no conhecimento da prática de criopreservação de

células mononucleares – técnica de congelamento celular, destinada a garantir máxima integridade da membrana da célula durante o seu resfriamento e descongelamento, e no desenvolvimento de separadores celulares utilizados para realização de leucaférese – procedimento para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (Körbling et al., 1980). Estes avanços favoreceram e impulsionaram o surgimento de estudos com transplante autogênico de medula óssea ao utilizar o sangue periférico como fonte de CPH.

Em 1981, Körbling et al. descreveram o que pode ter sido o primeiro caso de recuperação hematopoética em um paciente com leucemia mielóide crônica, submetido a transplante autogênico de medula óssea, ao utilizarem células mononucleares normais de sangue periférico. Estas células foram obtidas do sangue por leucaférese e criopreservadas para serem infundidas posteriormente, após o regime de condicionamento.

Em 1986, Kessinger et al. (1986) relataram pela primeira vez, a reconstituição hematopoética completa em humanos após transplante autogênico com aplicação de células progenitoras mobilizadas de sangue periférico. No mesmo ano, Reiffers et al. (1986) relataram um caso de leucemia aguda não linfocítica, em primeira recaída, tratada com transplante autogênico com células progenitoras de sangue periférico coletadas previamente por leucaférese e Körbling et al. (1986) publicaram um artigo que relatou um caso de Linfoma de Burkitt em remissão completa, também tratado com transplante autogênico, em que a fonte de CPH foi o sangue periférico. Nesses relatos, os pacientes apresentaram rápida reconstituição hematopoética.

Em 1989, o primeiro transplante alogênico com células progenitoras de sangue periférico depletadas de linfócitos T foi realizado, pois o doador recusou ser submetido ao processo de coleta de CPH da medula óssea. A enxertia das três linhagens hematopoéticas foi observada 27 dias após o transplante. Estudos citogenéticos revelaram que a medula óssea e o sangue periférico do receptor foram repopularizados exclusivamente por células do doador (Kessinger et al., 1989).

Apesar destes resultados iniciais animadores com a aplicação de CPH do sangue periférico em transplantes autogênicos e alogênicos, dois questionamentos ainda eram feitos com relação ao produto coletado de sangue periférico: a) entre as células circulantes havia uma população com capacidade de manter a enxertia medular em longo prazo?; b) pelo fato das células presentes no sangue se encontrarem fora do microambiente medular, não estariam em fase de degeneração celular? (Micklem et al., 1975).

Com a observação de que as CPH do sangue periférico podem reconstituir a hematopoese em longo prazo (Hass et al., 1995; Schmitz et al., 2006), as dúvidas foram definitivamente dirimidas e o sangue periférico substituiu progressivamente a medula óssea para obtenção de CPH em transplantes autogênicos e alogênicos. Em 1994, 65% dos transplantes autogênicos e 5% dos transplantes alogênicos registrados pelo *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) foram realizados com CPH de sangue periférico (Gratwohl et al., 1996). Em 2005, em 98% dos transplantes autogênicos e em 74% dos transplantes alogênicos realizados na Europa, foi usado o sangue periférico como fonte de CPH (Gratwohl et al., 2002;

Gratwohl, 2004; Gratwohl et al., 2007).

3.2 Identificação e quantificação das CPH

Todas as células maduras do sangue são derivadas da célula-tronco hematopoética. Esta célula apresenta duas características comuns a todas as células-tronco órgão-específicas: a) capacidade de auto-renovação, que permite que o compartimento de células-tronco seja mantido ao longo do tempo; e, b) capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares (Weissman, 2000). As células que se originam da diferenciação da célula-tronco hematopoética são denominadas células progenitoras hematopoéticas. As CPH perdem o potencial de auto-renovação, são comprometidas com uma das vias de diferenciação celular e não podem mais reverter ou paralisar o processo de diferenciação (Loebinger, Janes, 2007). A partir das CPH, a diferenciação celular passa por vários estádios intermediários, terminando com a origem das células do sangue funcionalmente maduras (Figura 1).

A hematopoese, portanto pode ser vista como um sistema hierárquico que tem início na célula hematopoética pluripotente (célula-tronco) e termina com a formação de todas as células diferenciadas presentes no sangue periférico.

Figura 1 – Esquema simplificado da diferenciação das células hematopoéticas.

Alguns métodos têm sido utilizados para identificar e quantificar células-tronco e células progenitoras hematopoéticas. Por não apresentarem distinção morfológica, estas células foram primeiramente identificadas pelos seus aspectos funcionais. Ao utilizar ensaios *in vitro* de cultura celular, é possível quantificar as unidades formadoras de colônias (CFU), as quais correspondem às células progenitoras hematopoéticas. Subtipos destas CFU incluem unidades formadoras de colônias de granulócitos-eritrócitos-monócitos-megacariócitos (CFU-GEMM), unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos (CFU-GM) e unidades

formadoras de colônias e *burst* eritróide (BFU-E e CFU-E). No entanto, os ensaios clonogênicos requerem semanas de cultura celular em ambiente estéril, consomem tempo até a obtenção do resultado e são de difícil padronização.

As células do organismo apresentam em sua superfície, marcadores moleculares que permitem identificar a linhagem à qual pertencem e os seus diferentes estágios de maturação. Estas proteínas antigênicas associadas com a diferenciação e maturação celular são classificadas como *Cluster of Differentiation* (CD) e podem ser detectadas por imunofenotipagem. A técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo é parcialmente automatizada, porém rápida, simples e de custo relativamente baixo, quando comparada com ensaios clonogênicos (Serke et al., 1998).

O CD34 é uma glicofosfoproteína transmembrana expressa nas células-tronco e nos estágios mais precoces de diferenciação dos progenitores hematopoéticos, porém ausente nas células maduras do sangue. A identificação por imunofenotipagem de células que apresentam o antígeno CD34 na sua superfície como marcador de células progenitoras hematopoéticas, rapidamente substituiu os ensaios de cultura celular (Siena et al., 1991). Embora as células CD34 positivas (CD34+) compreendam somente 1-3% das células mononucleares da medula óssea, é nesta população celular que se encontram todos os precursores linfohematopoéticos. Em humanos, isto pode ser evidenciado pelo achado que as células CD34+ purificadas da medula óssea podem reconstituir a hematopoese após terapia mieloablativa (Krause et al., 1996).

O antígeno CD34 também é expresso em células endoteliais de pequenos vasos e fibroblastos embrionários. Apesar da sua importância como marcador de células tronco/progenitoras hematopoéticas, a função do CD34 não é totalmente conhecida. Experimentos indicam que a expressão do CD34 nas células endoteliais pode ter papel na adesão e *homing* de leucócitos durante o processo inflamatório. Nas células progenitoras, provavelmente está relacionado ao fenômeno de localização/adesão destas células ao estroma medular e à manutenção do fenótipo precursor (Krause et al., 1996).

O número de células CD34⁺ tem sido utilizado como um bom marcador preditivo do rendimento do produto de CPH coletado de sangue periférico para transplantes e apresenta ótima correlação com o número de CFU obtido em ensaios funcionais (D'Hondt et al., 1997). Jansen et al. (2007) estudaram o efeito da dose de células CD34⁺ e de CFU-GM na recuperação hematopoética em 323 pacientes submetidos a transplante autogênico com células de sangue periférico. Tanto o número de células CD34⁺ quanto o número de CFU-GM apresentaram boa correlação com a recuperação hematopoética. Os autores concluíram que a determinação do CFU-GM não adiciona valor preditivo à determinação do número de células CD34⁺ como marcador de CPH.

Estas observações, associadas à maior facilidade para realização da imunofenotipagem em relação à cultura celular e maior rapidez para obtenção do resultado, permitiram que a quantificação do número de células que expressa o antígeno CD34 na sua superfície, substituísse rapidamente os ensaios clonogênicos

funcionais. A imunofenotipagem se tornou o parâmetro clínico mais utilizado nos dias de hoje, para identificar as CPH e estimar a capacidade funcional de enxertos autogênicos e alogênicos coletados do sangue periférico.

3.3 Mobilização de CPH

A quase totalidade das células progenitoras hematopoéticas reside na medula óssea, em um microambiente complexo e altamente organizado. Em condições basais, apenas um pequeno número destas células é liberado para o sangue periférico. O número de células CD34+, encontrado no sangue, varia de 1 célula/mm³ a 5 células/mm³ (Jansen et al., 2005). Com este número tão baixo de células circulantes, um grande volume de sangue necessitaria ser processado durante a coleta para que se possa obter uma dose adequada de células progenitoras e realizar um transplante autogênico. Certamente isto não seria prático, demoraria muito tempo e o custo seria proibitivo.

Felizmente, nos últimos anos, os mecanismos capazes de estimular a saída de CPH de o compartimento medular têm sido reconhecidos em humanos, com conseqüente aumento do número destas células no sangue circulante. Este recrutamento de CPH do ambiente medular para a periferia é denominado **mobilização**.

Os regimes de mobilização de CPH podem ser divididos em três grupos: a)

administração isolada de quimioterapia mielossupressora; b) administração isolada de citocinas; e, c) administração combinada ou seqüencial de quimioterapia mielossupressora e citocinas.

3.3.1 Quimioterapia mielossupressora

A administração de drogas quimioterápicas foi o primeiro mecanismo descrito de mobilização de CPH. Em 1976, Richman et al. observaram um aumento no número circulante de células progenitoras hematopoéticas após tratamento com quimioterapia mielossupressora. Os autores evidenciaram que, durante a fase de recuperação medular após quimioterapia, ocorria um aumento do número de CPH no sangue periférico. A coleta e infusão da fração de células mononucleares do sangue, enriquecidas com CPH, é capaz de promover a recuperação hematopoética.

Em 1986, Kessinger et al. relataram pela primeira vez em humanos, a reconstituição hematopoética completa ao utilizar células mobilizadas de sangue periférico no tratamento de duas pacientes com câncer de mama metastático e envolvimento medular.

Em 1990, To et al. relataram o sucesso na mobilização de CPH com a administração isolada de 4g/m^2 de ciclofosfamida, em dose única, em 30 pacientes com diagnóstico de Mieloma múltiplo, Linfoma ou tumor sólido. Os autores demonstraram que o agente quimioterápico utilizado foi capaz de promover um

aumento de até 15 vezes no número de CFU-GM circulante, com pico de CPH que, em média, ocorreu 16 dias após a administração da ciclofosfamida, geralmente coincidindo com a contagem de neutrófilos $\geq 1,0 \times 10^9$ neutrófilos/L.

Atualmente, a ciclofosfamida na dose de 1g/m^2 a 7g/m^2 , administrada isoladamente ou em combinação com outros quimioterápicos mielossupressores, tem sido amplamente utilizada como agente mobilizador (Fruechauf, Seggewiss, 2003). Outras combinações de drogas quimioterápicas mielossupressoras também têm sido utilizadas com este mesmo objetivo (Tarella et al., 2002a; Lefrère et al., 2006; De Latour et al., 2007).

As drogas quimioterápicas produzem mielossupressão transitória, porém profunda, com leucopenia intensa que ocorre entre o 7^o e o 14^o dia de sua administração. Após esta fase, tipicamente se segue um rápido ressurgimento dos leucócitos na circulação. É neste momento, durante o aumento rebote da leucometria, que o número de células progenitoras hematopoéticas começa a aumentar no sangue periférico. Quando a contagem de leucócitos exceder 1×10^9 leucócitos/L, a porcentagem de células CD34+ em relação ao número total de leucócitos provavelmente ultrapassará 1%. O número absoluto de células CD34+, no entanto, continua aumentando nos 2 - 4 dias subseqüentes e provavelmente atinja seu máximo quando a leucometria chegar a 5×10^9 leucócitos/L (Williams et al., 1998; Lane, 1995).

Alguns autores observaram uma correlação positiva entre a intensidade do

tratamento mielossupressor e o poder de mobilização de CPH. Embora esquemas de mobilização constituídos da administração isolada de quimioterapia não sejam mais utilizados desde a adição de citocinas aos regimes de recrutamento de CPH, a observação de que o aumento da dose de quimioterapia se correlaciona com melhor mobilização, pode ser utilizado para desenhar estratégias de remobilização em pacientes com respostas prévias ruins (Kessinger, Scharp, 2003; Jansen et al., 2005).

A principal desvantagem da administração de quimioterápicos, como agentes mobilizadores de CPH, está nos efeitos adversos relacionados às drogas. Além do risco de toxicidade órgão-específica, como cistite hemorrágica e cardiomiopatia no caso da administração de ciclofosfamida, ainda existe o risco de sangramento e de infecção por causa das citopenias transitórias produzidas.

3.3.2 Citocinas

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular que regulam a imunidade, a hematopoese e a resposta inflamatória local e sistêmica. A citocina liga-se a um receptor específico da membrana celular e por meio de um segundo mensageiro, frequentemente a tirosina-quinase, modificam a expressão gênica e a função da célula alvo, e induzem a proliferação, ativação e/ou secreção de moléculas efetoras.

Desde a descoberta e o desenvolvimento clínico do fator humano estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), e do fator humano estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (Welte et al., 1985), o uso de citocinas para

mobilização de CPH tem se tornado rotineiro. Estas citocinas produzem uma hiperplasia medular da série granulocítica, com expansão de células mielóides jovens e maduras.

A administração isolada de citocinas é o regime de escolha para a mobilização de CPH em doadores para transplante alogênico. Em um estudo randomizado com 18 doadores, Lane et al. (1995) observaram que a administração subcutânea de G-CSF (10µg/kg/dia) ou a combinação de ambos (5µg/kg/dia, de cada citocina), ocasionou um aumento de até 30 vezes no número de células CD34+ no sangue periférico em doadores voluntários. Esta resposta atingiu o valor máximo entre o 4^o e 5^o dia após o início da administração. Doses diárias maiores de G-CSF (até 50µg/kg/dia) também têm sido utilizadas em alguns programas de mobilização (Weaver et al., 1998; Kobbe et al., 1999).

Em transplantes autogênicos, o uso isolado de G-CSF (Filgrastima; Amgen, Thousands Oaks, CA, USA) ou GM-CSF (Sargramostima; Immunex, Seattle, WA, USA) parece apresentar menor eficiência na mobilização de CPH do que a administração combinada de citocinas e quimioterapia mielossupressora (Russel et al., 1998; Narayanasami et al., 2001). Em razão da vantagem de não expor os pacientes aos riscos da quimioterapia, esta estratégia também tem sido indicada por alguns autores para os candidatos a transplante autogênico, especialmente na remobilização de pacientes que não apresentaram resposta à terapia combinada de quimioterapia e citocinas (Fraipont et al., 2000).

Atualmente, graças ao seu poder de mobilização, a citocina G-CSF é utilizada com maior frequência nos regimes de mobilização de CPH em transplantes autogênicos e alogênicos. A toxicidade da mesma tem sido definida, principalmente, em estudos com doadores alogênicos. Aproximadamente 85% dos doadores desenvolvem algum tipo de sintoma durante a administração de G-CSF e os mais frequentes são dor óssea e fadiga. No entanto, estes efeitos adversos são, na maioria das vezes, de natureza leve, toleráveis e melhoram com a administração de medicação sintomática. Raramente é necessário reduzir a dose ou suspender a terapia por causa da ocorrência de efeitos adversos (Grigg et al., 1995).

Murata et al. (1999) analisaram os efeitos adversos da administração de G-CSF, na dose média de 9,7µg/kg/dia por 4-6 dias, em 94 doadores alogênicos. Os sintomas encontrados com maior frequência foram: dor óssea (71%); fadiga (33%); cefaléia (28%); insônia (14%); anorexia (11%); e, náuseas e/ou vômitos (11%). A maioria dos efeitos foi de grau leve e desapareceu após o término da administração do G-CSF.

Esplenomegalia e raros casos de ruptura esplênica espontânea têm sido reportados após a mobilização de CPH com G-CSF (Balaguer et al., 2004). Nestes casos, o órgão removido na cirurgia mostrou extensa hematopoese extramedular à microscopia (Stroncek et al., 2003). Dados do *Spanish National Donor Registry* permitem estimar o risco de ruptura esplênica espontânea de 1:1240 quando é administrado o G-CSF em doadores e são concordantes com os dados anteriores de

que o risco, nos primeiros dias que se seguem à interrupção da administração da droga, é maior (Balaguer et al., 2004).

Também foi descrito que o G-CSF pode desencadear crise falciforme em pacientes portadores de doença falciforme (Adler et al., 2001) e que a administração de G-CSF induz um estado transitório e reversível de hipercoagulabilidade. Por esta razão, deve ser administrado com cuidado em doadores e pacientes que tenham história de trombose venosa, doença vascular periférica, infarto agudo do miocárdio ou acidente vascular cerebral (Gutierrez-Delgado, Bensinger, 2001).

Mesmo que a segurança em longo prazo, quanto à administração de fatores de crescimento hematopoéticos como agentes mobilizadores em doadores sadios, ainda não esteja totalmente estabelecida, nenhum efeito adverso grave atribuível à G-CSF, incluindo leucemia aguda, foi relatado até o momento (Anderlini et al., 2002).

Por apresentar menor potencial mobilizador e maior incidência de efeitos adversos, o GM-CSF é utilizado com menor frequência do que o G-CSF como agente isolado (Bolwell et al., 1994).

Outras citocinas com capacidade de recrutamento de CPH da medula óssea para o sangue periférico têm sido reconhecidas (Gajewski et al., 2002). Entre elas a trombopoietina recombinante humana (rHuTPO), interleucina IL-8, *Stem Cell Factor* recombinante humano (rHuSCF) e a quimiocina AMD-3100.

Linker et al. (2003) realizaram um estudo randomizado envolvendo 134 pacientes com câncer, submetidos à mobilização para transplante de medula óssea autogênico. Para mobilização de CPH, os pacientes foram escolhidos ao acaso para receber rHuTPO associado ao G-CSF (rHuTPO + G-CSF), ou associado à um placebo (rHuTPO + placebo), ou apenas G-CSF. Dos pacientes que receberam rHuTPO + G-CSF durante a mobilização, foi possível coletar um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg em 92% dos pacientes e um número superior a $5,0 \times 10^6$ células CD34+/kg, em 73%. Por outro lado um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/kg foi coletado em 75% ($P = 0,050$) e 46% ($P = 0,041$) dos pacientes dos grupos que receberam rHuTPO + placebo, e G-CSF somente, respectivamente. Os autores concluíram que a associação de rHuTPO ao G-CSF aumenta o número de células CD34+ coletadas e diminui o número de leucaféreses necessário para obtenção da quantidade mínima de CPH.

A IL-8 pertence à família das citocinas envolvidas na quimiotaxia e ativação de neutrófilos. É produzida por uma variedade de células incluindo monócitos, neutrófilos e células endoteliais. A administração de IL-8 produz granulocitose e liberação de células imaturas da linhagem granulocítica para a circulação. Laterveer et al. (1995) investigou a capacidade da IL-8 na mobilização de CPH em camundongos e observou que esta citocina é capaz de mobilizar CPH em 30-60 minutos após a sua administração.

O rHuSCF é uma citocina com capacidade de estimular a proliferação de células progenitoras hematopoéticas. As evidências de estudos *in vitro* sugerem

sinergismo entre rHuSCF e outras citocinas com potencial proliferativo hematopoético, como o G-CSF e o GM-CSF. A administração de rHuSCF associado com G-CSF, em pacientes intensivamente tratados com quimioterapia, tem sido reportada (Stiff et al., 2000). Dawson et al. (2005), em um estudo não controlado, relatou sucesso na mobilização de CPH em 48 pacientes que apresentaram falha anterior com G-CSF associado ou não a agentes quimioterápicos, utilizando rHuSCF concomitantemente com G-CSF.

As quimiocinas são citocinas que agem como potentes mediadores da inflamação pela habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos. O AMD3100 (AnorMed, Vancouver, BC, Canadá) é uma quimiocina que compete reversivelmente com o receptor CXCR4, sítio de ligação das CPH à matriz extracelular medular. Este composto foi originalmente testado para uso clínico no tratamento da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Durante sua administração, os pacientes apresentaram leucocitose com aumento do número de células CD34⁺ no sangue periférico (Liles et al., 2003). Posteriormente foi observado que pacientes com câncer também apresentaram aumento do número circulante de células CD34⁺ após a administração de AMD3100 (Devine et al., 2004). O tratamento com AMD3100 provavelmente não aumenta o número total de células CD34⁺ do organismo, mas sim a liberação destas células da medula óssea para o sangue periférico. Estudos clínicos estão em andamento para avaliar a eficácia e segurança desta droga, administrada isoladamente ou em combinação com G-CSF, como agente mobilizador.

Flomenberg et al. (2005) observaram que a administração combinada de AMD3100 e G-CSF, em transplantes autogênicos, é segura, eficaz e superior ao uso solado de G-CSF para a mobilização de CPH; e sugerem que a adição de AMD3100 aos regimes de mobilização pode ser clinicamente benéfica.

Estes novos agentes representam promessas importantes na resposta à mobilização, especialmente em pacientes que não respondem aos regimes habituais.

3.3.3 Citocinas e quimioterapia mielossupressora

A combinação de quimioterapia e fatores de crescimento hematopoéticos tem sido utilizada como regime de mobilização com bons resultados, na maioria dos pacientes candidatos a transplante autogênico de medula óssea.

Socinski et al. (1998) foram os primeiros a demonstrar que a administração combinada de GM-CSF com quimioterapia mielossupressora teria maior capacidade de aumentar o número de CFU-GM no sangue periférico do que a administração isolada de GM-CSF ou de quimioterapia.

Em 1989, o grupo liderado por Bonnadona também encontrou um aumento pronunciado de CFU-GM no sangue periférico de pacientes após a administração de ciclofosfamida seguida de doses diárias de GM-CSF (Gianni et al., 1989).

A administração de fator de crescimento hematopoético, durante a fase de recuperação hematológica pós-quimioterapia mielossupressora, é capaz de promover um aumento do número de CPH circulantes de até 100 vezes em relação aos valores basais (Demirer et al., 1996; De Latour et al., 2007). Contudo, por causa do aumento da toxicidade resultante dos regimes combinados de quimioterapia, uma questão clinicamente importante a ser respondida sobre a mobilização em transplantes autogênicos é se tal associação é preferível à administração isolada de citocinas.

Muito embora a eficácia dos diferentes regimes de mobilização seja difícil de ser comparada, principalmente em razão da considerável heterogeneidade nas características dos pacientes. Estudos têm demonstrado que a administração de citocinas, em conjunto com a quimioterapia, promove um aumento maior no número de CPH do que a administração isolada de fatores de crescimento hematopoéticos (Elias et al., 1992; Schwartzberg et al., 1992; Bensinger et al., 1995; Koç et al., 2000).

Em um estudo controlado, 24 pacientes com câncer de mama avançado foram inicialmente mobilizados com administração de G-CSF (10µg/kg/dia, SC durante quatro dias) e submetidos à coleta de células progenitoras de sangue periférico. Após uma semana, uma segunda mobilização foi feita com ciclofosfamida [(4000mg/m² IV - dose total) + etoposide (400mg/m² IV - dose total) + G-CSF (10µg/kg/dia, SC)], com nova coleta de células progenitoras de sangue periférico. Apesar do custo e toxicidade mais elevados, a média diária de células CD34+ coletada foi quase seis vezes maior após a terapia combinada de mobilização: 57% dos pacientes atingiram

$5,0 \times 10^6$ células CD34+/kg, com uma única coleta após mobilização combinada, quando comparado com apenas 13% dos pacientes após mobilização com terapia isolada com G-CSF (Akard et al., 1999).

Koç et al. (2000) realizaram um estudo em que 50 pacientes foram randomizados em dois grupos. Cada grupo recebeu um dos regimes de mobilização seguintes: (a) ciclofosfamida ($4,0 \text{ g/m}^2$ IV no dia 1) associada a G-CSF ($10 \mu\text{g/kg/dia}$ SC a partir do terceiro dia de mobilização). Quando a leucometria atingiu $1,0 \times 10^9$ leucócitos/L, os pacientes foram submetidos a dois procedimentos de leucaférese para coleta de CPH; (b) GM-CSF ($250 \mu\text{g/m}^2/\text{dia}$, SC nos dias 01 a 12), associado a G-CSF ($10 \mu\text{g/kg/dia}$, SC nos dias 07-12). No 11^o e 12^o dias da mobilização, os pacientes foram submetidos a dois procedimentos de leucaférese para coleta de CPH. Após um período mínimo de duas semanas após a última leucaférese, os pacientes foram trocados de grupo e submetidos à nova mobilização de coleta de progenitores hematopoéticos de sangue periférico. O conteúdo de CPH nos produtos obtidos da leucaférese, a toxicidade e os custos dos regimes de mobilização foram comparados. O regime baseado na associação de G-CSF com quimioterapia, resultou em maior rendimento de BFU-E, CFU-GM e de células CD34+ do que o regime baseado na administração isolada de citocinas ($P < 0,01$). A probabilidade de coletar um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso), considerando a soma dos resultados obtidos nos dois procedimentos de leucaférese, foi de 50% e de 90% com o regime sem quimioterapia e com quimioterapia associada, respectivamente. O regime, baseado na associação de quimioterapia e citocinas, apresentou maior toxicidade e maior custo do que o regime

no qual apenas fator de crescimento hematopoético foi administrado.

Estes estudos mostram que, apesar da maior toxicidade, os regimes de mobilização baseados na administração de G-CSF associado à quimioterapia, são mais eficazes na mobilização de células progenitoras hematopoéticas do que a administração isolada de fatores de crescimento hematopoéticos. O custo mais elevado, atribuível ao regime de citocinas associadas à quimioterapia, pode ser equilibrado pelo maior rendimento de células CD34⁺ em cada procedimento de leucaférese.

Nos esquemas combinados com quimioterapia, a administração do GM-CSF (250mg/m²/dia) é tão eficaz quanto à do G-CSF (10µg/kg/dia) no que se refere à capacidade de mobilização (Weaver et al., 2000), diferente da administração isolada de citocinas na qual o G-CSF é claramente superior ao GM-CSF (Ho et al., 1996).

3.3.4 Mecanismos de mobilização

Para entrar na circulação, as CPH devem migrar através da barreira vascular que separa o compartimento hematopoético e a circulação. A parede dos vasos sinusóides é formada por uma estrutura trilaminar composta de células endoteliais, membrana basal e uma camada de células adventícias. Estudos com microscopia eletrônica têm demonstrado que existem numerosos sítios no endotélio onde a membrana luminal e subluminal são fundidas, formando estruturas denominadas

fenestras. É por essas fenestras que as células hematopoéticas maduras e, provavelmente, as CPH migram da cavidade medular para o sangue periférico.

As interações com componentes da matriz extracelular são responsáveis pela adesão das CPH ao microambiente medular. As CPH expressam inúmeras moléculas de adesão celular incluindo: Receptor 4 de Quimiocinas (CXCR-4), *Very Late Antigen-4* (VLA4), c-kit, CD62L e CD44. Por outro lado, o estroma medular expressa ligantes cognatos para estas moléculas de adesão, como o Fator-1 Derivado da Célula Estromal (SDF-1), Molécula de Adesão-1 da Célula Vascular (VCAM-1), Kit Ligante (KL), Ligante-1 da P-Selectina (PSGL) e Ácido Hialurônico (HA). A mobilização de CPH é resultado de alterações funcionais na expressão das moléculas de adesão das CPH e na sua relação com células do estroma medular, osteoblastos e com outros componentes da matriz extracelular (Figura 2).

A administração de G-CSF, IL-8 ou ciclofosfamida é capaz de induzir a liberação de proteases na medula óssea como a Elastase de Neutrófilos (NE), Catepsina G (CG) e Metaloproteinase-9 da Matriz (MMP9). Estas proteases clivam várias moléculas de adesão, como o VCAM-1, SDF-1 e c-kit, desempenhando importante papel na mobilização de CPH (Nervi et al., 2006).

Estudos recentes sugerem ainda que o tratamento com G-CSF inibe a expressão de SDF-1 pelos osteoblastos, o qual representa o receptor cognato do CXCR-4. A diminuição resultante, na expressão de SDF-1 pelos osteoblastos induzida pelo G-CSF, também contribui para aumentar a mobilização de CPH (Semerad et al., 2005).

Figura 2 – Esquema simplificado do mecanismo de mobilização da CPH

3.4 Falta de resposta à mobilização

A resposta à terapia de mobilização é bastante variável e algumas vezes imprevisível. Pico no número de células CD34⁺ no sangue periférico durante a mobilização, número total de células CD34⁺ periféricas coletadas e número de leucaféreses necessárias para obter número mínimo de CPH para o transplante, são parâmetros que têm sido utilizados, isoladamente ou em conjunto, para definição de resposta ruim ou falta de resposta à mobilização de CPH.

Estudos têm revelado que 10–30% os pacientes portadores de neoplasias

hematológicas candidatos a transplante autogênico de medula óssea, terão resposta ruim ao regime de mobilização (Kuittinen et al., 2004). Entre os pacientes com Linfoma não Hodgkin, 21–48% apresentarão má resposta à mobilização com quimioterapia e G-CSF. Destes, em 16–33% não será possível coletar CPH do sangue periférico em número suficiente para a realização transplante autogênico (Sugrue et al., 2001).

Desde o relato de Kotasek et al., em 1992, sobre os fatores que afetaram a mobilização de CPH em 60 pacientes com diagnóstico de Mieloma múltiplo, Linfoma e tumores sólidos tratados com transplante autogênico de medula óssea, inúmeros relatos têm sido publicados sobre a avaliação da influência de parâmetros como: idade, sexo, diagnóstico, intensidade do tratamento prévio com quimioterapia e radioterapia, grau de fibrose e de envolvimento medular pela doença, intervalo de tempo após o último ciclo de quimioterapia e parâmetros hematológicos pré-coleta, na resposta a diferentes regimes de mobilização de CPH em pacientes com diagnósticos variados (Fruehauf, Seggewiss, 2003; Ikeda et al., 2004; Jansen et al., 2005; Nervi et al., 2006, Cottler-Fox, Lapidot, 2006).

Hass et al. (1994) avaliaram retrospectivamente os fatores que influenciaram a mobilização de CPH em 61 pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin e Linfoma não-Hodgkin, mobilizados com quimioterapia citotóxica e G-CSF. Os autores observaram que a intensidade do tratamento quimioterápico e a administração prévia de radioterapia, influenciaram na coleta. Parâmetros como idade, sexo, envolvimento da medula óssea e a atividade da doença durante a

mobilização, não tiveram relação significativa com o rendimento da coleta.

Shimazaki et al. (1995) analisaram 47 pacientes com doenças oncohematológicas, mobilizados com citosina arabinosideo, etoposide e G-CSF. Os autores observaram que a intensidade do tratamento prévio com quimioterapia e a idade dos pacientes influenciaram a resposta à mobilização.

Bensinger et al. (1995) analisaram os fatores que afetaram a coleta de células progenitoras periféricas em 243 pacientes portadores de doenças tumorais após regime de mobilização com G-CSF, ou com quimioterapia e G-CSF. Os autores observaram que ausência de envolvimento medular na mobilização, menor número de ciclos de quimioterapia e ausência de radioterapia pré-mobilização, estavam associados com maior rendimento de células CD34+.

Dreger et al. (1995) avaliaram, retrospectivamente, 96 pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin ou Linfoma não-Hodgkin de alto grau de malignidade, tratados com transplante autogênico de medula óssea. Dos pacientes analisados, 52 foram submetidos à mobilização (com quimioterapia e G-CSF ou somente com G-CSF) e coleta de CPH de sangue periférico, e 44 foram submetidos à coleta de CPH da medula óssea. Os autores observaram que a exposição prévia à radioterapia e a determinadas drogas quimioterápicas como carmustina e mefalano, influenciou de maneira negativa na resposta ao regime de mobilização.

Weaver et al. (1997) avaliaram a resposta à mobilização com ciclofosfamida

e etoposide, em 497 pacientes portadores de diversas doenças oncológicas, candidatos a tratamento com altas doses de quimioterapia e infusão de células progenitoras de sangue periférico. Nesta análise, a intensidade do tratamento quimioterápico prévio e contagem de plaquetas pré-mobilização foram as variáveis com associação significativa à resposta ruim. Os autores não encontraram correlação entre a idade, a radioterapia prévia e o envolvimento medular pelo tumor e a resposta à mobilização.

Com o objetivo de definir parâmetros que possam prever a resposta à mobilização e a velocidade de recuperação hematopoética após o transplante de medula óssea com CPH de sangue periférico, Watts et al. (1997) analisaram 101 pacientes com diagnóstico de Linfoma, mobilizados com ciclofosfamida e G-CSG, e submetidos a transplante autogênico de medula óssea. A relação entre o número de células progenitoras coletadas e idade, sexo, diagnóstico, radioterapia prévia e intervalo de tempo entre o último ciclo de quimioterapia e a mobilização, foi determinada por análise multivariada. Os autores também determinaram a relação entre todos esses fatores e o tempo de recuperação hematopoética. Concluíram que, dos fatores analisados, a radioterapia prévia foi o único parâmetro que teve influência significativa sobre a mobilização e que o tempo de recuperação hematopoética foi dependente do número de células progenitoras infundidas.

Drake et al. (1997) analisaram retrospectivamente 74 pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin (n = 25), Linfoma não-Hodgkin (n = 29), Mieloma múltiplo (n = 17) e Teratoma testicular (n = 3), submetidos a diferentes

regimes de mobilização, aplicando um sistema de escore, para quantificar a intensidade da terapia quimioterápica prévia administrada e analisar sua influência na resposta à mobilização. Os autores observaram que as drogas melfalano, carmustina, mecloretamina e lomustina tiveram um efeito negativo significativo na resposta à mobilização de CPH e que devem ser evitadas em pacientes candidatos a transplante autogênico de medula óssea.

Ketterer et al. (1998) apresentaram uma análise retrospectiva de mobilização de CPH em 200 pacientes com doenças linfoproliferativas, tratados com transplante autogênico de medula óssea e avaliaram a influência de variáveis relacionadas com o paciente e com o tratamento prévio, no rendimento da coleta de CPH. Os pacientes foram mobilizados com fatores de crescimento hematopoéticos (G-CSF ou GM-CSF) administrados isoladamente ou após diferentes esquemas de quimioterapia mieloablativa. Os autores encontraram que o tempo entre o diagnóstico da doença e a mobilização, a duração e o número prévio de regimes de quimioterapia, a exposição prolongada a agentes alquilantes e a fludarabina, a infiltração medular e a plaquetopenia no início da mobilização, isoladamente, influenciaram o rendimento da coleta. Entretanto, na análise multivariada, somente o número de ciclos de quimioterapia e a exposição à fludarabina tiveram influência na coleta.

Moskowitz et al. (1998) conduziram um estudo com o objetivo de identificar os fatores associados com resposta ruim à mobilização de células progenitoras, em 58 pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin (n = 47) e Linfoma não-Hodgkin (n = 11), submetidos à coleta de CPH após a mobilização com G-CSF,

administrado isoladamente (n = 19) ou em associação com quimioterapia (n = 39). Os autores constataram que a intensidade e o tipo de tratamento quimioterápico mielossupressor, administrado previamente, foi o único fator que teve influência significativa na resposta à mobilização.

Clark e Brammer (1998) analisaram o valor preditivo sobre a resposta à mobilização de um escore descrito por Drake et al. (1997) baseados no tratamento prévio com quimioterapia e radioterapia, em 99 pacientes submetidos a transplante autoplástico de medula óssea. De acordo com esta análise, a intensidade do tratamento prévio com quimioterapia e a administração de melfalano e carmustina, foram associadas com pior recuperação de CPH do sangue periférico e uma correlação negativa foi encontrada entre o escore utilizado e a resposta aos regimes de mobilização aplicados. Os autores concluíram que a utilização de um escore que sumarie o tratamento prévio com drogas quimioterápicas mielossupressoras e radioterapia pode ser útil para a identificação de pacientes que terão resposta ruim à mobilização. Ghandi et al. (1999), utilizaram o mesmo escore de Drake et al. em 57 pacientes com tumores não mielóides, submetidos à mobilização de CPH com um regime semelhante. Observaram, também, que a intensidade do tratamento prévio com quimioterapia e drogas como melfalano, carmustina e lomustina estão relacionadas com uma resposta pior à mobilização.

Fruehauf et al. (1999) avaliaram o valor preditivo do número de células CD34+ e de CFU-GM no sangue periférico, em condições basais, relacionado à resposta à mobilização de CPH, em 100 pacientes com tumores hematológicos e

tumores sólidos. Nos pacientes com doenças oncohematológicas, os autores encontraram boa correlação entre o número basal de células CD34+ e de CFU-GM no sangue periférico e o número de células CD34+ no produto de leucaférese. Concluíram, com 95% de probabilidade que este parâmetro pode ser utilizado como variável para prever quais pacientes apresentarão má resposta ao regime de mobilização.

Micallef et al. (2000) estudaram a resposta à mobilização de CPH após administração isolada de G-CSF, em 52 pacientes com diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin. Os autores consideraram boa resposta quando um número igual ou superior a $1,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) foi coletado do sangue periférico por leucaférese. Dos pacientes analisados, 37% não apresentaram resposta à mobilização. Os fatores correlacionados com resposta ruim à mobilização foram os seguintes: terapia prévia com fludarabina; envolvimento medular a qualquer momento antes da mobilização e diagnósticos histológicos de Linfoma linfoplasmocitóide; Linfoma das células do manto; Linfoma folicular; e, Linfoma linfocítico de pequenas células.

Canales et al. (2001) avaliaram 54 pacientes com Linfoma de Hodgkin mobilizados com G-CSF para identificar se os parâmetros como: sexo; idade; subtipo histológico; sintomas B ao diagnóstico; atividade da doença; quimioterapia e radioterapia prévias; intervalos entre o diagnóstico e último ciclo de quimioterapia; e, o início do regime mobilizador, influenciaram a resposta à mobilização. Resposta ruim foi relacionada apenas com intenso tratamento quimioterápico prévio. Radioterapia anterior não afetou de forma significativa o rendimento da coleta.

Carral et al. (2003) analisaram a resposta de 182 procedimentos de mobilização realizados em 145 pacientes com Leucemia mielóide aguda (n= 67) e neoplasias não mielóides (n = 78) submetidos a transplante autogênico de medula óssea. Os regimes de mobilização administrados foram: quimioterapia, G-CSF e quimioterapia com G-CSF. Menor número de CFU-GM foi coletado em pacientes com Leucemia mielóide aguda quando comparado com pacientes portadores de neoplasias não mielóides. A intensidade do tratamento quimioterápico pré-mobilização foi um fator preditivo do rendimento de células CD34+ neste grupo de pacientes.

Em 2003, Morris et al. relataram estudo sobre a coleta de progenitores hematopoéticos em 984 pacientes com Mieloma múltiplo (106 com idade ≥ 70 anos), submetidos à mobilização com G-CSF ou G-CSF+ quimioterapia. De acordo com os resultados obtidos na análise univariada, idade avançada, tempo de tratamento prévio com quimioterapia superior a 12 meses e contagem plaquetária pré-mobilização inferior a 200×10^9 plaquetas/L, se correlacionaram inversamente com o rendimento da coleta. Na análise multivariada, contudo, apenas a idade avançada (>70 anos) influenciou de forma significativa a resposta à mobilização.

Benekli et al. (2003) avaliaram a influência do tratamento prévio com rituximabe (MabThera[®], Roche), na mobilização de células progenitoras em 47 pacientes com Linfoma não-Hodgkin refratário ou recidivado. Dos pacientes que entraram na análise, 13 haviam recebido Rituximab nos seis meses que antecederam a mobilização e 34 não (considerado grupo sem Rituximab). Os autores observaram

que, embora a sobrevida do grupo tratado com Rituximab foi maior do que no grupo sem Rituximab, a administração da droga em até seis meses antes do início da mobilização teve uma correlação negativa com o número de células CD34+ coletadas.

Gojo et al. (2004) analisaram a resposta à mobilização de CPH em 77 pacientes com diagnóstico de Mieloma múltiplo. Os pacientes foram mobilizados com quimioterapia e fator de crescimento hematopoético (G-CSF e ciclofosfamida, administrada isoladamente ou em associação com etoposide). Foi observada boa resposta ao regime de mobilização em 92% dos pacientes analisados. Fatores de significância estatística associados com resposta ruim foram: porcentagem de células plasmáticas na medula óssea e tratamento prévio com radioterapia. A adição de etoposide ao regime de mobilização não produziu incremento significativo no número de células CD34+ coletado.

Os fatores associados com não-mobilização foram reportados por Kuittinen et al. (2004) após a análise de 97 pacientes com diagnóstico de Linfoma não-Hodgkin mobilizados com ciclofosfamida (4g/m^2) e G-CSF (G-CSF: $5\mu\text{g/kg/dia}$ em 88 pacientes; e, GM-CSF: $263\mu\text{g/dia}$ em 9 pacientes). Os autores observaram falha na resposta à mobilização em 19% dos pacientes. Na análise univariada, as variáveis: envolvimento medular ao diagnóstico ou previamente da mobilização; e, baixa contagem de plaquetas antes do início da mobilização, foram associadas com má resposta. Na análise multivariada, apenas o envolvimento medular ao diagnóstico e a contagem de plaquetas pré-mobilização foram associadas com o desfecho.

Ford et al. (2004a) analisaram retrospectivamente a resposta ao regime de mobilização baseados na administração de diferentes drogas quimioterápicas e G-CSF em 201 pacientes com neoplasias não mielóides, com ênfase na análise do efeito de diferentes classes de drogas quimioterápicas, administradas previamente, sobre a mobilização. Os autores não encontraram correlação entre a idade, sexo, envolvimento medular, atividade da doença ou radioterapia e resposta à mobilização. No entanto, a quimioterapia prévia, especialmente com agentes alquilantes e análogos da platina, teve correlação inversa com o grau de mobilização de CPH.

Pastore et al. (2004) analisaram os fatores que afetaram a mobilização e o rendimento da coleta de CPH em 104 pacientes com leucemias agudas em primeira remissão. A coleta foi realizada durante a fase de recuperação medular, após terapia de consolidação que consistiu de citarabina associada à daunoblastina ou mitoxantrone ou idarrubicina, nos pacientes com Leucemia mielóide aguda ($n = 66$), e de citarabina associada à etoposide nos pacientes com Leucemia linfóide aguda ($n = 38$). Todos os pacientes receberam também G-CSF durante a mobilização. Apenas baixo número de células CD34+ no sangue periférico pré-mobilização e a presença de febre de origem indeterminada ou infecção durante a fase de neutropenia após quimioterapia de consolidação, foram relacionados com má resposta à mobilização. Nesta série de pacientes com leucemias agudas o sexo e a idade não tiveram influencia no rendimento da coleta.

Ford et al. (2004b) analisaram a expressão de moléculas de adesão nas células CD34+ coletadas do sangue periférico, em 36 pacientes submetidos à mobilização de

CPH com G-CSF. O objetivo do estudo foi identificar variações na expressão destas moléculas, nos pacientes que apresentam diferentes respostas ao regime de mobilização. Os pacientes que apresentaram boa resposta à mobilização, definidos por coletar um número adequado de CPH em apenas um procedimento de leucaférese, mostraram menor número de células expressando CD11a e CD54. A análise de regressão linear permitiu identificar que a expressão do CD11a foi um fator preditivo independente da eficiência da resposta à mobilização.

Pavone et al. (2006) analisaram retrospectivamente 262 pacientes com Linfoma de Hodgkin (n = 57) e Linfoma não-Hodgkin (n = 205) com o objetivo de avaliar a influência de parâmetros hematológicos e de variáveis clínicas na recuperação de células CD34+ do sangue periférico, após mobilização com três esquemas diferentes de quimioterapia associada a G-CSF. A resistência da doença ao tratamento habitual e à carga de quimioterapia pré-mobilização (superior a três ciclos) foram associados com má resposta à mobilização. O autor observou também que resposta ruim à mobilização foi um fator prognóstico independente: a sobrevida global em três anos dos pacientes com resposta ruim à mobilização foi de 33% contra 71% dos pacientes com boa resposta à mobilização (P = 0,002). Este achado corrobora com o relato anterior publicado por Gordan et al. (2003) o qual também observou que resposta ruim à mobilização pode indicar pior evolução em pacientes com Linfoma, submetidos ao transplante autogênico de medula óssea.

Breitkreutz et al. (2007) avaliaram a influência do tratamento prévio com talidomida na coleta de CPH, em pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo. Os

autores comparam o rendimento na coleta de CPH de pacientes tratados previamente com talidomida com pacientes tratados com esquema VAD de quimioterapia. Os autores encontraram um rendimento maior de células CD34+ na coleta dos pacientes tratados com esquema VAD e concluíram que a administração prévia de talidomida afeta de maneira significativa o rendimento da coleta de CPH em pacientes com diagnóstico de Mieloma múltiplo.

Estes relatos revelam resultados variados na análise da influência de um mesmo fator pré-mobilização. Em transplantes autogênicos, as principais razões para resultados variáveis e pouco previsíveis entre os vários estudos apresentados são: diversidade nas características dos pacientes e dos regimes de mobilização utilizados nos estudos; diferentes critérios utilizados para definir resposta à mobilização e em alguns casos um pequeno número de pacientes incluídos nas análises. Além disso, outros fatores ainda desconhecidos devem estar relacionados com a resposta à mobilização, pois pacientes extensivamente pré-tratados com quimioterapia e/ou radioterapia, com exposição a diferentes classes de drogas mielossupressoras, com metástase ou fibrose medular, mobilizam bem; enquanto doadores saudáveis de transplantes alogênicos, não respondem à mobilização.

Apesar de muitos pacientes que não apresentam resposta inicial à mobilização permanecem como maus mobilizadores, um número suficiente de células para um transplante autogênico pode ser obtido numa segunda tentativa de mobilização (Watts et al., 2000). Esta segunda tentativa de mobilização pode consistir da administração diária de altas doses de G-CSF (20–50µg/kg/dia) (Kobbe et al.,

1999), da infusão concomitante de G-CSF com outras citocinas como GM-CSF ou rHuSCF (Tarella et al., 2002b), da associação de G-CSF com AMD3100 (Flomemberg et al., 2005), da administração do G-CSF na forma peguilada (Pegfilgrastima) (Molineux et al., 1999; Krochinsky et al., 2006) ou da coleta de medula óssea após administração de G-CSF por 3-5 dias (Lemoli et al., 2003).

Novos estudos retrospectivos e prospectivos necessitam ser conduzidos para que os fatores relacionados com a resposta à mobilização sejam identificados e definidos, e se possa traçar previamente uma estratégia individualizada mais agressiva ou alternativa para os pacientes de risco.

3.5 Coleta de CPH de sangue periférico

Uma vez recrutadas da medula óssea, as células progenitoras hematopoéticas presentes no sangue periférico são coletadas por um processo denominado aférese. A palavra ‘aférese’ vem do grego *aphairesis* e significa supressão. O procedimento consiste na retirada do sangue total do paciente, separação deste sangue nos seus componentes por meio de um separador celular automatizado, retenção do componente desejado e retorno dos elementos remanescentes para o paciente.

Existem vários equipamentos de aférese para coleta de células progenitoras de sangue periférico disponíveis atualmente no mercado: Cobe Spectra (Gambro BCT, Lakewood, CO, USA), Baxter CS 3000 Plus (Baxter Biotech, Deerfield, IL,

USA), Fresenius AS 104 (Fresenius USA, Walnut, CA, USA) e Haemonetics MCS Plus (Haemonetics Corp., Braintree, MA, USA) (Moog, 2004). Estes equipamentos se baseiam no princípio da centrifugação para separar o sangue total em plasma, plaquetas, células mononucleares, granulócitos e eritrócitos. Na coleta de células progenitoras, a camada do sangue coletada pelos equipamentos de aférese é a de células mononucleares. É justamente nesta camada de células que se encontram as CPH.

Com exceção do equipamento Haemonetics MCS Plus, os equipamentos de aférese são de fluxo contínuo e requerem dois acessos venosos do paciente para realizar o procedimento de coleta: um para a retirada do sangue total e outro para a devolução dos elementos remanescentes.

Os acessos venosos, necessários para a realização da leucaférese, devem permitir um fluxo contínuo de sangue de 60-100mL/min. O paciente precisa apresentar pelo menos uma veia antecubital em cada braço, com diâmetro interno suficiente para acomodar uma agulha de calibre 16-18G para retirar o sangue total e uma agulha com calibre mínimo 19G para a devolução dos elementos remanescentes. Esse fluxo pode ser obtido também por acessos venosos periféricos, caso contrário pode ser alcançado por meio de um cateter venoso de duplo lúmen inserido na veia subclávia, veia jugular interna ou veia femoral. A inserção de um cateter venoso em veia femoral apresenta menos efeitos adversos relacionados com o procedimento de inserção, porém apresenta maior risco de infecção e pode limitar a mobilidade do paciente. Por outro lado, as veias subclávias e jugulares internas são ótimas para

acomodar cateteres de longa permanência, entretanto o procedimento de inserção de cateteres nestas veias está associado a complicações como pneumotórax, hemotórax e trombose.

Embora os acessos venosos periféricos sejam preferidos, na maioria dos pacientes, em particular naqueles submetidos previamente a tratamento com quimioterapia, são necessários cateteres venosos para adequada realização dos procedimentos de coleta de CPH por leucaférese (Reddy, 2005).

A solução de ACD fórmula A (ACD-A) tem sido utilizada com maior frequência para anticoagulação sanguínea nos procedimentos de leucaférese, introduzida no processo de leucaférese do equipamento. A anticoagulação decorre da ligação do citrato ao cálcio ionizado, que resulta na diminuição temporária no nível sérico deste íon indispensável para a coagulação. O volume de ACD-A utilizado em cada procedimento varia de 1mL de solução de ACD-A para cada 12mL de sangue total processado até 1mL para cada 15mL de sangue total processado. Embora, parte do citrato utilizado durante a leucaférese retorne para o paciente, a anticoagulação sistêmica não ocorre graças à rápida metabolização hepática. Podem, no entanto, ocorrer sintomas relacionados com hipocalcemia como parestesia, tremores, cefaléia e náuseas. Na maioria dos pacientes estes sintomas são de natureza leve e melhoram com manobras simples como a diminuição da velocidade de reinfusão do ACD-A ou com a administração IV de gluconato de cálcio (Buchta et al., 2003).

Outros efeitos adversos relacionados com o procedimento de leucaférese

incluem redução em 20-30% na contagem prévia de plaquetas, reação vaso-vagal, hipotensão arterial, síncope, insuficiência respiratória, hemólise e embolia. McLeod et al. (1999) reportaram a incidência de 1,66% de reações adversas relacionadas com a coleta de CPH por leucaférese.

Habitualmente, em um período de 2-4 horas, 10–20 litros de sangue do paciente (ou 2-5 volumes sangüíneos estimados) são processados pelo equipamento em cada procedimento de leucaférese. Embora a eficiência do procedimento de coleta esteja diretamente relacionada com o número de células CD34+ presente no sangue periférico, e com o volume sanguíneo processado, coletas muito prolongadas com processamento superior a quatro volemias devem ser evitadas, pois oferecem maiores riscos de desenvolvimento de efeitos adversos graves relacionados com o procedimento como hipocalcemia e plaquetopenia (Comenzo et al., 1995).

Inicialmente, a leucometria era utilizada como parâmetro para sinalizar quando iniciar as coletas de CPH por leucaférese após a mobilização com quimioterapia e o fator de crescimento, utilizando a contagem mínima de $1,0 \times 10^9$ leucócitos/L como gatilho. Entretanto, estudos têm demonstrado que o número de células CD34+ circulantes tem melhor correlação com o número de células coletadas do que a leucometria, sendo este último o parâmetro mais apropriado para indicar o início das coletas e estimar o seu rendimento (Knudsen et al., 1998; Yu et al., 1999; Moncada et al., 2003; Nowrousian et al., 2003; Sawant, Rajadhyaksha, 2005).

Sarkodee-Adoo et al. (2003) avaliaram a influência da leucometria, contagem plaquetária, hematócrito e contagem de células CD34⁺ no sangue periférico pré-coleta, na eficiência de 120 procedimentos de leucaférese. O volume sanguíneo processado durante a coleta e a contagem de células CD34⁺ no sangue periférico foram diretamente associados com a eficiência da coleta. Hematócrito, leucometria e contagem plaquetária pré-leucaférese, acesso venoso e peso do paciente não tiveram influência nessa eficiência (Sarkodee-Adoo et al., 2003).

Geralmente as contagens de células CD34⁺ superiores a 20 células/mm³ são associadas a um bom rendimento, e 94% das leucaféreses apresentam contagem igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34⁺/(kg de peso) no produto coletado (Armitage et al., 1997). Inversamente, concentrações inferiores a 10 células/mm³ são associadas a coletas ruins e à necessidade de vários procedimentos em dias consecutivos, até que um valor pré-definido de CPH seja atingido (Remes et al., 1997; Knudsen et al., 1998; Noga et al., 2001).

O objetivo das coletas por leucaférese é obter um produto adequado, quantitativa e qualitativamente, com poucos efeitos adversos para os pacientes, a um custo aceitável. Um produto adequado deve ser estéril, livre de células tumorais e com um número de células progenitoras que garanta a reconstituição granulocítica, plaquetária, eritrocítica e da função imune.

Tem sido demonstrada uma relação evidente de dose resposta entre o número de células CD34⁺ no produto coletado do sangue periférico e a cinética de

recuperação hematopoética (Weaver et al., 1995). Em um transplante autogênico, um número mínimo de $2,0-2,5 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) do receptor, tem sido citado como quantitativamente adequado para a recuperação hematopoética, enquanto a infusão de doses menores pode ocasionar retardo na recuperação de plaquetas (Bender et al., 1992; Shpall et al., 1998; Siena et al., 2000). Doses de células CD34+ inferiores a $1,0 \times 10^6$ células/(kg de peso) geralmente levam ao retardo na recuperação de neutrófilos e em alguns pacientes a recuperação hematopoética poderá nunca ocorrer (Weaver et al., 1997). Por outro lado, doses iguais ou superiores a $5,0 \times 10^6$ células/(kg de peso) podem diminuir os tempos de neutropenia e de recuperação plaquetária (Sola et al., 1999).

Gunn et al. (2003) estudaram 58 pacientes com Leucemia mieloide aguda em primeira remissão tratados com transplante autogênico de medula óssea, para determinar se a infusão de uma dose superior a $10,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) é associada à recuperação plaquetária mais rápida. Neste estudo, os autores encontraram recuperação plaquetária quatro vezes mais rápida nos pacientes que receberam doses altas de CD34+, quando comparados com aqueles que receberam doses de $5,0-10,0 \times 10^6$ células/(kg de peso). A recuperação neutrofílica também foi mais rápida, embora não de forma significativa.

Igualmente, Klaus et al. (2006) observaram reconstituição hematopoética mais rápida em pacientes com Mieloma múltiplo, submetidos a transplante autogênico com número de células CD34+ superior a $6,5 \times 10^6$ células/(kg de peso). Entretanto, estas doses não tiveram impacto significativo na mortalidade relacionada

com o transplante, na sobrevida global, nem no índice de recaída nos primeiros 100 dias após o transplante.

Altas doses de células CD34+ provavelmente resultam em recuperação hematopoética mais rápida, especialmente plaquetária. Entretanto, independente do número de células CD34+ infundidas, a recuperação neutrofílica não ocorrerá antes de sete a oito dias da infusão. Este período representa o tempo mínimo necessário para que as CPH se transformem em neutrófilos e sejam liberados para a circulação (Jansen et al., 2002).

3.6 Vantagens das CPH mobilizadas de sangue periférico

“It seems more than ever likely that blood-derived stem cells will replace marrow for many indications...”
(Goldman, 1994)

A utilização do sangue periférico como fonte de CPH em transplante de medula óssea de humanos começou apenas em meados dos anos 80, após a observação de que as CPH circulantes apresentam a mesma capacidade de recuperação hematopoética da CPH da medula óssea. No entanto, uma vez que, em condições basais, apenas um pequeno número destas células se encontra na circulação, somente pacientes com contra-indicação para punção medular decorrente de irradiação pélvica anterior ou extensa infiltração tumoral da medula óssea, foram submetidos à coleta de CPH de sangue periférico para TMO. Nessas condições, além do incômodo e do alto custo gerados pelas múltiplas coletas necessárias para

obtenção de um número adequado de células progenitoras, a recuperação hematopoética nestes pacientes não ocorreu em tempo inferior àqueles que receberam CPH provenientes da medula óssea (Körbling et al., 1986; Kessinger et al., 1991).

A utilização de regimes de mobilização da CPH da medula óssea para o sangue periférico, previamente à coleta, definitivamente mudou este cenário. Atualmente, a maioria dos transplantes autogênicos e boa parte dos transplantes alogênicos são realizados com células derivadas do sangue periférico (Reddy, 2005). Esta preferência para o uso de células mobilizadas de sangue periférico em detrimento das células coletadas da medula óssea, decorre de duas razões principais: número de células progenitoras que pode ser obtido após o regime de mobilização e rápida recuperação hematopoética observada com as CPH mobilizadas de sangue periférico.

3.6.1 Número de CPH coletadas do sangue periférico após mobilização

Após a mobilização, o número de células precursoras hematopoéticas no sangue periférico é muito maior do que em condições basais. Os regimes de mobilização promovem um aumento tão significativo na concentração de CPH na circulação que tornam o número de células CD34+ no sangue periférico igual, ou mesmo superior, ao número de células CD34+ presente na medula óssea em condições basais. Além disto, em um único procedimento de leucaférese, para

obtenção de células do sangue periférico, é possível processar um volume de sangue 10-20 vezes maior do que o volume total obtido em uma coleta por punção medular. Por isso, não é raro que o número de células CD34+ coletado do sangue periférico, após a mobilização, seja 10-20 vezes maior do que o número de células CD34+ coletado da medula em condições basais.

Tem sido demonstrado que, em transplantes autogênicos, o tempo para enxertia hematopoética, após terapia mieloablativa, está diretamente relacionado com o número de células CD34+ infundidas (Hass et al., 1994; Bessinger et al., 1995; Weaver et al., 1995; To et al., 1997). Assim, a obtenção de um número maior de células progenitoras representa uma importante vantagem do sangue periférico como fonte de CPH.

3.6.2 Tempo de recuperação hematopoética com CPH de sangue periférico

Além do maior número de células CD34+ as células progenitoras mobilizadas com G-CSF de sangue periférico apresentam um outro benefício inicialmente inesperado: capacidade de promover recuperação hematopoética em tempo menor do que quando são utilizadas células progenitoras não mobilizadas da medula óssea (Beyer et al., 1995; Smith et al., 1997; Jansen et al., 2005).

Ao analisarem retrospectivamente 1393 pacientes portadores de leucemia aguda em primeira remissão completa, submetidos ao transplante autogênico de

medula óssea, e compararem os resultados obtidos com CPH de sangue periférico e de medula óssea, Reiffers et al. (2000) observaram que o tempo de recuperação granulocítica e plaquetária foi menor nos pacientes que receberam células periféricas ($P < 0,0001$).

Na maioria dos estudos randomizados publicados sobre transplantes alogênicos, o tempo necessário para que os pacientes atinjam contagem de neutrófilos maior que $0,5 \times 10^9$ neutrófilos/L e de plaquetas maior que 20×10^9 plaquetas/L após a infusão de CPH, foi menor quando foram utilizadas células coletadas de sangue periférico (Mahmoud et al., 1999; Blaise et al., 2000; Heldal et al., 2000; Powles et al., 2000; Bensinger et al., 2001; Schmitz et al., 2002; Couban, Lapidot, 2002).

Algumas publicações, no entanto, têm discutido esta vantagem sugerindo que o menor tempo para recuperação medular não está relacionado com a fonte de obtenção das células, mas sim com o uso prévio de G-CSF para mobilização (Morton et al., 2001; Ji et al., 2002; Elfenbien et al., 2004).

Damiani et al. (1997) publicaram um estudo randomizado e demonstraram que, em pacientes com Linfoma, submetidos a transplante autogênico, a medula óssea pode ser coletada com eficiência após estímulo com G-CSF e que a sua reinfusão apresentou resultados similares quanto à velocidade de recuperação hematopoética quando comparado com células do sangue periférico mobilizadas com G-CSF.

Elfenbein (2005) realizou uma revisão da literatura com dados publicados entre 1994 e 2003. O objetivo desta revisão foi responder a questão seguinte: As células progenitoras presentes no sangue periférico e na medula óssea são equivalentes quanto ao potencial de enxertia precoce, após a administração de terapia mieloablativa? O autor incluiu na revisão apenas os relatos que permitiram comparar o tempo de recuperação hematopoética após a utilização de CPH de sangue periférico e de medula óssea. No total, foram inclusas 37 publicações: 13 envolvendo transplantes autogênicos e 24 envolvendo transplantes alogênicos. Os dados encontrados com transplantes autogênicos (Tabela 2) revelaram que a recuperação hematopoética ocorreu em menor tempo com células mobilizadas do sangue periférico, quando comparadas com células coletadas da medula óssea, estimuladas ou não previamente com G-CSF. Estes dados parecem contradizer a hipótese de equivalência entre as duas fontes de CPH. No entanto, quando apenas estudos prospectivos e randomizados foram analisados, as células da medula óssea, estimuladas com G-CSF, promoveram a recuperação de granulócitos e plaquetas em igual tempo que as células mobilizadas com G-CSF de sangue periférico. O autor concluiu que a hipótese de equivalência entre as células mobilizadas das duas fontes, em transplantes autogênicos, não poderia ser descartada nem confirmada e que outros estudos prospectivos e randomizados seriam necessários para responder definitivamente esta questão.

Tabela 2 - Tempo de recuperação hematopoética em transplantes autogênicos.
(Elfenbein, 2005)

Fonte de CPH	Tempo de recuperação hematopoética (dias)		
	Sangue periférico	Medula óssea	
Administração de G-CSF pré-coleta	Sim	Não	Sim
CD34+ ($\times 10^6/\text{kg}$)	2,6 (1,0 – 6,4)*	2,1 (1,2 – 2,3)	1,5 (0,6 – 2,3)
Granulócitos ($>0,5 \times 10^9/\text{L}$)	12,2 (9 – 15)	16,7 (11 – 21)	14,7 (12 – 19)
Plaquetas ($>20.000 \times 10^9/\text{L}$)	16,1 (10 – 28)	27,4 (15 – 41)	20,8 (17 – 34)

*(range)

Esses estudos demonstraram que a velocidade de reconstituição hematopoética das CPH mobilizadas de sangue periférico é, no mínimo, equivalente quando comparada com aquela das células obtidas da medula óssea após estímulo com G-CSF e superior quando comparada com a velocidade referente às células obtidas da medula óssea sem estímulo com G-CSF.

3.6.3 Contaminação tumoral do produto coletado de sangue periférico

Outra vantagem da célula coletada de sangue periférico em relação à coleta medular é o menor risco de contaminação por células tumorais do produto coletado.

Embora existam referências de que células malignas podem contaminar o sangue periférico e contribuir para as recaídas sistêmicas da doença após o transplante autogênico de medula óssea (Brenner et al, 1993; Deisseroth et al., 1994), estudos que aplicaram imunocitoquímica, em pacientes com câncer de mama avançado e com infiltração medular, têm documentado menor contaminação tumoral no produto coletado de sangue periférico do que no produto coletado da medula óssea (Ross et al., 1993; Pecora et al., 2002).

Essas vantagens, associadas à segurança da coleta, à possibilidade da coleta em regime ambulatorial e à inexistência de uma desvantagem evidente das células de sangue periférico, tornam pouco provável o uso preferencial da medula óssea como fonte de células progenitoras no transplante autogênico e permitiram que se escolhesse o sangue periférico como a principal fonte de células CD34+, neste tipo de transplante. Atualmente, em transplantes autogênicos, apenas os pacientes que não respondem ao esquema de mobilização são submetidos à coleta de células da medula óssea (Hui, To, 1999).

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional no qual apresentamos uma análise retrospectiva da resposta ao regime de mobilização de células CD34+ em 307 pacientes tratados com transplante autogênico de células progenitoras hematopoéticas (CPH) na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Avaliamos a influência de algumas variáveis pré- e pós-tratamento no rendimento da coleta de CPH de sangue periférico nestes pacientes.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos e Pesquisa do HCFMUSP.

4.1 Pacientes

Fizeram parte desta análise retrospectiva 307 pacientes (164 homens e 143 mulheres) submetidos a transplante autogênico de CPH na Unidade de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP entre abril 2001 e abril de 2007. (Apêndice1)

4.2 Mobilização de CPH

Todos os pacientes incluídos na análise foram submetidos a um único regime

de mobilização de células progenitoras hematopoéticas. Este regime consistiu-se de:

1. Administração intravenosa (IV) de ciclofosfamida, na dose total de 60-120mg/(kg de peso). Esta dose foi dividida em duas doses iguais, administradas em dias consecutivos em intervalo de 24 horas;
2. Administração subcutânea (SC) de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), na dose diária de 6–17 μ g/kg/dia. Esta dose foi dividida em duas doses iguais, administradas a cada 12 horas. A administração de G-CSF foi iniciada quando, na fase de hipoplasia medular decorrente da administração de ciclofosfamida, o número de leucócitos no sangue periférico fosse $\leq 1,0 \times 10^9$ leucócitos/L; e se estendeu até o último dia da coleta de CPH por leucaférese ou até que a falência na resposta à mobilização fosse determinada. As doses de G-CSF foram administradas ao paciente no Ambulatório de TMO do HCFMUSP ou lhe foram entregues para administração domiciliar. Nestas circunstâncias, foi solicitado ao paciente trazer ao Ambulatório de TMO do HCFMUSP a(s) ampola(s) vazia(s) de G-CSF para controle da sua administração.

4.3 Análise do número de CPH no sangue periférico

Durante a fase de recuperação medular, após administração da quimioterapia mielossupressora para mobilização, amostras de sangue dos pacientes foram colhidas diariamente para realização de hemograma. Quando a contagem de leucócitos no sangue periférico atingiu valor $\geq 1,0 \times 10^9$ leucócitos/L, além do hemograma, também

foi determinado diariamente o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico.

Quando o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico atingiu valor ≥ 10 células/mm³, os pacientes foram submetidos à coleta de CPH do sangue periférico por leucaférese, no Departamento de Aférese da Fundação Pró-Sangue, Hemocentro de São Paulo. Os que não atingiram aquele valor (≥ 10 células/mm³), considerados como não responsivos à mobilização, foram submetidos à coleta de células da medula óssea, em centro cirúrgico.

4.4 Coleta de CPH de sangue periférico por leucaférese

As coletas de CPH de sangue periférico foram realizadas por leucaférese em um dos equipamentos: Cobe Spectra (Cobe, Lakewood, CO, USA), ou Fenwal CS 3000 Plus (Baxter Biotech, Deerfield, IL, USA), ou Fresenius AS 104 (Fresenius USA, Walnut, CA, USA).

Em cada procedimento foi processado o equivalente a 1,5–7,0 volemias de sangue do paciente. A volemia de cada paciente foi calculada em função do peso, altura e sexo.

Em todos os procedimentos, para anticoagulação do circuito extracorpóreo durante a leucaférese, foi utilizada solução ACD-A (Adenina, Citrato e Dextrose –

Fórmula A) em proporção de 1mL para cada 12mL de sangue total.

Foram realizadas coletas diárias de CPH com o objetivo de coletar um número total $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso).

De cada componente obtido por leucaférese, foi reservada uma amostra para quantificação do número de células CD34+ no produto coletado.

As amostras e os produtos obtidos por leucaférese foram encaminhados ao setor de criopreservação celular da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo, para quantificar o número de células CD34+ no produto coletado e para a criopreservação.

4.5 Quantificação do número de células CD34+

As células CD34+ do sangue periférico e do produto coletado por leucaférese foram quantificadas por imunofenotipagem de acordo com a técnica seguinte:

1. Uma alíquota da amostra de sangue periférico ou do produto obtido por leucaférese, com $2,0 \times 10^6$ células/mm³ em um volume ajustado entre 10µL e 100µL, foi colocada em um tubo de poliestireno de Ø12mmx75mm com 10µL de anticorpo monoclonal CD45 conjugado com fluoresceína (FITC) e 20µL de anticorpo monoclonal CD34 conjugado com ficoeritrina (PE)

(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA – clones clone 2D1, My10 e 8G12 ou Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA – clones J33 e 581);

2. As células marcadas com anticorpo monoclonal conjugado com FITC emitem luz amarelo-esverdeada, enquanto as células marcadas com anticorpo PE vermelho-alaranjada. O uso de dois flourocromos permite a análise simultânea das duas cores na reação, pois cada um emite luz em diferentes comprimentos de onda quando excitado por feixe de luz de laser de argônio com comprimento de onda de 488nm;
3. A alíquota foi homogeneizada e incubada por 20 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz;
4. Após a incubação, 2mL de solução de lise FACS (Becton e Dickinson, San Jose, CA, USA) foram adicionados à alíquota para lise de eritrócitos;
5. A alíquota foi submetida à nova incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente e protegida da luz;
6. Após a incubação, a alíquota foi centrifugada por 5 minutos a 3000rpm, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo;
7. Na alíquota, foram adicionados 2000μL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,3, contendo azida de sódio a 0,02%;
8. Nova homogeneização e centrifugação por 5 minutos a 3000rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado por inversão;
9. Esta etapa, de adição de 200μL de solução tampão PBS/azida, homogeneização e centrifugação, foi repetida novamente para completar 2 ciclos de lavagem;

10. Após a segunda centrifugação, o botão formado foi diluído com 600µL de paraformaldeído a 1%;
11. Foi realizada, então, a leitura do número de células CD34+ no citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Analyser, FACSCalibur, (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), com auxílio do Software Cell Quest™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). A população de células CD45+ foi analisada após aquisição de 100.000 eventos. A fluorescência foi medida a 530nm sob excitação de feixe de luz de 488nm;
12. O protocolo ISHAGE foi utilizado para enumeração da população de células CD34+ (Sutherland et al., 1996) dentro da população de células CD45+ (Figura 3);

Figura 3 – Quantificação do número de células CD34+ por citometria de fluxo.

4.5.1 Quantificação de células CD34+ no sangue periférico

O número absoluto de células CD34+ do sangue periférico (/mm³) foi calculado da maneira seguinte:

$$A = B \times C$$

onde:

A = Número de células CD34+ do sangue periférico por milímetro cúbico de sangue

B = Número de leucócitos no sangue periférico por milímetro cúbico de sangue

C = Porcentagem de células CD34+ no sangue periférico

4.5.2 Quantificação de células CD34+ no produto coletado

O número total de células CD34+ no produto coletado (x10⁶/kg de peso) foi calculado da maneira seguinte:

$$A = (B \times C \times D) / 1000$$

onde:

A = Número total de células CD34+ coletadas [x10⁶/(kg de peso)]

B = Número de células CD34+ do produto coletado por milímetro cúbico de sangue

C = Volume da bolsa (mL)

D = Peso do paciente (kg)

4.6 Critérios de resposta ao regime de mobilização

A variável resposta ao regime de mobilização foi dividida em duas categorias:

sucesso e insucesso.

1. O sucesso na resposta ao regime de mobilização foi definido para os pacientes nos quais um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) tenha sido coletado com até três procedimentos de leucaférese.
2. O insucesso na resposta ao regime de mobilização foi definido para os pacientes nos quais um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) não tenha sido coletado com até três procedimentos de leucaférese.
3. O insucesso na resposta ao regime de mobilização também foi definido para os pacientes que, durante a mobilização, não atingiram um valor mínimo de 10 células CD34+/mm³ no sangue periférico para iniciar a coleta de CPH de sangue periférico por leucaférese. Estes pacientes foram submetidos à coleta de CPH por punção medular.

4.7 Coleta de células da medula óssea

1. Os pacientes que não atingiram um número absoluto ≥ 10 células CD34+/mm³ no sangue periférico após a mobilização, foram submetidos à coleta de células da medula óssea no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas da FMUSP, sob anestesia geral ou peridural;
2. Após procedimento de antisepsia do local, a coleta das células foi realizada mediante múltiplas punções aspirativas na região das cristas ilíacas posteriores;

3. Em média, foram aspirados 5mL em cada punção, até a coleta de um volume aproximado de 10–15mL por kg de peso do receptor;
4. Após a coleta, o produto medular foi colocado em um Becker com aproximadamente 300mL de soro fisiológico e 5.000 a 10.000 unidades de heparina no seu interior;
5. Posteriormente, a medula foi submetida à dupla filtração para retirada de espículas ósseas, gordura e coágulos;
6. Após a segunda filtração, duas amostras do produto medular foram obtidas para contagem do número de células nucleadas. O objetivo foi coletar um número aproximado de $2,0 \times 10^8$ células nucleadas/(kg de peso do receptor);
7. As amostras e as bolsas coletadas foram encaminhadas para o Setor de Criopreservação da Fundação Pró-Sangue / Hemocentro de São Paulo, para contagem do número de células nucleadas e criopreservação, respectivamente.

4.8 Quantificação do número de células nucleadas no produto medular

1. Após a homogeneização, a amostra do produto medular foi diluída com solução de Turk na proporção de 1:40;
2. Os retículos da câmara de Neubauer foram preenchidos com 10 μ L da amostra preparada conforme item 1;
3. Após descanso de aproximadamente 5 minutos, foi realizada a contagem de células nucleadas contidas nos quatro quadrantes externos da câmara de Neubauer. O número de células dos quatro quadrantes foi somado;

4. O número de células nucleadas do produto coletado (/mm³) foi calculado da forma seguinte:

$$A = \frac{B \times C}{0,4\text{mL}}$$

Onde:

A = Número de células nucleadas do produto coletado por milímetro cúbico

B = Soma das células contadas nos quatro quadrantes por milímetro cúbico de sangue

C = Diluição da amostra (mL)

5. O número total de células nucleadas coletadas (x10¹⁰) foi calculado da maneira seguinte:

$$A = B \times 1000 \times C$$

Onde:

A = Número total de células nucleadas coletadas

B = Número de células nucleadas por milímetro cúbico de sangue

C = Volume da bolsa (mL)

6. O número de células nucleadas coletadas (x10⁸/kg de peso) foi calculado da maneira seguinte:

$$A = B / C$$

Onde:

A = Número de células coletadas (x10⁸/kg de peso)

B = Número total de células nucleadas coletadas (x10¹⁰)

C = Peso do paciente (kg)

4.9 Criopreservação das CPH coletadas

Os produtos obtidos por leucaférese e por coleta de medula óssea, foram criopreservados em um intervalo máximo de 6 horas após o término da coleta.

O Dimethilsulfóxido (DMSO) a uma concentração final de 10% foi utilizado como agente crioprotetor intracelular.

Imediatamente após a adição do dimethilsulfóxido (DMSO) ao componente de celular, o mesmo foi submetido à redução da temperatura sob taxa controlada de resfriamento, de acordo com o protocolo de criopreservação de células mononucleares do equipamento Cryomed Modelo 1010 (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Este protocolo permitiu que se reduzisse a temperatura da amostra em 1 grau Celsius por minuto até atingir a temperatura de 40 graus Celsius negativos; a partir de então a redução passou a ser de 10 graus Celsius por minuto até que a amostra atingisse a temperatura de 80 graus Celsius negativos. Neste momento as células foram transferidas para um freezer mecânico com temperatura igual ou inferior a 120 graus Celsius negativos, onde permaneceram estocadas até o momento de sua infusão.

Imediatamente antes da infusão, as células foram descongeladas em banho-maria, a temperatura de 37 graus Celsius, e infundidas IV a uma velocidade aproximada de 10mL/minuto.

4.10 Análise retrospectiva dos prontuários

Os prontuários hospitalares de todos os pacientes que participaram da análise foram retrospectivamente avaliados. As variáveis analisadas foram categorizadas em variáveis qualitativas, classificatórias, ou categóricas, e variáveis quantitativas, numéricas ou contínuas. Foram registradas as variáveis seguintes:

Variáveis contínuas

- Idade;
- Tempo de doença (período compreendido entre o diagnóstico da doença e o início do regime de mobilização);
- Número de ciclos de quimioterapia administrados previamente ao regime de mobilização;
- Contagem de plaquetas no sangue periférico imediatamente pré-mobilização;
- Volume sanguíneo processado em cada procedimento de leucaférese;
- Número de volemias processadas em cada procedimento de leucaférese;
- Intervalo entre o início do regime de mobilização;
- Número de leucócitos no sangue periférico ($/\text{mm}^3$) pré-leucaférese (CD34+ pré);
- Porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese (% CD34+);
- Número de células CD34+ no produto coletado por leucaférese (CD34+ bolsa);
- Número de células nucleadas no produto coletado da medula óssea.

Variáveis categóricas

- Sexo;

- Diagnóstico;
- Tratamento prévio à mobilização com agentes alquilantes. Como agentes alquilantes foram incluídas as seguintes drogas quimioterápicas: ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, melfalano, bussulfano, lomustina, carmustina, mustina, estramustina, mustarda nitrogenada e tiotepa;
- Tratamento prévio à mobilização com Mitoxantrone;
- Tratamento prévio à mobilização com análogos da Platina;
- Tratamento prévio à mobilização com radioterapia (radiação gama);
- Infiltração de medula óssea pela doença ao início do regime de mobilização;
- Remissão completa da doença no início do regime de mobilização.

A variável ‘diagnóstico’ foi categorizada de duas formas diferentes. Inicialmente essa variável foi dividida em cinco categorias: categoria 1 = Mieloma múltiplo; categoria 2 = Linfoma de Hodgkin; categoria 3 = Linfoma não-Hodgkin; categoria 4 = Leucemia mielóide aguda; e, categoria 5 = outros diagnósticos. Posteriormente, em função da variação no percentual de sucesso na resposta ao regime de mobilização, essa variável foi dividida em duas categorias: categoria 1 = incluiu o diagnóstico Mieloma múltiplo e a categoria 2 = incluiu os diagnósticos Linfoma de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin e Leucemia mielóide aguda.

As variáveis contínuas foram expressas em mediana e as variáveis categóricas em números absolutos e/ou relativos.

4.11 Análise de Sobrevida

Durante o mês de maio de 2007, foi feito um contato com cada paciente incluído na análise. Os pacientes cujo contato foi possível ou cuja data do óbito pôde ser obtida, foram considerados elegíveis para análise de sobrevida. Os pacientes com os quais não foi possível um contato ou não havia informação exata sobre a data do óbito do paciente, foram considerados inelegíveis para a análise de sobrevida.

4.12 Análise Estatística

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram analisados de acordo com métodos padrões de estatística, com o *software* SAS / STAT Software, Release 8.1, (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Os dados coletados para o estudo foram sumarizados para análise descritiva e inferencial, por meio de tabelas e gráficos, conforme apropriado.

A correlação entre os diferentes parâmetros do sangue periférico pré-leucaférese e o produto coletado foi estimada por regressão linear simples e análise de correlação de Spearman.

Os fatores que puderam influenciar a resposta ao regime de mobilização de CPH utilizados foram submetidos à análise univariada. Os testes do qui-quadrado ou exato de Fisher foram usados para a comparação de frequência de variáveis

categóricas. As variáveis contínuas foram comparadas por testes t de Student e de Mann-Whitney, de acordo com as distribuições das variáveis.

Para explorar a associação entre os parâmetros pré-mobilização que foram significantes na análise univariada e a resposta ao regime de mobilização, foi aplicada uma análise multivariada com um modelo de regressão logística.

As análises de sobrevida foram realizadas com o método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevida dos grupos com e sem sucesso na resposta à mobilização de CPH foram comparadas por aplicação do teste de *log-rank*.

Foi considerado estatisticamente significativo um valor de $P < 0,05$, que corresponde a um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

As características dos pacientes incluídos na análise, os resultados laboratoriais pré- e pós-mobilização, e dados referentes aos procedimentos de leucaférese realizados, podem ser vistos na Tabela 3.

Dos 307 pacientes que fizeram parte do estudo, 164 eram do sexo masculino (53,46%) e 143 do sexo feminino (46,6%). A mediana de idade foi de 43 anos (entre 9 e 73 anos).

Tabela 3 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes e dados referentes aos procedimentos de leucaférese (resultados apresentados em mediana)

Dados	Número de pacientes incluídos na análise N = 307	
Idade (anos)	43 (9 – 73)	
Sexo	F = 143 (46,6%)	M = 164 (53,4%)
Diagnóstico*	MM = 118 (38,43%) LH = 57 (18,56%) LNH = 85 (27,69%) LMA = 28 (9,12%) O = 19 (6,18%)	
Presença de medula óssea infiltrada ao início do regime de mobilização	Sim = 10 (3,25%)	Não = 297 (96,75%)
Doença em remissão clínica no início do regime de mobilização	Sim = 252 (82,08%)	Não = 55 (17,91%)

Continua

Continuação da Tabela 3

Nº plaquetas no início do regime de mobilização (/mm ³)	230 x 10 ³ (53 x 10 ³ a 578 x 10 ³)	
Tempo de diagnóstico (meses)	17 (2 – 144)	
Nº de ciclos de Quimioterapia administrados previamente à mobilização	8 (1 – 19)	
Tratamento prévio com agentes alquilantes	Sim = 203 (66,12%)	Não = 104 (33,87%)
Tratamento prévio com mitoxantrone	Sim = 26 (8,46%)	Não = 281 (91,53%)
Tratamento prévio com análogos da platina	Sim = 65 (21,17%)	Não = 242 (78,82%)
Tratamento prévio com radioterapia	Sim = 87 (28,33%)	Não = 220 (71,66%)
Intervalo entre o início da mobilização e o pico no número de células CD 34 + no sangue periférico (dias)	14,5 (8 – 43)	
Número de leucócitos no sangue periférico pré-leucaferese (/mm ³)	21.100 (900 – 75.000)	
Número de células CD34 + no sangue periférico pré-leucaferese (/mm ³)	16 (1 – 1.111)	
% de CD34 + no sangue periférico pré-leucaferese	0,1 (0,005 - 15,5)	
Volume sangüíneo processado em cada procedimento de leucaférese (mL)	16.000 (6.000 – 30.000)	
Número de volemias processadas em cada procedimento de leucaférese	3,81 (1,53 - 7,0)	
Número de células CD34+ coletadas em cada procedimento de leucaférese (x10 ⁶ /kg de peso do receptor)	1,5 (0,05 - 46)	
Número de células CD34+ coletadas por paciente (x10 ⁶ /kg de peso do receptor)	3,51 (1,2 - 4,6)	
Número de leucaféreses realizadas por paciente	1 (1 - 10)	

* LH = Linfoma de Hodgkin; LMA = Leucemia mieloide aguda; LNH = Linfoma não-Hodgkin; MM = Mieloma múltiplo; O = Outros diagnósticos.

A distribuição dos pacientes de acordo com diagnóstico pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico.

Diagnóstico	Número de pacientes	Porcentagem de pacientes (%)
Mieloma múltiplo	118	38,43
Linfoma não Hodgkin	85	27,69
Linfoma de Hodgkin	57	18,56
Leucemia mieloide aguda	28	9,12
Seminoma	7	2,3
Sarcoma de Ewing	3	1,0
Esclerose múltipla	3	1,0
Leucemia linfóide aguda	1	0,3
Neuroblastoma	1	0,3
Plasmocitoma	1	0,3
Histiocitose X	1	0,3
Tumor de ovário	1	0,3
Amiloidose	1	0,3
Total	307	100

5.2 Variáveis pré-regime de mobilização

5.2.1 Tempo de doença e tratamento prévio administrado

O intervalo mediano de tempo entre o diagnóstico e o início do regime de mobilização nos pacientes incluídos na análise foi de 17 meses (2 – 144).

Os dados quanto ao tratamento anterior com radioterapia e administração prévia de agentes alquilantes, mitoxantrone e análogos da platina, podem ser vistos na Tabela 5.

Tabela 5 – Número de pacientes em relação à terapia prévia administrada

Terapia prévia	Número de pacientes		
	Sim	Não	Total
Radioterapia	87 (28,34%)*	220 (71,66%)	307
Agentes alquilantes	203 (66,12%)	104 (33,88%)	307
Mitoxantrone	26 (8,47%)	281 (91,53%)	307
Análogos da Platina	65 (21,17%)	242 (78,83%)	307

* (porcentagem de pacientes)

Dos 87 pacientes submetidos a tratamento prévio com radioterapia, 84 (96,6%) receberam uma seqüência de tratamento com radioterapia e 03 (3,4%) duas seqüências de tratamento com radioterapia em momentos diferentes ao longo da doença. Das 90 seqüências de tratamento com radioterapia, administradas aos 87

pacientes: 36 foram em campo estendido - 30 (33,3%) em manto, 06 (6,7%) infradiafragmáticas, e 54 (60%) foram em campo envolvido.

O número mediano de ciclos de quimioterapia administrados antes do regime de mobilização foi 8 (1 – 19). A distribuição do tipo de droga quimioterápica administrada antes da mobilização de células progenitoras hematopoéticas em relação ao diagnóstico pode ser vista na Tabela 6.

Tabela 6 – Tipo de droga quimioterápica administrada, previamente, em relação ao diagnóstico.

Diagnóstico	Número de pacientes		
	Agentes alquilantes	Mitoxantrone	Análogos da platina
Mieloma múltiplo	25 (12,3%)*	-	1 (1,5%)
Linfoma de Hodgkin	56 (27,6%)	1 (3,9%)	23 (35,4%)
Linfoma não Hodgkin	84 (41,4%)	15 (57,7%)	29 (44,6%)
Leucemia mielóide aguda	21 (10,3%)	7 (26,9%)	1 (1,5%)
Leucemia linfóide aguda	1 (0,5%)	-	-
Amiloidose	1 (0,5%)	-	-
Seminoma	7 (3,4%)	-	7 (10,8%)
Sarcoma de Ewing	3 (1,5%)	-	2 (3,8%)
Neuroblastoma	1 (0,5%)	-	1 (1,5%)
Tumor de ovário	1 (0,5%)	-	1 (1,5%)
Esclerose múltipla	3 (1,5%)	3 (11,5%)	-
Total	203	26	65

* (porcentagem de pacientes)

5.2.2 Situação clínica da doença no início da mobilização

No início da mobilização de CPH: 252 pacientes se encontravam em remissão completa (82%) e 55 estavam em remissão parcial (18%); 10 pacientes se encontravam com medula óssea infiltrada pela doença de base (3,25%) e 297 pacientes se encontravam com medula óssea não infiltrada pela doença (96,75%). Dos 10 pacientes com medula óssea infiltrada pré-mobilização, 09 apresentavam diagnóstico de Mieloma múltiplo e 01 de Amiloidose (Tabela 7)

Tabela 7 – Atividade da doença no início da mobilização de CPH.

Situação clínica no início da mobilização	Número de pacientes	Porcentagem de pacientes (%)
Medula Óssea		
Infiltrada	10	3,25
Não infiltrada	297	96,75
Total	307	100
Remissão completa		
Sim	252	82
Não	55	18
Total	307	100

5.2.3 Contagem de plaquetas ao início da mobilização

A contagem mediana de plaquetas ao início do regime de mobilização foi de $230 \times 10^3/\text{mm}^3$ ($53 \times 10^3/\text{mm}^3$ – $578 \times 10^3/\text{mm}^3$). Dos 307 pacientes do estudo, 26

(8,5%) apresentavam contagem plaquetária $<150 \times 10^3$ plaquetas/mm³ no início da mobilização e 281 (91,5%) apresentavam contagem plaquetária $\geq 150 \times 10^3$ plaquetas/mm³.

5.3 Regime de Mobilização Utilizado

Em todos os pacientes incluídos na análise, o regime de mobilização utilizado foi baseado na associação de ciclofosfamida e G-CSF (Tabela 8). Para a mobilização, a dose mediana de ciclofosfamida administrada foi de 120mg/(kg de peso) (60mg/kg de peso – 120mg/kg de peso) e a dose mediana diária de G-CSG foi de 10,0μgG-CSG/kg/dia (6μg G-CSG /kg/dia – 17μg G-CSG /kg/dia).

Tabela 8 – Regime de mobilização: doses administradas de ciclofosfamida e de G-CSF.

CICLOFOSFAMIDA		
Dose (mg/kg de peso)	Número de pacientes	Porcentagem de pacientes (%)
120	259	84,36
100 – 119	23	7,49
80 – 99	15	4,89
60 – 79	10	3,26
Total	307	100

Continua

Continuação Tabela 8

G-CSF		
Dose ($\mu\text{g/kg/dia}$)	Número de pacientes	Porcentagem de pacientes (%)
15-17	19	6,2
13-14	15	4,9
11-12	87	28,3
8-10	184	60
6-7	2	0,6
Total	307	100

5.4 Resposta ao regime de mobilização

Dos 307 pacientes incluídos na análise, observou-se:

1. Sucesso na resposta à mobilização:

Em 260 pacientes (84,7%) foi possível coletar um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso do paciente) com até três procedimentos de leucaférese. Estes pacientes foram categorizados como ‘sucesso na mobilização’. Dos pacientes que apresentaram sucesso na mobilização, em 124 (47,7%) foi possível coletar um número $\geq 4,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso).

2. Insucesso na resposta à mobilização:

Em 24 pacientes (7,8%) não foi possível coletar um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso do paciente) com até três procedimentos de leucaférese. Estes pacientes foram categorizados como ‘insucesso na mobilização’;

Em 23 pacientes (7,5%) o valor mínimo de 10 de células CD34+ no sangue periférico (/mm³) para realização de procedimento de coleta por leucaférese não foi atingido e, por isso, estes pacientes foram submetidos à coleta de CPH por punção medular. Estes pacientes também foram categorizados como ‘insucesso na mobilização’.

A Tabela 9 mostra o número de procedimentos de leucaférese por paciente.

Tabela 9 - Número de procedimentos de leucaférese por paciente.

Número de leucaféreses	Número de pacientes	Porcentagem de pacientes (%)
Necessárias para coletar um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg peso do paciente) em pacientes que tiveram sucesso na mobilização		
01	144	50,7
02	93	32,8
03	23	8,1
Realizadas nos pacientes em que não foi possível coletar $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso) com até 3 procedimentos		
04	18	6,4
05	3	1,0
06	2	0,7
10	1	0,3
Total	284	100

5.5 Coleta de CPH do sangue periférico por leucaférese

No total, foram realizados 508 procedimentos de leucaférese para coleta de CPH de sangue periférico em 284 pacientes: 411 (80,9%) em equipamento Spectra

(Cobe), 88 (17,3%) em equipamento CS 3000 Plus (Baxter) e 9 (1,8%) em equipamento AS104 (Fresenius). O número mediano de procedimentos de leucaférese realizado por paciente foi 1,0 (1-10 procedimentos).

O número mediano de volemias processadas por procedimento de leucaférese foi 3,81 (1,53 – 7,09 volemias). O volume sanguíneo mediano processado por procedimento de leucaférese foi de 16.000mL (6.000mL – 30.000mL).

5.6 Análise univariada das variáveis pré-mobilização

A Tabela 10 mostra a análise univariada das variáveis pré-mobilização e das variáveis relacionadas com a coleta de CPH, correlacionando-as com o sucesso na resposta ao regime de mobilização utilizado.

Tabela 10 - Análise univariada entre variáveis pré-mobilização e coleta e resposta à mobilização (mediana)

Características	Resposta à mobilização		P*
	Sucesso	Insucesso	
Idade (anos)	44	41	0,1420
Sexo (%)			
Feminino	87,8	12,2	0,1046
Masculino	81,1	18,9	
Diagnóstico** (%)			
1	95,8	4,2	<0,0001
2	86,0	14,0	

Continua

Continuação Tabela 10

3	74,1	25,9	
4	64,3	35,7	
5	89,5	10,5	
Diagnóstico*** (%)			
1	95,8	4,2	<0,0001
2	76,	23,5	
Medula óssea infiltrada ao início do regime de mobilização (%)			
Não	84,5	15,5	0,5597
Sim	90	10	
Doença em remissão clínica no início do regime de mobilização (%)			
Sim	83,7	16,3	0,3172
Não	89,1	10,9	
Tempo de doença (meses)	16	24	0,020
Nº de ciclos de quimioterapia pré-mobilização	7	10	0,0001
< 10 ciclos	91,5%	8,5%	<0,0001
≥ 10 ciclos	73,3%	26,7%	
Tratamento prévio com agentes alquilantes (%)			
Sim	79,3	20,7	0,0003
Não	95,2	4,8	
Tratamento prévio com mitroxantrone (%)			
Sim	61,5	38,5	0,0006
Não	86,8	13,2	
Tratamento prévio com análogos da platina (%)			
Sim	84,6	15,4	0,9849
Não	84,7	15,3	
Tratamento prévio com radioterapia (%)			
Sim	88,5	11,5	0,9849
Não	83,2	16,8	
Nº plaquetas pré-mobilização (x10³/mm³)	236	200	0,0001
≥ 150	86,8%	13,2%	0,0006
< 150	61,5%	38,5%	

Continua

Continuação Tabela 10

Volume sangüíneo processado em cada procedimento de leucaférese (mL)	15.600	14.400	0,3364
Número de volemias sangüíneas processadas/procedimento de leucaférese	3,8	3,9	0,5320
Intervalo entre o início do regime de mobilização e o pico de células CD34+ no sangue periférico (dias)	14	23	<0,0001
< 20 dias	97,4	2,6	<0,0001
≥ 20 dias	69,1	30,9	
Total (%)	260 (84,7%)	47 (15,3%)	

*P = significância estatística; **1 = Mieloma múltiplo; 2 = Linfoma de Hodgkin; 3 = Linfoma não Hodgkin; 4 = Leucemia mielóide aguda e 5 = outros; ***1 = Mieloma múltiplo; 2 = Linfoma de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin e Leucemia mielóide aguda

5.6.1 Sexo e Idade com relação ao sucesso na resposta à mobilização

As variáveis numéricas sexo e idade, não tiveram influência significativa na resposta ao regime de mobilização (P = 0,1420 e P = 0,1046, respectivamente).

5.6.2 Diagnóstico com relação ao sucesso na resposta à mobilização

Com relação ao diagnóstico, os pacientes foram inicialmente classificados em cinco categorias: MM, LH, LNH, LMA e Outros. A distribuição de pacientes com sucesso e insucesso na resposta à mobilização de acordo estas cinco categorias de diagnóstico, pode ser visto na Figura 4. Os resultados mostraram que o comportamento de resposta à mobilização entre os pacientes com diferentes

diagnósticos foi significativamente diferente ($P < 0,0001$). Os pacientes com LMA apresentaram o menor percentual de sucesso e os pacientes com diagnóstico de MM, o maior percentual de sucesso. A chance de sucesso na mobilização em um paciente com diagnóstico de MM foi 12,5 vezes maior do que em um paciente com LMA (OR = 12,555; IC 95% 3,846 - 40,989). A chance de sucesso em pacientes com diagnóstico de LH e LNH foi respectivamente 3,4 vezes maior (OR = 3,403; IC 95% 1,161-9,973) e 1,6 vezes maior (OR = 1,591; IC 95% 0,639-3,963) do que em pacientes com diagnóstico de LMA.

Figura 4 – Diagnóstico (MM x LH x LNH x LMA x Outros) em relação ao sucesso na resposta à mobilização

Quando os pacientes foram categorizados de acordo com o diagnóstico em apenas duas categorias: MM (categoria 1) e LH, LNH e LMA (categoria 2) e estas categorias comparadas, observamos que o sucesso na resposta à mobilização foi

observado em 95,8% nos pacientes da categoria 1 e em 76,5% nos pacientes da categoria 2 ($P < 0,0001$) (Figura 5).

Figura 5 – Diagnóstico (MM x LNH, LH, LMA) em relação ao sucesso na resposta à mobilização

5.6.3 Número prévio de ciclos de quimioterapia com relação ao sucesso na resposta à mobilização

De acordo com os resultados encontrados, houve diferença no comportamento desta variável entre os dois grupos. O número (mediano) de ciclos de quimioterapia administrado previamente foi 07 nos pacientes com sucesso na resposta e 10 nos pacientes com insucesso ($P = 0,0001$). Entre os pacientes que receberam um número menor do que 10 ciclos de quimioterapia antes da mobilização, 91,5% apresentaram sucesso na mobilização e 8,5% insucesso. No grupo que recebeu previamente um número igual ou superior a 10 ciclos de

quimioterapia, estas porcentagens foram de 73,3% e 26,7%, respectivamente ($P < 0,0001$). A chance de um paciente apresentar sucesso na mobilização diminuiu 1,77 vezes ($OR=0,849$; IC 95% 0,784 - 0,920) a cada ciclo adicional de quimioterapia administrado. A influência do número de ciclos de quimioterapia na resposta à mobilização pode ser visto na Figura 6, na qual a intensidade do tratamento prévio com quimioterapia foi estratificada em 04 grupos. Conforme pode ser observado, existe uma relação entre o número prévio de ciclos de quimioterapia e o sucesso na resposta à mobilização, com redução no sucesso da resposta nos pacientes que receberam um número igual ou maior do que 10 ciclos de quimioterapia ($P < 0,0001$).

Figura 6 – Número prévio de ciclos de quimioterapia em relação ao sucesso na resposta à mobilização

5.6.4 Tipo de tratamento administrado previamente em relação ao sucesso na resposta à mobilização

De acordo com a análise univariada, a administração anterior ao regime de mobilização de agentes alquilantes e de mitoxantrone apresentou influência significativa na resposta ao regime de mobilização.

Entre os pacientes que receberam agentes alquilantes antes da mobilização, 20,7% apresentaram insucesso na resposta contra 4,8% dos pacientes que não foram tratados previamente com esta classe de drogas citotóxicas ($P = 0,0003$). A chance de sucesso na mobilização de um paciente que não recebeu agente alquilante previamente foi, aproximadamente, cinco vezes maior do que um paciente que recebeu ($OR = 5,165$; IC 95% 1,977 – 13,496).

Com relação à administração prévia de mitoxantrone, 38,5% dos pacientes com insucesso na mobilização receberam mitoxantrone previamente e 13,2% não receberam mitoxantrone antes da mobilização ($P = 0,0006$). A chance de sucesso foi aproximadamente quatro vezes maior nos pacientes que não receberam mitoxantrone em relação aos pacientes que receberam mitoxantrone ($OR = 4,122$; IC 95% 1,740-9,764).

A administração prévia de análogos da platina e tratamento prévio com radioterapia não influenciaram significativamente o comportamento dos pacientes com relação à resposta ao regime de mobilização ($P = 0,9849$ nas duas variáveis).

5.6.5 Contagem de plaquetas pré-mobilização em relação ao sucesso na resposta à mobilização

Os resultados encontrados na análise univariada indicam que houve diferença significativa no comportamento da variável contagem de plaquetas pré-mobilização entre as duas categorias de resposta. A contagem mediana de plaquetas pré-mobilização ($\times 10^3$ plaquetas/ mm^3) no grupo com sucesso e insucesso na mobilização foi 236 e 200, respectivamente ($P = 0,0001$). Quando a contagem de plaquetas foi estratificada em <150.000 plaquetas/ mm^3 e $\geq 150.000/\text{mm}^3$, observamos que entre os pacientes que apresentaram insucesso na mobilização, 13,2% tiveram contagem de plaquetas ≥ 150.000 plaquetas/ mm^3 antes da mobilização contra 86,8% dos pacientes com sucesso na resposta ($P = 0,0006$). Na Figura 7, a relação entre a contagem de plaquetas pré-mobilização e a resposta ao regime de mobilização fica bem evidenciada. Como se pode observar, houve uma relação entre a contagem de plaquetas no sangue periférico antes da mobilização e o percentual de sucesso na resposta à mobilização. Pacientes com contagem plaquetária >250.000 plaquetas/ mm^3 apresentaram percentual de 92% (116 de 126 pacientes) de sucesso na mobilização. Inversamente, pacientes com contagem plaquetária <150.000 plaquetas/ mm^3 apresentaram percentual de 61,5% (16 de 26 pacientes) de sucesso na mobilização.

Figura 7 - Contagem de plaquetas pré-mobilização em relação ao sucesso na resposta à mobilização

5.6.6 Atividade da Doença e Infiltração Medular com relação ao sucesso na resposta à mobilização

As variáveis categóricas: doença em atividade e infiltração medular ao início da mobilização não apresentaram influência significativa na resposta ao regime de mobilização ($P = 0,5597$ e $P = 0,3172$, respectivamente). O comportamento dos pacientes em remissão clínica ou atividade da doença e com medula óssea infiltrada e não infiltrada imediatamente antes do início da mobilização, foi o mesmo nas duas categorias de resposta.

5.6.7 Tempo de Doença em relação ao sucesso na resposta à mobilização

Com relação ao tempo de doença, a análise univariada indicou que houve diferença de comportamento entre as duas categorias de resposta. O intervalo mediano entre o diagnóstico da doença e o início do regime de mobilização foi de 16 meses nos pacientes com sucesso e 24 meses nos pacientes com insucesso na resposta à mobilização ($P = 0,020$).

5.6.8. Intervalo de tempo compreendido entre o início do regime de mobilização e pico no número de células CD34+ no sangue periférico em relação ao sucesso na resposta à mobilização

O intervalo mediano (em dias) entre o início da quimioterapia mielossupressora de mobilização e o pico no número de células CD34+ no sangue periférico ($/\text{mm}^3$) foi de 14 dias para os pacientes com sucesso na mobilização e de 23 dias para os pacientes com insucesso ($P < 0,0001$).

Quando os pacientes foram estratificados em duas categorias (intervalo menor do que 20 dias e intervalo igual ou maior que 20 dias), encontramos 2,6% dos pacientes com insucesso na resposta na categoria intervalo menor que 20 dias e 30,9% dos pacientes com insucesso na categoria igual ou superior a 20 dias de intervalo ($P < 0,0001$).

A Tabela 11 e a Figura 8 mostram os resultados encontrados quando

analisamos o intervalo (em dias) entre o início da mobilização e o pico no número de células CD34+ no sangue periférico, estratificando os pacientes analisados em cinco grupos. De acordo com os resultados, pode-se observar uma relação entre esta variável e o desfecho. Quanto maior foi este intervalo, menor foi a chance de sucesso na obtenção de um número $\geq 2,0 \times 10^6$ células CD34+ com até três procedimentos de leucaférese: a chance de um paciente apresentar sucesso na mobilização foi 1,22 vezes maior (OR = 0,815; IC 95% 0,753 - 0,882) a cada diminuição de 01 dia neste intervalo.

Tabela 11 - Intervalo de tempo entre o início da mobilização e o pico referente ao número de células CD34+ no sangue periférico (/mm³) em relação à resposta à mobilização.

Intervalo (dias)	Resposta à mobilização		Número de Pacientes
	Sucesso	Insucesso	
Até 10	100%	0%	04
De 11 a 15	98%	2%	168
De 16 a 19	95%	5%	56
De 20 a 30	69%	31%	52
Acima de 30	7%	93%	27
Total			307

Figura 8 - Intervalo de tempo (em dias) entre o início da mobilização e o pico referente ao número de células CD34+ no sangue periférico (/mm³) com relação à resposta à mobilização

5.7 Análise Multivariada

A Tabela 12 mostra as variáveis pré-mobilização que entraram para o modelo de regressão logística (todas as variáveis com $P < 0,05$ na análise univariada). A variável contínua: intervalo de tempo entre o início da mobilização e o pico no número de células CD34+ no sangue periférico não foi incluída na análise multivariada por não ser considerada uma característica que o paciente apresentava antes do regime de mobilização, esta variável já pode ser considerada como resposta à mobilização.

Tabela 12 - Regressão das variáveis associadas à resposta à mobilização

Variável	<i>Odds ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	P**
Diagnóstico (1 vs. 2)*	3,363	(1,180 - 9,583)	0,0232
Nº de ciclos de quimioterapia pré-mobilização	0,891	(0,811 - 0,979)	0,0167
Nº de plaquetas pré-mobilização (≥ ou <150.000plaquetas/mm³)	2,691	(1,035 - 6,994)	0,0423
Tratamento prévio com agente alquilante			0,7142
Tratamento prévio com mitroxantrone	2,867	(1,117 - 7,357)	0,0285
Tempo de doença (meses)			0,5203

*1 = Mieloma múltiplo; 2 = Linfoma de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin e Leucemia mieloide aguda;

**P = significância estatística

Após o modelo de regressão logística, as variáveis pré-mobilização que se mantiveram como fatores independentes, associados com a resposta ao regime mobilizador de células progenitoras utilizado foram: diagnóstico (categoria 1 x categoria 2), número de ciclos de quimioterapia administrados antes da mobilização, tratamento prévio com mitroxantrone e contagem de plaquetas pré-mobilização (/mm³).

5.8 Variáveis pós-regime de mobilização (pré-leucaférese) e correlação com o número de células CD34+ no produto coletado

Para investigar o potencial das variáveis pré-leucaférese: leucometria, número absoluto de células CD34+ e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese como parâmetros preditivos do rendimento da coleta de CPH, as três variáveis foram correlacionadas com a contagem de células CD34+ no componente coletado por leucaférese. O objetivo foi estabelecer qual dessas variáveis apresenta a melhor relação estatística com o número de CPH do produto coletado. As medidas destas variáveis estão descritas na Tabela 13.

Tabela 13 - Medidas descritivas e desvio padrão das variáveis pré-leucaférese: número de leucócitos (/mm³), número de absoluto de células CD34+ (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico, e número de células CD34+ no produto coletado

Variável	Média	DP*	Mínimo	Máximo	Mediana
Leucócitos	23.946	16.163,49	900	75.000	21.100
CD34+ pré-	44,69	94,86	1	1111	16
CD34+ (%)	0,46	1,19	0,005	15,5	0,1
CD34+ produto coletado	3,21	5,09	0,05	46	1,50

*DP = desvio padrão

As variáveis: leucometria (/mm³), número absoluto de células CD34+ (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese correlacionaram-se de maneira estatisticamente significativa com a variável do número de células CD34+ no produto coletado por leucaférese, conforme mostram a Tabela 14 e as Figuras 9, 10 e 11.

Tabela 14 - Correlações de Spearman entre as variáveis: número de leucócitos (/mm³), número absoluto de células CD34+ (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico e a variável número de células CD34+ no produto coletado

Variável	CD34+ no produto coletado (/mm ³)	P*
CD34+ pré	0,7821	< 0,0001
CD34+ (%)	0,8011	< 0,0001
Leuco Pré	-0,4439	< 0,0001

*P = significância estatística

Figura 9 - Correlação entre nº de leucócitos no sangue periférico pré-leucaférese (/mm³) e o número de células CD34+ no produto coletado ($\times 10^6$ células/kg); R = Coeficiente de correlação

Figura 10 - Correlação entre o número absoluto de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese (/mm³) e o número de células CD34+ no produto coletado ($\times 10^6$ células/kg); R = Coeficiente de correlação.

Figura 11 - Correlação entre a % de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese e o número de células CD34+ no produto coletado ($\times 10^6$ células/kg); R = Coeficiente de correlação.

Como as variáveis: número absoluto de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese apresentaram correlações bem altas com o número de células CD34+ no produto coletado, as duas correlações foram comparadas entre si para que se pudesse avaliar qual das duas apresentava maior correlação com o número de células CD34+ coletado.

Aplicando-se um teste para comparar a correlação CD34+ pré-leucaférese (/mm³) e o número de células CD34+ no produto coletado com a correlação entre a porcentagem de CD34+ no sangue periférico e o número de células CD34+ no produto coletado, não se observou diferença estatisticamente significativa. Portanto,

as duas variáveis, CD34+ pré-leucaférese (/mm³) e a porcentagem de CD34+ no sangue periférico, correlacionam-se de forma semelhante à variável CD34+ bolsa. (teste t, P = 0,14982) (Blalock, 1972). Os resultados podem ser vistos na Tabela 15 e Figura 12.

Tabela 15 - Correlação de Spearman entre relações das variáveis: número absoluto de células CD34+ no sangue periférico (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese com o número de células CD34+ coletadas

Variável	CD34+ (%)	P*
CD34+ pré	0,8678	< 0,0001

*P = Significância estatística

Figura 12 - Correlação entre o número absoluto de células CD34+ (/mm³) e porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese; R = Coeficiente de correlação.

5.9 Número total de células CD34+ infundidas

As medidas descritivas referentes ao número de leucaféreses realizadas por paciente, número de volemias sanguíneas processadas em cada procedimento de leucaférese e número total de células CD34+ coletadas e infundidas por paciente, distribuídas de acordo com as categorias ‘sucesso’ e ‘insucesso’ podem ser vistas na Tabela 16.

Tabela 16 – Medidas descritivas e desvio padrão do número de leucaféreses realizado, número de volemias processadas em cada procedimento e número total de células CD34+ coletado nos pacientes submetidos à coleta por leucaférese e número de células nucleadas coletado nos pacientes submetidos à punção medular

Resposta à mobilização	Sucesso	Insucesso	
		Coleta por leucaférese	Coleta por punção medular
Número de pacientes	260	24	23
Número de leucaféreses realizadas por paciente			
Média	1,54	4,57	-
Mediana	1	4	-
DP*	0,67	1,34	-
Mínimo	1	4	-
Máximo	3	10	-
Número de volemias processadas por procedimento			
Média	3,71	3,89	-
Mediana	3,8	3,9	-
DP*	1,07	1,09	-

Continua

Continuação Tabela 16

Mínimo	1,54	2,27	-
Máximo	7,09	5,75	-
Número total de células CD34+ coletado / paciente (x 10⁶ células CD34+/kg de peso)			
Média	5,9	2,12	-
Mediana	3,67	2,02	-
DP*	5,92	0,42	-
Mínimo	2	1,64	-
Máximo	46	3,75	-
Número total de células nucleadas coletado/paciente (x 10⁸ células/kg de peso)			
Média	-	-	2,37
Mediana	-	-	1,95
DP*	-	-	1,31
Mínimo	-	-	0,64
Máximo	-	-	5,18

*DP = desvio padrão

5.10 Sobrevida Global dos Pacientes

Dos 307 pacientes incluídos no estudo, 265 (86,3%) foram considerados elegíveis para a análise de sobrevida e 42 pacientes (13,7%) foram considerados inelegíveis para análise de sobrevida. A Tabela 17 mostra as características dos pacientes de acordo com a elegibilidade para a análise de sobrevida.

Tabela 17 – Características dos pacientes de acordo com a elegibilidade para análise de sobrevida (mediana)

Características	Análise de Sobrevida	
	Elegíveis	Inelegíveis
Resposta à mobilização (%)		
Sucesso	85,0	83,3
Insucesso	15,0	16,7
Idade (anos)	44	39
Sexo (%)		
F	48,3	35,7
M	51,7	64,3
Diagnóstico* (%)		
1	41,1	40,0
2	58,9	60,0
Medula óssea infiltrada previamente ao regime de mobilização (%)		
Não	96,2	97,7
Sim	3,8	2,3
Doença em remissão clínica no início do regime de mobilização (%)		
Sim	81,5	85,7
Não	18,5	14,3
Tempo de doença (meses)	16	19
Nº prévio de ciclos de quimioterapia	8	8
Tratamento prévio com agente alquilante (%)		
Sim	65,7	69,0
Não	34,3	31,0
Tratamento prévio com mitroxantrone (%)		
Sim	8,7	7,1
Não	91,3	92,9
Tratamento prévio com análogos da platina (%)		
Sim	22,6	12,0
Não	73,4	88,0
Tratamento prévio com radioterapia (%)		
Sim	26,4	40,4

Continua

Continuação Tabela 17

Não	73,6	59,6
Nº de plaquetas pré-mobilização (%)		
$\geq 150 \times 10^3$ plaquetas/mm ³	91,7	90,5
$< 150 \times 10^3$ plaquetas/mm ³	8,3	9,5
Número de plaquetas pré-mobilização ($\times 10^3$ plaquetas/mm³)	230	228
Intervalo entre início da mobilização e pico no número de células CD34+ no sangue periférico (dias)		
< 20 dias	80,3	81,6
≥ 20 dias	19,7	18,4
Total – valor (%)	265 (86,3)	42 (13,7)

*1 = Mieloma múltiplo; 2 = Linfoma de Hodgkin, Linfoma não-Hodgkin e Leucemia mielóide aguda

Entre os 265 pacientes elegíveis para análise de sobrevida, 22 (8,3%) foram a óbito nos primeiros 100 dias do transplante autólogo. Destes, 21 pacientes apresentaram sucesso na resposta à mobilização e 01 teve insucesso na resposta.

A Figura 13 mostra a curva de sobrevida global após transplante de medula óssea de 265 pacientes elegíveis para análise de sobrevida. A Figura 14 mostra a curva de sobrevida dos mesmos pacientes, categorizados de acordo com a resposta ao regime de mobilização. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

Figura 13 - Sobrevida global dos pacientes elegíveis para esta análise.

Figura 14 - Sobrevida de acordo com resposta à mobilização de células progenitoras.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que não houve diferença na sobrevida dos pacientes que apresentaram sucesso no regime de mobilização quando comparada com os pacientes que não apresentaram sucesso na resposta à mobilização ($P = 0,4184$). A análise mostrou uma sobrevida além de 65 meses, de 60% nos pacientes com sucesso e 62% nos pacientes com insucesso.

A Figura 15 mostra a curva de sobrevida dos pacientes com diagnóstico de Linfoma de Hodgkin, Linfoma não Hodgkin e Leucemia mielóide aguda, categorizados de acordo com a resposta ao regime de mobilização. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

Figura 15 - Sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LH, LNH e LMA, de acordo com resposta à mobilização de células progenitoras

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que também não houve diferença na sobrevida dos pacientes com diagnóstico de LH, LNH e LMA que apresentaram sucesso no regime de mobilização quando comparada com os pacientes que não apresentaram sucesso na resposta à mobilização ($P = 0,4066$). A análise mostrou uma sobrevida além de 65 meses, de 58% nos pacientes em ambos os grupos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A determinação do número de células CD34⁺ no componente coletado por leucaférese atualmente representa o principal parâmetro utilizado na prática clínica para avaliação da qualidade do produto de CPH coletado de sangue periférico. Um número de células CD34⁺ igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células/(kg de peso do receptor) tem sido reportado como quantitativamente adequado para promover a recuperação hematopoética em transplantes autogênicos. A infusão desta dose é associada com 95% de probabilidade de recuperação de neutrófilos e plaquetas em um período menor do que três semanas.

Para obter essa dose mínima de células CD34⁺ do sangue periférico, as CPH necessitam ser mobilizadas do compartimento medular para a circulação. Esta mobilização pode ser obtida com a administração isolada ou combinada de quimioterapia mielossupressora e de fatores de crescimento hematopoéticos. A administração seqüencial de quimioterapia e G-CSF é a maneira mais eficaz de recrutamento de células CD34⁺ para o sangue periférico. Por isso este regime de mobilização tem sido preferido em transplantes autogênicos.

O sucesso na resposta à mobilização aumenta a probabilidade de coleta da dose adequada de células progenitoras com menor número de procedimentos de leucaférese. No entanto, 10-30% dos pacientes apresentam resposta ruim ao regime de mobilização (Kuittinen, 2004). Algumas variáveis pré-mobilização têm sido

citadas como fatores que podem influenciar na resposta à mobilização de CPH, entre elas: carga prévia de quimioterapia e radioterapia administrada, exposição a determinadas classes de drogas antineoplásicas (fludarabina, agentes alquilantes, mitoxantrone, análogos da platina, talidomida), envolvimento medular pela doença de base, tempo entre o diagnóstico da doença e o início da mobilização, sexo, idade e contagem de plaquetas pré-mobilização. A definição de fatores preditivos de resposta ruim à mobilização é importante para identificação de pacientes que se beneficiariam de regimes mobilizadores mais agressivos.

A presente análise reporta a experiência de uma única instituição com 307 pacientes com diagnósticos variados, submetidos à mobilização de CPH antes da realização de transplante autogênico de medula óssea; e avalia os fatores que influenciaram a qualidade do componente de CPH coletado de sangue periférico por leucaférese. Para minimizar o efeito do regime mobilizador como uma variável que pudesse confundir a resposta, foram considerados apenas pacientes que foram submetidos a um mesmo regime de mobilização. Como estudos anteriores demonstraram superioridade na capacidade de mobilização dos regimes compostos da combinação de quimioterapia e fator de crescimento hematopoético, escolhemos para a análise os pacientes que haviam sido submetidos à mobilização com administração sequencial de ciclofosfamida e G-CSF.

O regime de mobilização utilizado nos pacientes do estudo permitiu a coleta de um número adequado de células CD34+ com até três procedimentos de leucaférese em 84,7% dos pacientes. Em 124 pacientes (40,4% do total e 47,7% dos

que apresentaram sucesso na mobilização) foi possível obter um número total de células CD34+/(kg de peso) igual ou superior a $4,0 \times 10^6$ células. Inversamente, 15,3% dos pacientes analisados apresentaram insucesso na resposta à mobilização, definida pela incapacidade de responder com pico no número de células CD34+ no sangue periférico que permita a coleta por leucaférese ou de coletar um número igual ou superior a $2,0 \times 10^6$ células CD34+/(kg de peso do sangue periférico) com até três procedimentos de leucaférese.

De acordo com a análise univariada, as variáveis associadas com resposta ruim à mobilização de CPH foram: diagnóstico, tempo decorrido entre o diagnóstico e o início da mobilização, número cumulativo de ciclos de quimioterapia pré-mobilização, tratamento prévio com agentes alquilantes e mitoxantrone, baixa contagem plaquetária pré-mobilização e intervalo entre o início da mobilização e pico de no número de células CD34+ no sangue periférico.

Quando foi considerada a análise multivariada os fatores que permaneceram relacionados com insucesso na resposta à mobilização foram: diagnóstico (MM x LH, LNH, LMA), número de ciclos de quimioterapia administrados previamente à mobilização, tratamento prévio com mitroxantrone e contagem de plaquetas pré-mobilização.

De uma maneira geral, a capacidade de resposta à mobilização de pacientes com doenças onco-hematológicas é menor do que a de pacientes com tumores sólidos, em parte por causa da intensidade do tratamento mielossupressor

administrado previamente. Pacientes com diagnóstico de LMA, LH e LNH são piores mobilizadores do que pacientes com tumor de mama ou de testículo (Freuhauf, Seggewiss, 2003). Quando a patologia hematológica representa uma doença primária das células progenitoras hematopoéticas, o diagnóstico apresenta uma influência negativa adicional na resposta à mobilização (Yu et al., 1999): a mobilização de CPH em pacientes com LMA apresenta pior resposta do que em pacientes com outras patologias tumorais oncológicas (Jowit et al., 1998; Pastore et al., 2004; Koenigsmann et al., 2004). Nossos resultados foram concordantes com esses relatos. Entre os pacientes com patologias onco-hematológicas, aqueles com diagnóstico de LMA apresentaram a menor taxa de sucesso na resposta ao regime de mobilização (35,7%), seguidos pelos pacientes com diagnóstico de LNH (25,9%) e LH (14,0%). Por outro lado, observamos que os pacientes com diagnóstico de MM tiveram o menor índice de insucesso (4,2%).

Embora a carga de quimioterapia administrada seja o fator pré-mobilizador mais frequentemente envolvido com má resposta à mobilização, a diminuição da reserva de CPH e a alteração do estroma medular causados pela própria doença, foram fatores importantes relacionados com mobilização ruim em nossa análise. Isto fica evidente quando comparamos a carga de quimioterapia cumulativa administrada previamente nos pacientes com diagnóstico de LMA e MM em nossa série. O número mediano de ciclos de quimioterapia administrado aos pacientes com diagnóstico de LMA foi 04 (1-13); nos pacientes com MM, os quais tiveram a melhor resposta à mobilização, o número mediano de ciclos de quimioterapia administrado foi 05 (2-18). Mesmo com a menor carga cumulativa de quimioterapia

entre os pacientes com doenças onco-hematológicas, os pacientes com LMA apresentaram a pior resposta à mobilização observada em nossa série. Esse resultado confirma que os pacientes com diagnóstico de LMA são realmente de risco para apresentar resposta ruim à mobilização.

Os resultados que encontramos na mobilização de pacientes com diagnóstico de MM também foram concordantes com os dados publicados anteriormente (Lee et al., 2003): pacientes com diagnóstico de MM apresentam ótima resposta ao regime de mobilização. Em nossa análise o sucesso na mobilização dos pacientes com diagnóstico MM foi de 95,8%. Embora na análise multivariada o diagnóstico de MM tenha se mantido como uma variável independente que influencia o sucesso da mobilização, é importante se considerar que a maioria dos pacientes com MM incluídos no estudo, foram tratados com esquema VAD de quimioterapia (Vincristina, Adriamicina e Dexametasona), o qual apresenta baixo impacto sobre a reserva de CPH hematopoéticas. Inversamente, poucos pacientes com diagnóstico de MM foram submetidos a tratamento com melfalano (16,95%; 20/118), droga que afeta substancialmente a probabilidade de obter coleta adequada de células CD34+ de sangue periférico após a mobilização (Prince et al., 1996; Corso et al., 2000). Este fato também pode ter contribuído para os resultados encontrados nos pacientes com MM.

Nossos resultados foram concordantes com outros relatos da literatura ao demonstrar que a carga total de tratamento quimioterápico administrado antes do regime de mobilização, é uma variável que influencia de maneira independente na

resposta à mobilização de células progenitoras (Kotasek et al., 1992; Hass et al., 1994; Shimazaki et al., 1995; Bensinger et al., 1995; Weaver et al., 1997; Ketterer et al., 1998; Carral et al. 2003).

O mecanismo pelo qual o tratamento quimioterápico prévio diminui a concentração de células CD34+ no sangue periférico após a mobilização, não é totalmente conhecido. Estudos experimentais sugeriram que determinadas classes de drogas citotóxicas podem produzir uma redução permanente no número de células tronco e de CPH funcionais da medula óssea, com importante comprometimento da hematopoese em longo prazo (Neben et al., 1993). No entanto, o grau de influência da quimioterapia no número de células tronco da medula e na resposta à mobilização de CPH é difícil de ser apropriadamente mensurado. Isto é causado pelo grande número de agentes rotineiramente administrados, em diferentes doses e em diferentes combinações. Além disso, as drogas quimioterápicas diferem muito entre si quanto a toxicidade sobre as células-tronco hematopoéticas. Estudos prospectivos são necessários para definir e quantificar o efeito da quimioterapia citotóxica e de classes específicas de drogas quimioterápicas na mobilização de CPH.

Drake et al. (1997) e Clark e Brammer (1998) utilizaram um escore para avaliar a influência de determinados agentes quimioterápicos na mobilização de CPH. Os autores encontraram que, entre as várias classes de drogas avaliadas, o melfalano, a carmustina e a mustina foram os que mais apresentaram correlação negativa com o rendimento de células CD34+ coletadas de sangue periférico, seguido por análogos da platina e por inibidores da topoisomerase. Ketterer et al.

(1998) também analisou a ação de diferentes drogas sobre o rendimento da coleta de CPH e reportou que a exposição prolongada a agentes alquilantes e a fludarabina influenciou no rendimento da coleta.

Em nosso estudo, além de analisarmos a influência da carga total de quimioterapia administrada, também analisamos a influência de três classes de drogas citotóxicas na resposta à mobilização: agentes alquilantes, mitoxantrone e análogos da platina. Na análise univariada, os resultados revelaram que a exposição prévia a agentes alquilantes ($P = 0,0003$) e ao mitoxantrone ($P = 0,0006$) está relacionada com o insucesso na resposta à mobilização. O tratamento prévio com análogos da platina ($P = 0,9849$) não mostrou ter influência significativa. No entanto, após análise multivariada, a exposição a agentes alquilantes não se manteve como uma variável de significância independente. Este achado provavelmente ocorreu porque as variáveis: diagnóstico e número prévio de ciclos de quimioterapia tiveram maior influência na resposta à mobilização do que a ação desta classe de drogas. Por outro lado, após a regressão logística, a administração prévia de mitoxantrone permaneceu como um fator independente associado à resposta ruim à mobilização.

A toxicidade do Mitoxantrone sobre o sistema hematopoético já havia sido avaliada anteriormente por Repetto et al. (1999) em treze pacientes com câncer de mama. Os autores observaram que, após quatro ciclos de tratamento com a droga, os pacientes apresentaram uma diminuição significativa na celularidade da medula óssea ($P = 0,0067$) e no conteúdo de medular de CPH ($P = 0,0077$). Também foi observada uma diminuição importante, porém não estatisticamente significativa, no

número basal de células progenitoras hematopoéticas circulantes até oito meses após o término do tratamento. No entanto, existem poucos dados acerca do potencial do mitoxantrone sobre a mobilização de CPH. Nós analisamos a influência específica desta droga, a qual mostrou ter influencia negativa independente na resposta à mobilização ($P = 0,0285$; $OR = 2,867$; $IC\ 95\% 1,117-7,357$). Estes resultados indicam que o mitoxantrone deve ser administrado com cautela em pacientes jovens em que o transplante autogênico de medula óssea encontra-se no planejamento terapêutico. Ainda, os pacientes que receberam tratamento baseado na administração desta droga podem ser considerados para receber um regime mais intenso de mobilização.

Radioterapia prévia também já foi relacionada com má resposta à mobilização, porém parece ter menor efeito sobre a reserva medular do que tratamento com quimioterapia mielossupressora. Estudos anteriores revelaram resultados variados (Hass et al., 1994; Bensinger et al., 1995; Weaver et al., 1997a; Watts et al., 1997; Canales et al., 2001; Gojo et al., 2004). Em nosso estudo, o tratamento radioterápico prévio não teve influência significativa na resposta à mobilização. No entanto, estes resultados podem ser decorrentes do fato de que um reduzido percentual de nossos pacientes foi submetido a tratamento radioterápico (28,33%), e a maioria deles recebeu apenas uma seqüência de tratamento com radioterapia e em campo envolvido. Por esta razão, apesar dos resultados encontrados, não podemos descartar um efeito negativo do tratamento radioterápico anterior à coleta de CPH.

Observações anteriores (Morris et al., 2003; Kuittinen et al., 2004) de que a baixa contagem de plaquetas no sangue periférico pré-mobilização influencia significativamente a coleta de CPH periféricas, foi confirmada em nossa série. A baixa contagem de plaquetas nestes pacientes provavelmente decorre da diminuição da reserva medular causada pela administração sucessiva de drogas citotóxicas para tratamento da doença de base. Em nossa análise, entre os pacientes com contagem plaquetária inferior a 150.000plaquetas/mm³, 38,5% apresentaram insucesso na mobilização contra 13,2% dos pacientes com contagem plaquetária igual ou superior a 150.000plaquetas/mm³ (P = 0,0006). Este achado tem grande importância prática uma vez que pode ser aplicado como um parâmetro preditivo de má resposta à mobilização. Além disso, sugere que a contagem de plaquetas do sangue periférico pré-mobilização pode representar um importante marcador indireto da reserva medular de CPH.

O envolvimento da medula óssea pela neoplasia foi considerado por alguns autores como um fator independente relacionado com má mobilização de CPH (Besinger et al., 1995; Demirer et al., 1996; Micaleff et al., 2000). Estes autores referiram que a infiltração medular por células malignas altera o microambiente medular tornando difícil uma mobilização efetiva. Por outro lado, a redução da infiltração tumoral aumentaria a probabilidade de sucesso na mobilização. Entretanto esta observação não foi confirmada por outros autores. (Kotasek et al., 1992; Moskowitz et al., 1998; Ford et al., 2004a). Esses resultados discrepantes podem estar relacionados com o padrão de infiltração medular e com a possibilidade de coleta de amostra pouco representativa para a análise histológica.

Em nossa análise, o envolvimento medular e atividade da doença pré-mobilização não apresentaram influência significativa na resposta à mobilização de CPH. Este resultado pode ter ocorrido porque a maioria dos pacientes analisados se encontrava em remissão clínica (82,08%) e com medula óssea não infiltrada (96,75%) ao início da mobilização. Para uma melhor análise da influência destas variáveis sobre a resposta ao regime de mobilização, o ideal seria uma distribuição mais homogênea dos pacientes incluídos no estudo quanto à remissão ou não da doença de base e quanto à infiltração ou não da medula óssea ao início da mobilização. No entanto, como a maioria dos pacientes é encaminhada para o transplante autogênico de medula óssea em remissão clínica da doença e, principalmente, com medula óssea sem infiltração, um número adequado de pacientes em atividade ou com medula infiltrada ao início da mobilização para análise da influência destas variáveis sobre a mobilização é difícil e certamente necessitaria um estudo observacional mais prolongado.

Muito embora na população de pacientes houvesse uma importante homogeneidade quanto à dose de G-CSF e ciclofosfamida administrados para mobilização de CPH (aproximadamente 92% dos pacientes receberam dose de ciclofosfamida entre 100µg/kg e 120µg/kg, e 88% receberam dose de G-CSF entre 08µg/kg/dia e 12 µg/kg/dia), nem a dose de G-CSF nem a de ciclofosfamida administradas influenciaram a resposta à mobilização. O aumento da dose de G-CSF até o máximo de 17µg/kg/dia utilizado nos pacientes, não aumentou o índice de sucesso na resposta à mobilização. Esses resultados são consistentes com os resultados encontrados por Andre et al. (2003) os quais, em um estudo prospectivo,

não encontraram diferença significativa no número de células CD34+ de sangue periférico coletado quando doses crescentes de G-CSF (até um máximo de 10µg/kg/dia) foram administradas após terapia mielossupressora para mobilização de CPH. Tem sido sugerido que a administração de altas doses de G-CSF (acima de 20µg/kg/dia) pode ter um efeito mobilizador mais eficiente do que doses convencionais de G-CSF (até 15 µg/kg/dia) (Weaver et al., 1998 ; Stiff, 1999; Kobbe et al., 1999; Boeve et al., 2004). A nossa observação de que o incremento da dose de G-CSF de 8µg/kg/dia a 12µg/kg/dia para até 17µg/kg/dia não apresentou influencia significativa no rendimento da coleta tem grande importância na questão da relação custo/benefício da administração de G-CSF para este fim. Como este incremento na dose do fator de crescimento hematopoético não agregou maior benefício à mobilização, a dose padrão de G-CSF pode ser estabelecida entre 8µg/kg/dia e 12µg/kg/dia para obtenção da resposta esperada. Pequenos aumentos nesta dose ocasionarão aumento do custo sem aumentar a eficiência da mobilização. Os pacientes que não apresentam resposta ao regime de mobilização com doses convencionais de G-CSF podem ser remobilizados com esquemas alternativos ou mais agressivos de mobilização, incluindo altas doses de G-CSF como sugerido.

Dos pacientes que apresentaram pico no número de células CD34+ no sangue periférico em um período inferior a 20 dias do início do regime de mobilização, 97,4% apresentaram sucesso na mobilização. Por outro lado, apenas 69,1% dos pacientes que apresentaram pico no número de células CD34+ no sangue periférico em um período igual ou superior a 20 dias do início do regime mobilizador, tiveram sucesso na mobilização ($P < 0,0001$). Isto significa que, quanto maior o intervalo de

tempo para o paciente atingir pico no número de células CD34+ no sangue periférico após a mobilização, menor é a probabilidade de sucesso. De acordo com nossos resultados, a chance de sucesso na mobilização é aproximadamente 1,22 vezes menor a cada aumento de um dia neste intervalo de tempo. Este achado tem uma importância prática muito grande, pois pode ajudar a responder uma pergunta que todos os transplantadores fazem quando seus pacientes demoram a atingir pico no número de células CD34 + no sangue periférico: “Até quando insistir neste episódio de mobilização?”; “Até que momento se espera que o paciente, ao receber doses convencionais de G-CSF, apresente pico de células CD34+ para iniciar a coleta por leucaférese?”

De acordo com nossos resultados, um intervalo de até 20 dias do início da mobilização poderia ser utilizado como limite de espera para ambas as respostas. Se após este intervalo de tempo o paciente não apresentou um pico no número de células CD34+ no sangue periférico, o episódio de mobilização pode ser considerado um insucesso. Neste momento, o paciente deve ser submetido à coleta de CPH por punção medular, ou planejada uma nova abordagem mobilizadora.

Estudos têm reportado uma forte correlação entre o número absoluto de células CD34+ antes da leucaférese e o número de células CD34+ presente no produto coletado (Knudsen et al., 1998; Moncada et al., 2003; Sarkodee-Adoo et al., 2003; Sawant, Rajadhyaksha, 2005). Em nosso estudo, também encontramos uma relação linear entre essas duas variáveis ($P < 0,0001$); porém, a leucometria e a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese também apresentaram alta correlação com o número de células CD34+ no produto coletado

por leucaférese ($P < 0,0001$ nas duas correlações). No entanto, das três correlações avaliadas, o número absoluto de células CD34+ e a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico apresentaram correlação mais forte com a concentração de CPH no produto coletado do que a leucometria (Coeficiente de correlação (R) = 0,7821; 0,8011 e -0,4439, respectivamente). Nossos dados indicam que o número absoluto e/ou a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico representam parâmetros mais eficientes e equivalentes entre si para monitorização do momento de iniciar a coleta de CPH por leucaférese e como valor preditivo da concentração de células CD34+ no produto da leucaférese do que a leucometria.

Foi interessante observar que a correlação entre a leucometria e o número de células CD34+ coletado em nossa análise foi negativa, ou seja, quanto maior a leucometria, menor o número de células CD34+ no produto coletado. Provavelmente este achado decorre do fato de que, quanto maior a leucometria induzida pela administração prolongada de G-CSF, maior é o número de células polimorfonucleares presentes no sangue periférico. Este percentual alto de células granulocíticas interfere na eficiência do equipamento de aférese em sua capacidade de separar e coletar células mononucleares, resultando em um produto com alto número de células nucleadas no seu conteúdo, porém com baixa porcentagem de células CD34+. Quando o paciente apresenta alta leucometria no sangue periférico à custa de altas contagens no número de células polimorfonucleares, mesmo que haja um número absoluto de células CD34+ adequado no sangue periférico, a eficiência da coleta poderá ficar prejudicada pela intensa contaminação do produto por células granulocíticas. Sendo assim, um bom rendimento e células CD34+ no produto de

leucaférese provavelmente estará mais garantido se o sangue periférico apresentar um alto número absoluto de células CD34+, com baixa leucometria.

Gordan et al. (2003) e Pavone et al. (2006) relataram prognóstico desfavorável em pacientes com resposta ruim à mobilização, submetidos a transplante autogênico de medula óssea. Dos 307 pacientes incluídos em nossa análise, 265 (86,3%) foram elegíveis para análise de sobrevida. Os resultados encontrados nestes pacientes não mostraram diferença significativa na sobrevida dos que apresentaram sucesso na resposta à mobilização, quando comparados com os pacientes que não apresentaram sucesso (*log-rank* test = 0,6548, P = 0,4184). Esse achado talvez seja decorrente do fato de que o número mediano de células CD34+ de sangue periférico infundido nos pacientes que não apresentaram resposta à mobilização foi de $2,02 \times 10^6$ células CD34+/kg de peso (1,64 - 3,75) nos pacientes submetidos a coleta de sangue periférico e de $1,95 \times 10^8$ células mononucleares/kg de peso nos pacientes submetidos a coleta de medula óssea.

Na unidade de TMO do HC FMUSP, a fim de garantir sucesso na enxertia do produto coletado para o transplante autogênico, os pacientes que não apresentam boa resposta à mobilização são submetidos a múltiplos procedimentos de leucaférese até a obtenção de um número aproximado de $2,0 \times 10^6$ células CD34+ /(kg de peso) ou à coleta de CPH por punção medular com obtenção de um número próximo de $2,0 \times 10^8$ células nucleadas/(kg de peso), resultando na infusão de um número adequado de células CPH para garantia da recuperação hematopoética em curto espaço de tempo. Esta pode ser uma das razões pela quais não observamos sobrevida

diferente entre os pacientes das duas categorias de resposta ao regime de mobilização. Este dado sugere que a sobrevida dos pacientes submetidos a transplante autogênico de medula óssea, parece estar mais relacionada com o número de CPH infundido do que com o padrão de resposta à mobilização. Além disso, o sucesso na recuperação hematopoética observado em pacientes que não apresentaram resposta à mobilização e que foram resgatados com CPH coletadas por punção medular indica que a falência na resposta à mobilização nem sempre é decorrente de baixa reserva medular. Outras razões para a não mobilização podem estar envolvidas. Por esta razão, um melhor conhecimento dos mecanismos de mobilização certamente contribuirá para o desenvolvimento de protocolos mais efetivos em não mobilizadores.

Concluindo, o diagnóstico, o número de ciclos de quimioterapia prévia, a exposição à mitoxantrone e a contagem de plaquetas pré-mobilização foram os fatores que apresentaram influência independente na resposta à mobilização. O número absoluto de células CD34+ e a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucafêrese apresentaram correlação equivalente com o número de células CD34+ no produto coletado, porém superior do que a leucometria pré-leucafêrese. A sobrevida das duas categorias de resposta à mobilização não foi estatisticamente diferente.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Em pacientes candidatos a transplante autogênico, os fatores pré-mobilização de células progenitoras hematopoéticas que apresentaram influência na resposta ao regime mobilizador foram: diagnóstico; número de ciclos de quimioterapia administrado; tratamento anterior com mitoxantrone; e contagem de plaquetas no sangue periférico imediatamente antes da mobilização.
2. O insucesso da resposta ao regime de mobilização de células CD34+ não foi um fator prognóstico independente em pacientes submetidos a transplante autogênico de células progenitoras hematopoéticas.
3. O número absoluto de células CD34+ e a porcentagem de células CD34+ no sangue periférico pré-leucaférese apresentaram melhor correlação com o número de células CD34+ no produto coletado do que a leucometria pré-leucaférese.
4. A administração de ciclofosfamida e do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) foi eficaz como regime mobilizador de células progenitoras hematopoéticas em pacientes candidatos a transplante autogênico. O sucesso da resposta à mobilização foi alcançado em 84,7% dos pacientes tratados.
5. Vinte dias de intervalo entre o início da mobilização e o pico de células CD34+ no sangue periférico pode ser utilizado como limite para se considerar falta de

resposta ao regime de mobilização, baseado na administração seqüencial de ciclofosfamida e doses convencionais de fator estimulador de colônias de granulócitos.

REFERÊNCIAS

Referências¹

- Adler BK, Salzman DE, Carabasi MH, Vaughan WP, Reddy VV, Prchal JT. Fatal sickle cell crisis after granulocyte colony-stimulating factor administration. *Blood* 97(10):3313-3314, 2001.
- Akard LP; Thompson JM; Dugan MJ; Wiemann M; Greenspan A; Hanks S; Swinney M; Nyhuis A; Jansen J. Matched pair analysis of hematopoietic progenitor cell mobilization using G-CSF vs. Cyclophosphamide, etoposide and G-CSF: enhanced CD34+ collections are not necessary cost-effective. *Biol Blood Marrow Transplant* 5:379-385; 1999.
- Anderlini P; Chan FA; Champlin RE; Korbling M; Strom SS. Long-term follow-up of normal peripheral blood progenitor cell donors treated with filgrastim: no evidence of increased risk of leukemia development. *Bone Marrow Transplant* 30: 661-663, 2002.
- Andre M, Baudoux E, Bron D et al. Phase III randomized study comparing 5 or 10 µg per kg per day of filgrastim for mobilization of peripheral blood progenitor cells with chemotherapy, followed by intensification and autologous transplantation in patients with nonmyeloid malignancies. *Transfusion* 43(1) 50-57, 2003.
- Arai S, Klingemann HG. Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Archives of Medical Research* 34: 545-553, 2003.
- Armitage JO. Bone Marrow Transplantation. *New England J Med* 330: 827-838, 1994.
- Armitage S, Hargreaves R, Samsom D, et al. CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. 20:587-591, 1997.

¹ De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações e teses. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

- Balaguer H, Galmes A, Ventayol G, et al. Splenic rupture after granulocyte-colony stimulating factor mobilization in a peripheral blood progenitor cell donor. *Transfusion* 44:1260-1261, 2004.
- Bender JG, To LB, Williams S, Schwartzberg LS. Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J Hematother* 1:329-41, 1992.
- Benekli M, Hahn T, Shafi F, Qureshi A, Alam AR, et al. Effect of rituximab on peripheral blood stem cell mobilization and engraftment kinetics in non-Hodgkin's lymphoma patients. *Bone Marrow Transplant* 32:139-143, 2003
- Bensinger W, Appelbaum F, Rowley S, et al. Factors that influence collection and engraftment of autologous peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 13(10):2547-2555, 1995.
- Bensinger W, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematological cancers. *N Engl J Med* 344(3):175-181, 2001.
- Beyer J, Schwella N, Zingsem J, et al. Hematopoietic rescue after high-dose chemotherapy using autologous peripheral-blood progenitor cells or bone marrow: a randomized comparison. *J Clin Oncol* 13:328-35, 1995.
- Blaise D, Kuentz M, Fortainer C, Bourhis JH, et al. Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol* 18:537-546, 2000.
- Blalock, H. *Social Statistics*. New York , McGraw Hill, 1972.
- Boeve S, Strupeck J, Creech S, Stiff PJ. Analysis of remobilization success in patients undergoing autologous stem cell transplants who fail an initial mobilization: risk factors, cytokine use and cost. *Bone Marrow Transplant*. 33(10): 997-1003, 2004.
- Bolwell B, Goormastic M, Yanssens T, et al. Comparison of G-CSG and GM-CSF for mobilizing peripheral blood progenitor cells and enhancing recovery after autologous bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 14:913-8, 1994.
- Breitkreutz I, Lokhorst HM, Raab MS. Thalidomide in newly diagnosed multiple myeloma: influence of thalidomide treatment on peripheral blood stem cell collection yield. *Leukemia* 21:1294-9, 2007.
- Brenner MK, Rill DR, Moen RC, et al. Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 341:85-86, 1993.

- Buchta C, Macher M, Bieglmayer C, et al. Reduction of adverse citrate reactions during autologous large-volume PBPC apheresis by continuous infusion of calcium-gluconate. *Transfusion* 43:1615-1621, 2003.
- Calvo W, Fliedner TM, Hebst E. Regeneration of blood forming organs after autologous leukocyte transfusion in lethally irradiated dogs. II. Distribution and cellularity of the marrow in irradiated and transfused animals. *Blood* 47: 593-601, 1976.
- Canales MA, Fernandez-Jiménez MC, Martín A, et al. Identification of factors associated with poor peripheral blood progenitor cell mobilization in Hodgkin's disease. *Haematologica* 86: 494-498, 2001.
- Carral A, et al. Factors influencing the collection of peripheral blood stem cells in patients with acute myeloblastic leukemia and non-myeloid malignancies. *Leukemia Research* 27:5-12, 2003
- Cavins JA, Scheer SC, Thomas ED, Ferrebee JW. The recovery of lethally irradiated dogs given infusions of autologous leukocytes preserved at – 80°C. *Blood* 21: 38-43, 1964.
- Clark RE, Brammer CG. Previous treatment predicts the efficiency of blood progenitor cell mobilization: validation of a chemotherapy scoring system. *Bone Marrow Transplant* 22:859-863, 1998
- Comenzo R, Malachowski M, Miller K, et al. Large volume leukapheresis for collection of mononuclear cells for hematopoietic rescue in Hodgkin's disease. *Transfusion* 35:42-5, 1995.
- Corso A, Caberlon S, Pagnucco G, et al. Blood stem cell collections in multiple myeloma: definition of a scoring system. *Bone Marrow Transplant*. 26:283-286, 2000.
- Cottler-Fox M, Lapidot T. Mobilizing the older patient with myeloma. *Blood Rev* 20:43-50, 2006.
- Couban S, Simpson DR, Barnet MJ, et al. A randomized multicentre comparison of bone marrow and peripheral blood recipients of matched sibling allogeneic transplants for myeloid malignancies. *Blood* 100:1525-1531, 2002.
- Damiani d, Fanin Reanto, Silvestri F, et al. Randomized trial of autologous filgrastim primed bone marrow transplantation versus filgrastim mobilized peripheral blood stem cell transplantation in lymphoma patients. *Blood* 90:36-42, 1997.

- Dawson MA, Schawarer AP, Muirhead JL, et al. Successful mobilization of peripheral blood stem cells using recombinant human stem cell factor in heavily pretreated patients who failed a previous attempt with a granulocyte colony-stimulating factor-based regimen. *Bone Marrow Trnasplant*. 36:389-396, 2005.
- Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, et al. Genetic marking shows that ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to disease relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 83:3068-3072, 1994.
- De Latour RP, Chaoui D, Bourhis JH, Belhocine R, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells after DHAP regimen with or without rituximab: A large multicentre comparative study in patients with malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 48 (5): 897-904, 2007.
- Demirer T, Buckner CD and Besinger WI. Optimization of peripheral blood stem cell mobilization. *Stem Cells* 14 (1): 106-16, 1996.
- Devine SM, Flomemberg N, Vesole DH, et al. Rapid mobilization of CD34⁺ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD-3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 22: 1095-1102, 2004.
- D'Hondt L, Andre M, Guillaume T, et al. Quantification of CD34⁺ cells mobilized into the peripheral blood predicts the yield of the leukapheresis product and can replace progenitor assays. *Cytokines Cell Mol Ther* 3: 21 - 26, 1997.
- Drake M, Ranaghan L, Morris TCM, et al. Analysis of the effect or prior therapy on progenitor cell yield: use of a chemotherapy scoring system. *Br J Haematol* 98: 745-749, 1997.
- Dreger P, Kloss M, Petersen B, Haferlach T, Loffler H, Loeffler M, Schmitz N. Autologous progenitor cell transplantation: prior exposure to stem cell-toxic drugs determines yield and engraftment of peripheral blood progenitor cell but not of bone marrow grafts. *Blood* 86(10):3970-3978, 1995.
- Elfenbein GJ, Sackstein R, Oblon DJ. Do G-CSF mobilized, peripheral blood-derived stem cells from healthy, HLA-identical donors really engraft more rapidly than do G-CSF primed bone marrow-derived stem cells? No! *Blood, Mol Dis* 32:106-111, 2004.
- Elfenbein GJ. Granulocyte-colony stimulating factor primed bone marrow and Granulocyte-colony stimulating factor mobilized peripheral blood stem cells are equivalent for engraftment: Which to choose? *Pediatr Transplant*. 9 (Suppl 7):37-47, 2005.

- Elias AD, Ayash L, Anderson KC, Hunt M, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by chemotherapy and granulocyte macrophage colony stimulating factor for hematologic support after high dose intensification for breast cancer. *Blood* 79:3036, 1992.
- Flomemberg N, Devine SM, DiPersio JF, et al. The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone. *Blood* 106:1867-1874, 2005.
- Ford CD, Green W, Warenski S, Petersen FB. Effect of prior chemotherapy on hematopoietic stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 33:901-905, 2004a.
- Ford CD, Greenwood J, Anderson J, Handrahan D, Petersen FB. Good and poor mobilizing patients differ in mobilized CD34+ cell adhesion molecule profiles. *Transfusion* 44:1769-1773, 2004b.
- Fraipont V, Sautois B, Baudoux E, et al. Successful mobilization of peripheral blood HPCs with G-CSF alone in patients failing to achieve sufficient numbers of CD34+ cells and/or CFU-GM with chemotherapy and G-CSF. *Transfusion* 40:339-347, 2000.
- Fruehauf S, Schmitt K, Veldwijk MR, et al. Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state haemopoiesis enable the estimation of the yield of mobilized PBPC after granulocyte colony-stimulating factor supported cytotoxic chemotherapy: an update on 100 patients. *Br J Haematol* 105(3):786-794, 1999.
- Fruehauf S, Seggewiss R. It's moving day: Factors affecting peripheral blood stem cell mobilization and strategies for improvement. *Br J Haematol* 122:360-375, 2003.
- Gajewski J, Rondon G, Donato ML, et al. Use of Thrombopoietin in Combination with chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor for peripheral blood progenitor cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant.* 8:550-556, 2002.
- Gandhi MK, Jestice K, Scott MA, et al. The minimum CD34 threshold depends on prior chemotherapy in autologous peripheral blood stem cell recipients. *Bone Marrow Transplant.* 23(1):9-13, 1999.
- Gianni AM; Siena S; Bregni M; Tarella C; Stern AC; Pileri A; Bonnadona G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to harvest circulating haematopoietic stem cells for autotransplantation. *Lancet* 2(8663):580-585, 1989.
- Gojo I, Guo C, Sarkodee-Adoo C, Meisenberg B, Fassas A, et al. High-dose cyclophosphamide with or without etoposide for mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with multiple myeloma: efficacy and toxicity. *Bone Marrow Transplant.* 4:69-76, 2004.

- Goldman J. Blood and marrow transplantation: a message from the editor. *Bone Marrow Transplant.* 14(1):1, 1994.
- Goodman JW, Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 19:702-714, 1962.
- Gordan LN, Surgue MW, Lynch JW, Williams KD, Khan SA, et al. Poor mobilization of peripheral blood stem cells is a risk factor for worse outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 44:815-20, 2003.
- Gratwohl A. Overview of transplant activity in Europe. *Hematol J* 5 Suppl 3: S29-33, 2004.
- Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, et al. Results of the EBMT activity survey 2005 on hematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant.* 39: 71-87, 2007.
- Gratwohl A, Baldomero H, Horisberger B, et al. Current trends in hematopoietic stem cell transplantation in Europe. *Blood* 100: 2374-2386, 2002.
- Gratwohl A, Hermans J and Baldomero H. Hematopoietic precursor cell transplants in Europe: activity in 1994. Report from the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Bone Marrow Transplant.* 17: 137-148, 1996.
- Grigg AP, Roberts, AW, Raunow H, Hougton S, Layton JE, Boyd AW, McGrath KM, Mather D. Optimizing dose and scheduling of filgrastim (G-CSF) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 86:4437-4446, 1995.
- Gunn N, Damnon L, Varosy P, Navarro W, Martin T, Ries C, Linker C. High CD34+ cell dose promotes faster platelet recovery after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 9: 643-648, 2003.
- Gutierrez-Delgado F, Bensinger W. Safety of granulocyte colony-stimulating factor in normal donors. *Curr Opin Hematol.* 8:155-160, 2001.
- Haas R, Möhle R, Frühauf S, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 83:3787-3794, 1994.
- Hass R, Witt B, Möhle R, Goldschmidt H, et al. Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. *Blood* 85:3754-3761, 1995.

- Heldal D, Tjoanfjord G, Brinch L, et al. A randomized study of allogeneic transplantation with stem cells from blood or bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 25:1129-1136, 2000.
- Ho AD, Young D, Maruyama M, Corringham RET, Mason JR, Thompson P, Greiner K, Law P, Terstappen LWMM; Lane T. Pluripotent and lineage committed CD34+ substrates in leukapheresis products mobilized by G-CSF, GM-CSF vs. a combination of both. *Exp Hematol*. 24:1460-8; 1996.
- Hui CH, To LB. Future prospects of peripheral blood progenitor cells. *Baillière's Clin Haematol* 12:307-318, 1999.
- Ikeda K, Kozuka T, Harada M. Factors for PBPC collection efficiency and collection predictors. *Transfusion and Apheresis Science* 31: 245-259, 2004.
- Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med*, 12: 1528-1543, 1949.
- Jansen J, Thompson JM, Dugan MJ, et al. Peripheral Blood Progenitor Cell Transplantation. *Therapeutic Apheresis*, 6(1):5-14, 2002.
- Jansen J, Hanks S, Thompson M, Dugan MJ, Akard LP. Transplantation of hematopoietic stem cells from peripheral blood. *J Cell Mol Med* 9(1): 37-50, 2005.
- Jansen EM, Hanks SG, Terry C, Akard LP, et al. Prediction of engraftment after autologous peripheral blood progenitor cell transplantatio: CD34, colony-forming unit-granulocyte-macrophage, or both? *Transfusion* 47(5):817-23, 2007.
- Ji SQ, Chen HR, Wang HX, et al. Comparison of outcome of allogenic bone marrow transplantation with or without granulocyte colony-stimulating factor (lenograstim) donor-marrow priming in patients with chronic myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:261-167, 2002.
- Jowit SN, Chang J, Morgenstern GR, et al. Factors which affect the CFU-GM content of the peripheral blood haematopoietic progenitor cell harvests in patients with acute leukaemia. *British Journal of Haematology* 100: 688-694, 1998.
- Kanz L, Brugger W. Mobilization and ex vivo manipulation of peripheral blood progenitor cells for support of high-dose cancer therapy. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ eds. *Haematopoietic Cell Transplantation*. Blackwell Science, Malden, MA, USA. pp: 455- 468, 1999.
- Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenberger DD. Reconstitution of hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 14:192-6, 1986.

- Kessinger A, Smith DM, Strandjord SF, Landmark JD, Dooley DC, Law P, Coccia PF, Weisenberger DD, Armitage JO. Allogenic transplantation of blood-derived T-cell depleted hematopoietic stem cells after myeloablative treatment in a patient with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 4: 643-646, 1989.
- Kessinger A, Vose JM, Bierman PJ, Armitage JO. High-dose therapy and autologous peripheral stem cell transplantation for patients with bone marrow metastases and relapsed lymphomas: an alternative to bone marrow purging. *Exp Hematol* 19: 1013-1016, 1991.
- Kessinger A, Scharp JG. The 'whys' and 'hows' of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 31:319-329, 2003.
- Ketterer N, Salles G, Moullet I, et al. Factors associated with successful mobilization of peripheral blood progenitor cells in 200 patients with lymphoid malignancies. *Brit J Haematol.* 103:235-242, 1998.
- Klaus J, Herrmann D, Breitkreutz I, et al. Effect of CD34+ cell dose on hematopoietic reconstitution and outcome in 508 patients with multiple myeloma undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Eur J Haematol* 78:21-28. 2007.
- Knudsen LM, Gaarsdal E, Jensen L, Nikolaisen K, Johnsen HE. Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large-scale collection by leukapheresis. *J Haematother* 7:45-52, 1998.
- Kobbe G., Sohngen D, Bauser U, et al. Factors influencing G-CSF-mediated mobilization of hematopoietic progenitor cells during steady-state hematopoiesis in patients with malignant lymphoma and multiple myeloma. *Ann Haematol* 78:456-462, 1999.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Randomized cross-over trial of progenitor-cell mobilization: high-dose cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) versus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus G-CSF. *J Clin Oncol* 18:1824-1830, 2000.
- Koenigsmann M, Jentsch-Ullrich K, Mohren M, et al. The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization. *Transfusion* 44:777-784, 2004.
- Körbling M, Burke P, Braine HG, Elfenbein GJ, Santos GW, Kaizer H. Successful engraftment of blood derived normal hematopoietic stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 9: 684-690, 1981.
- Körbling M, Dorken B, Antony D, et al. Autologous transplantation of blood derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 67: 529-32, 1986.

- Körbling M, Flidner TM, Ruber E, et al. Description of a closed plastic bag system for the collection and cryopreservation of leukapheresis-derived blood mononuclear leukocytes and CFUc from human donors. *Transfusion* 20:293-300, 1980.
- Kotasek D, Shepherd KM, Sage RE, Dale BM, et al. Factors affecting blood stem cell collections following high-dose cyclophosphamide mobilization in lymphoma, myeloma and solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 9:11-7, 1992.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood* 87(1):1-13, 1996.
- Kroschinsky F, Hölig K, Platzbecker U, et al. Efficacy of single-dose pegfilgrastim after chemotherapy for the mobilization of autologous peripheral blood stem cells in patients with malignant lymphoma or multiple myeloma. *Transfusion* 46:1417-1423, 2006.
- Kuittinen T, Nousiainen T, Halonen P, Mahlamäki E, Jantunen E. Prediction of mobilization failure in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 33(9):907-912, 2004.
- Lane, TA. Mobilization of hematopoietic progenitor cells. In: Brecher ME, Lasky LC, Sacher RA and Issit LA, eds. *Hematopoietic progenitor cells: processing, standards and practice*. Bethesda. MD, American Association of Blood Banks, 60-107, 1995.
- Lane TA, Law P, Maruyama M, et al. Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85:275-82, 1995.
- Laterveer L, Lindley LJ, Hamilton MS, et al. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85: 2269-2275, 1995.
- Lee JL, Kim SB, Lee GW, et al. Collection of peripheral blood progenitor cells: analysis of factors predicting the yields. *Transfus Apher Sci* 29: 29-37, 2003.
- Lefrère F, Zohar S, Ghez D, et al. The VAD chemotherapy regimen plus a G-CSF dose of 10µg/kg is as effective and less toxic than high-dose cyclophosphamide plus a G-CSF dose of 5µg/kg for progenitor cell mobilization: results from a monocentric study of 82 patients. *Bone Marrow Transplant*. 37: 725-729, 2006.
- Lemoli RM, de Vivo A, Damiani D, et al. Autologous transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-primed bone marrow is effective in supporting myeloablative chemotherapy in patients with hematologic malignancies and poor peripheral blood stem cell mobilization. *Blood* 102(5):1595-1600, 2003.

- Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, et al. Mobilization and hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100: a CXCR4 antagonist. *Blood* 102:2728-2730, 2003.
- Linker C, Anderlini P, Herzig R, et al. Recombinant human thrombopoietin augments mobilization of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 9(6): 405-13, 2003.
- Loebinger MR, Janes SM. Stem Cells for Lung Disease. *Chest* 132: 279-285, 2007.
- Mahmoud HK, Fahny AO, Kanel A, et al. Peripheral blood vs bone marrow as a source of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24: 355-358, 1999.
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Hematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone marrow transplantation. Control of secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism. *British Med J* 2:1633-1635, 1963.
- McCredie K, Hersch E, Fredereich E. Cells capable of colony information in the peripheral blood of man. *Science* 171:293-4, 1971.
- McLeod BC, Sniecinski I, Ciavarella D, et al. Frequency of immediate adverse effects associated with therapeutic apheresis. *Transfusion* 39:282-8, 1999.
- Micallef IN, et al. Factors which predict unsuccessful mobilization of peripheral blood progenitor cells following G-CSF alone in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Haematol J* 1:367-73, 2000.
- Micklem HS, Anderson N, Ross E. Limited potential of circulating haematopoietic stem cells. *Nature* 256: 41-43, 1975.
- Molineux G, Kinstler O, Briddell B, et al. A new form of Filgrastim with sustained duration in vivo and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans. *Exp Haematol* 27:1724-1734, 1999.
- Moncada V, Bolan C, Yau YY, Leitman SF. Analysis of PBPC cell yields during large-volume leukapheresis of subjects with a poor mobilization response to filgrastim. *Transfusion* 43:495-501, 2003.
- Moog R. Aphaeresis techniques for collection of peripheral blood progenitor cells. *Transfus Apher Sci.* 31:207-220, 2004.
- Morris CL, Siegel E, Barlogie B, et al. Mobilization of CD34+ cells in elderly patients with multiple myeloma: influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen. *Br J Haematol* 120(3):413-423, 2003.

- Morton J, Hutchins C, Durrant S. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) primed allogeneic bone marrow: Significantly less graft-versus-host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. *Blood* 98: 3186-3191, 2001.
- Moskowitz CH, Glasman JR, Wuest D, et al. Factors affecting mobilization of peripheral blood progenitor cells in patients with lymphoma. *Clin Cancer Res* 4(2):311-6, 1998.
- Murata M, Harada M, Kato S, et al. Peripheral blood stem cell mobilization and aphaeresis: analysis of adverse events in 94 normal donors. *Bone Marrow Transplant*. 24(10):1065-1071, 1999.
- Narayanasami U, Kanteti R, Morelli J, et al. Randomized trial of filgrastim versus chemotherapy and filgrastim mobilization of hematopoietic progenitor cells for rescue on autologous transplantation. *Blood* 98:2059-2064; 2001.
- Neben S, Hemmann S, Montgomery M, et al. Haematopoietic stem cell deficit of transplanted bone marrow previously exposed to cytotoxic agents. *Exp Hematol* 21: 156-162, 1993.
- Nervi B, Link DC, Dierschke JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 99:690-705, 2006.
- Noga SJ, Vogelsang GB, Miller SC, et al. Using point-of-care CD34 enumeration to optimize PBSC collection conditions. *Cytotherapy* 3:11-18, 2001.
- Nowrouzian MR, Waschke P, Bojko P, et al. Impact of chemotherapy regimen and hematopoietic growth factor on mobilization and collection of peripheral blood stem cells in cancer patients. *Ann Oncol* 14 Suppl 1:129-136, 2003.
- Osgood EE, Ridle M, Matheus T. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow: a case report. *Ann Int Med* 13:357, 367, 1939.
- Pastore D, Specchia G, Mestice A, et al. Good and poor CD34+ cells mobilization in acute leukemia: analysis of factors affecting the yield of progenitor cells. *Bone Marrow Transplant*. 33:1083-1087, 2004.
- Pavone V, Gaudio F, Console G, et al. Poor mobilization is an independent prognostic factor in patients with malignant lymphomas treated by peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 37:719-724, 2006.
- Pecora AL, Lazarus HM, Jennis AA, Prett RA, et al. Breast cancer cell contamination of blood stem cell products in patients with metastatic breast cancer: predictors and clinical relevance. *Biol Blood Marrow Transplant*. 8:536-543, 2002.

- Powles R, Mehta J, Kulkarni S, et al. Allogeneic blood and bone-marrow stem cell transplantation in haematological malignant disease: a randomized trial. *Lancet* 355:1231-1237, 2000.
- Prince HM, Imrie K, Sutherland DR, et al. Peripheral blood progenitor cell collections in multiple myeloma: predictors and management of inadequate collections. *Br H Haematol.* 93:142-145, 1996.
- Reddy RL. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transf Apher Sci* 32:63-72, 2005.
- Reiffers J, Bernard P, David B. Successful autologous transplantation with peripheral blood hematopoietic cells in patients with acute leukemia. *Exp Hematol* 14: 312-315; 1986.
- Reiffers J, Labopin M, Sanz M, et al. Autologous blood cell vs marrow transplantation for acute myeloid leukemia in complete remissio: na EBMT retrospective analysis. *Bone Marrow Transplantatio* 25: 1115-1119, 2000.
- Remes K, Matinlauri I, Grenman S, et al. Daily measurements of blood CD34+ cells after stem cell mobilization predict stem cell yields and posttransplant hematopoietic recovery. *J Haematother* 6:13-19, 1997.
- Repetto L, Vannozzi MO, Balleari E, et al. Mitoxantrone in elderly patients with advanced breast cancer: pharmacokinetics, marrow and peripheral hematopoietic progenitor cells. *Anticancer Res* 19: 879-84; 1999.
- Richman CM, Weiner RS, Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. *Blood* 47: 10311-1034, 1976.
- Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, et al. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collection from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 82:2605-10, 1993.
- Russel NH, McQuaker G, Stainer C, et al. Stem cell mobilization in lymphoproliferative diseases. *Bone Marrow Transplant* 22: 935-940, 1998.
- Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clin Haematol.* 12:611-639, 1983.
- Sarkodee-Adoo C, Taran I, Guo C, Buadi F, et al. Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34+ cell collection by large-volume aphaeresis. *Bone Marrow Transplant.* 31:851-855, 2003.
- Sawant RB, Rajadhyaksha SB. Correlation of CD34+ cell yield in peripheral blood progenitor cell product with the pre-leukapheresis cell counts in peripheral blood. *J Assoc Physicians India* 53:1031-1035, 2005.

- Schmitz N, Beksac M, Hasenclever D, et al. Transplantation of peripheral blood cells to HLA-identical siblings with standard-risk leukemia. *Blood* 100: 761-767, 2002.
- Schmitz N, Eapen M, Horowitz MM, et al. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 108: 4288-4290, 2006.
- Schwartzberg LS, Birch R, Hazelton B, et al. Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *J Hematother* 1:317-327, 1992.
- Semerad CL, Christopher MJ, Liu F, Short B, Simmons PJ, et al. G-CSF potently inhibits osteoblasts activity and CXCL12mRNA expression in the bone marrow. *Blood* 106:3020-3027, 2005.
- Serke S, Beyer J, Rick O, et al. Analysis of CD34-expressing cells in clinical practice. *Vox Sang* 74 (Suppl): 469-475, 1998.
- Shimazaki C, Yamagata N, Tatsumi T, Hirata T, Oku N, Ashihara E, Goto H, Inaba T, Fujita N, Haruyama H, et al. Mobilization of peripheral blood progenitor cells by high-dose Ara C, VP-16 and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: factors affecting progenitor cell yields. *Bone Marrow Transplant* 15(5):763-7, 1995.
- Shpall EJ, Champlin R, Glaspy JA. Effect of CD34+ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol Blood Marrow Transplant*. 4:84-92, 1998.
- Siena S, Bregni M, Brando B, et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors or autologous transplantation in cancer patients. *Blood* 77:400-9, 1991.
- Siena S, Schiavo R, Pedrazzali P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD 34+ cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol* 18:1360-1377, 2000.
- Smith TJ, Hilner BE, Schmitz N, et al. Economic analysis of randomized clinical trial to compare filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cell transplantation and autologous bone marrow transplantation in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 15:5-10, 1997.
- Sociński MA, Elias A, Schnipper I. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating hematopoietic progenitor cell compartment in man. *Lancet* 1:1194-1198, 1988.

- Sola C, Maroto P, Salazar R, et al. Bone Marrow Transplantation: Prognostic factors of peripheral blood stem cell mobilization with Cyclophosphamide and Filgrastim (r-metHuG-CSF): the CD34⁺ cell dose positively affects the time to hematopoietic recovery and supportive requirements after high-dose chemotherapy. *Hematology* 4(3):195-209, 1999.
- Stiff P. Management strategies for the hard-to-mobilize patient. *Bone Marrow Transplant* 23:S29-S33, 1999.
- Stiff P, Gingrich R, Luger S, et al. A randomized phase 2 study of PBPC mobilization by stem cell factor and filgrastim in heavily pretreated patients with Hodgkin's disease or non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 26:471-482, 2000.
- Stroncek D, Shawker T, Follmann D, Leitman S. G-CSF-induced spleen size changes in peripheral progenitor cell donors. *Transfusion* 43:609-13, 2003.
- Sugrue MW, Willians K, Pollok BH et al. Characterization and outcome of "hard to mobilize" lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 39:509-519, 2001.
- Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, ChinYee I. The ISHAGE guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. *J Hematoth.* 5(3):213-226, 1996.
- Tarella C, Nicola MD, Caracciolo D, et al. High dose ara-C with autologous peripheral blood progenitor cell support induces a marked progenitor cell mobilization: an indication for patients at risk for low mobilization. *Bone Marrow Transplant*. 30:735-732, 2002a.
- Tarella C, Pompei F, Cavazzuti L, Bacigalupo A, et al. Treatment modalities and success rate of 1,907 procedures of peripheral blood progenitor cell mobilization; a multicenter study from GITMO (Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo). *Blood* 100:826a, 2002b.
- Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferreber JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.*, 257:491-496, 1957.
- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89: 2233-2258, 1997.
- To LB, Shepperd KM, Haylock DN, et al. Single high doses of cyclofosfamide enable the collection of high numbers of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *Experimental Hematology* 18: 442-447, 1990.

- Watts MJ, Sullivan AM, Jamieson E, et al. Progenitor-cell mobilization after low-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor: an analysis of progenitor-cell quantity and quality and factors predicting for these parameters in 101 pretreated patients with malignant lymphoma. *J Clinical Oncol.* 15(2):535-546, 1997.
- Watts MJ, Ings SJ, Flynn M, et al. Remobilization of patients who fail to achieve minimal progenitor thresholds at the first attempt is clinically worthwhile. *Br J Haematol* 111:287-291, 2000.
- Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, West W. 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* 86:3961-3969, 1995.
- Weaver CH, Potz J, Redmond J, et al. Engraftment and outcome of patients receiving myeloablative therapy followed by autologous peripheral blood stem cells with a low CD34+ cell count. *Bone Marrow Transplant* 19: 1103-1110, 1997a.
- Weaver CH, Schwartzberg LS, Birch R, et al. Collection of peripheral blood progenitor cells after the administration of ciclofosfamide, etoposide, and granulocyte-colony-stimulating factor: an analysis of 497 patients. *Transfusion* 37:896-903, 1997b.
- Weaver CH, Birch R, Greco FA, et al. Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim. *Br J Haematol.* 100(2):338-47, 1998.
- Weaver CH, Schulman K, Wilson-Relyca B, Birch R, West W, Buckner CD. Randomized trial of filgrastim, sargramostim, or sequential sargramostim and filgrastim after myelosuppressive chemotherapy for the harvesting of peripheral-blood stem cells. *J Clin Oncol* 18:45-53, 2000.
- Weissman, IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. *Cell* 100:157-168, 2000.
- Welte K, Platzer E, Lu L, Gabrilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA. Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 1526-1530, 1985.
- Williams O, Demirer T, Lilleby K, Buckner D, Bensinger WI. Tempo of hematologic recovery correlates with peripheral blood CD34+ cell level in patients undergoing stem cell mobilization. *J Clin Apher* 13(1):1-6, 1998.
- Yu J, Leisenring W, Bensinger WI, Holmberg LA, Rowley SD. The predictive value of white cell or CD34+ cell count in the peripheral blood for timing aphaeresis and maximizing yield. *Transfusion* 39:442-450, 1999.